

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Tesis Doctoral

Desarrollo de PDX (patient-derived xenografts) ortotópicos de tumores sólidos pediátricos extracraneales

Presentada por
M^a Gabriela Guillén Burrieza

Para obtener el título de Doctora en Medicina

DIRECTORES DE LA TESIS:

Dr. Alberto Villanueva Garatachea
Dra. M^a Soledad Gallego Melcón
Dr. Manuel Guillermo López Paredes

TUTOR DE LA TESIS:

Dr. Manuel Armengol Carrasco

Tesis afiliada al programa de doctorado en Cirugía y Ciencias Morfológicas
Departamento de Cirugía
Universitat Autònoma de Barcelona

2023

I only hope that we never lose sight of one thing –
that it was all started by a mouse.

Walt Disney



Fotografía: Monumento a los ratones que dieron su vida por la ciencia.
Escultura de Andrew Kharevich

AGRADECIMIENTOS

Barcelona, marzo 2023

Como no puede ser de otra manera, escribo estas líneas a última hora, por lo que espero reflejar el profundo agradecimiento que siento hacia todas las personas que mencionaré a continuación. Intentaré que incluya a todos los que, a lo largo de este tiempo, de un modo u otro, han contribuido a que esta tesis se llevase a término, bien fuera por trabajar directamente en el proyecto o por haber sido soportes sin los cuales terminar esta aventura hubiera sido del todo imposible.

A lo largo de estos años han sucedido muchas cosas, algunas históricas e incluso, catastróficas, que solo viviremos una vez en la vida (espero). Algunas de ellas, como la pandemia por COVID19, han supuesto un antes y un después en nuestras vidas y plantearon un auténtico reto para conseguir llevar a cabo ya no este trabajo de investigación, sino nuestro trabajo diario. Otras, de ámbito más personal (tanto propias como de muchos de los componentes del grupo investigador), no por afectar a la esfera privada han sido menos complicadas. En mi caso, experimentar de primera mano la enfermedad de una persona sumamente querida, el miedo a cómo resultarán las cosas, el lidiar con las secuelas, ha sido y es una experiencia muy dura, pero de la que quiero extraer un aprendizaje que me permita tener más empatía por mis pacientes y por sus familias. Todas estas circunstancias han hecho que reconozca, más que nunca, la importancia de la cirugía de calidad como herramienta de curación y de prevención de secuelas, y de la investigación, como piedra angular de los avances médicos y base de la esperanza de las personas que sufren de cerca o de primera mano las enfermedades graves.

Me gustaría, no obstante, antes de comenzar con los agradecimientos, hacer una pequeña mención para los animales que han sido empleados en la elaboración de este trabajo. Actualmente, estos animales siguen siendo imprescindibles en la investigación traslacional oncológica, pero espero de corazón llegue el día no muy lejano en el que la tecnología nos permita alcanzar resultados similares sin hacer sufrir o sacrificar seres vivos. Entre tanto, es de justicia reconocer el enorme servicio que prestan a la ciencia.

A continuación, paso a nombrar a las personas a las que quiero agradecer particularmente:

A mi familia, que es el pilar de mi vida. Pero especialmente a mi madre, por darme alas, valores y enseñarme con su ejemplo que las mujeres podemos ser lo que queramos ser.

Al Dr. Alberto Villanueva, sin el cual esta tesis no hubiera sido posible desde ningún punto de vista. Gracias por tu trabajo incansable, tu energía ilimitada y tu generosidad al poner a nuestro alcance recursos, técnicas e ideas que de otro modo difícilmente hubiéramos podido alcanzar.

A la Dra. Aroa Soriano, quien a lo largo de este tiempo no solo me ha demostrado ser una investigadora llena de talento y generosidad, sino que además se ha convertido en una amiga paciente que me ha acompañado en lo profesional y en lo personal en este viaje lleno de imprevistos.

A la Dra. Sandra Navarro, que de forma incansable y meticulosa ha caracterizado cada tumor y cada modelo de esta tesis, pese a las dificultades y las limitaciones de tiempo. Con su dedicación y conocimiento, pone de relevancia la importancia de las patólogas pediátricas expertas, no siempre reconocidas por lo minoritario de su campo. También a Teresa Moliné, la técnica de anatomía patológica sin la cual hubiera sido imposible procesar todas las muestras.

A la Dra. Soledad Gallego, responsable en gran medida del nivel asistencial e investigador actual de la Oncología Pediátrica en nuestro hospital, y quien ha sido para mí a lo largo de los años un modelo de integridad, profesionalidad y humanidad.

Al Dr. José Sánchez de Toledo, por su enorme contribución a la Oncología Pediátrica de Vall d'Hebron y por su amistad a lo largo de los años.

Al Dr. Manuel López por instarme a hacer la tesis, por su confianza en mí y por darme todas las facilidades imaginables para poder concluir este trabajo.

A mi compañero y amigo, el Dr. José Andrés Molino. No hay palabras suficientes para agradecer tu apoyo, compromiso, lealtad y amistad incondicional.

A mis compañeros de Unidad, Dr. Sergio López y Dra. Marta Martos que no solo han colaborado como investigadores, sino que, además, me han ofrecido todo su soporte para lograr finalizar la tesis.

Al Dr. Lucas Moreno, por su apoyo, consejos científicos, metodológicos y a menudo, diplomáticos. Por traer a la Oncología de nuestro hospital una nueva perspectiva, que, con la excelente base de lo ya existente, está llamada a lograr grandes avances.

A la Dra. Raquel Hladun, el alma del proyecto de medicina personalizada, que con enormes esfuerzos ha logrado posicionarnos al más alto nivel pese a todas las dificultades, y con ella, a todo el Servicio de Oncohematología Pediátrica de Vall d'Hebron (Dra. Anna Llort, Dr. Luis Gros, Dr. Tino Sábado, Dra. Lorena Valero, Dra. Paula Pérez), grandes profesionales y excelentes compañeros que cada día se dejan la piel cuidando a los demás, y que tratan una enfermedad tan dura como es el cáncer pediátrico desde la humanidad, la empatía y la ética.

A todos los investigadores del "Grup de Recerca en Càncer en la Infancia y la Adolescencia" del VHIR (Dr. Pep Roma, Dr. Miquel Segura, y el resto de los investigadores predoctorales y postdoctorales, así como a los técnicos), por su difícil trabajo diario, a veces poco reconocido, mal remunerado y siempre lleno de incertidumbre; sin vosotros, la medicina translacional en cáncer pediátrico no existiría. A lo largo de estos años he aprendido a valorar aún más la tarea tan esencial que desempeñáis. Un agradecimiento especial, sin duda, a Andrea Vilaplana y Sergio Manresa, quienes de manera generosa me han ayudado de forma incalculable en el esprint final de este trabajo.

A mis compañeras, la Dra. Romy Gander, Dra. Gloria Royo, Dra. Laura García, Dra. Montse Aguilera y también, las/los médicos internos residentes del servicio de Cirugía Pediátrica, que han estado en todo momento dispuestas a echar una mano cuando ha sido necesario (sobre todo en último este año que tantas veces lo ha sido...).

A mis amigas, las Dras. Andrea Martín y Sara Martín, parte de mi pequeña familia fuera de la familia.

A mis amigos, la Dra. Elisabet Sánchez y Nacho Martín, quienes han creído en este proyecto tanto o más que nosotros. En especial a Eli; gracias por estar ahí siempre, amiga.

A todo el equipo multidisciplinar que cuida de nuestros pacientes: Enfermeras de quirófano, radiólogos pediátricos, anestesiistas, y un largo etcétera de personas que constituye el equipo multidisciplinar con el que tengo la suerte de trabajar cada día.

A las fundaciones y entidades que han financiado esta tesis, pero muy especialmente a las familias de los pacientes que, atravesando uno de los momentos más duros de sus vidas, han tenido la inmensa generosidad de contribuir a nuestro trabajo para que otros niños puedan beneficiarse de él en el futuro.

No me cabe duda de que estoy olvidando a muchas personas, porque si una cosa me ha quedado clara en el tiempo transcurrido durante la elaboración de esta tesis (un tiempo elástico, que por momentos parecía eterno y por momentos parecía correr a la velocidad de la luz), es que hay muchas más personas que me acompañan en el camino de las que a veces soy consciente. Personas que me levantan, me sostienen y me ayudan cuando la vida es más complicada, que no solo se alegran conmigo cuando todo sale bien, sino que comparten también los momentos duros. A todas ellas, gracias.

El último agradecimiento y el más importante es, sin duda, a nuestros pacientes y a sus familias, quienes han sido el motor y la inspiración de este trabajo, y cuya generosidad y confianza han permitido desarrollar este proyecto, del cual esperamos que se beneficien pacientes presentes y futuros. Sus lecciones de vida y esperanza son el combustible que nos ayuda a llegar más lejos en la investigación del cáncer pediátrico.

A todos los niños y adolescentes que finalmente no lo consiguieron.

Para Nora.

Seguiremos trabajando en vuestro nombre.

RESUMEN

Resumen

La supervivencia de los pacientes con tumores sólidos pediátricos se sitúa en torno al 80% en los países desarrollados, porcentaje que a pesar de las mejoras terapéuticas no ha aumentado en los últimos 20 años, principalmente por la baja supervivencia asociada a algunos tipos tumorales de alto riesgo y para los tumores en recaída (en torno al 30%, incluso menor para algunos subtipos). El disponer de buenos modelos preclínicos que reflejen adecuadamente las particularidades y la heterogeneidad de los tumores pediátricos al diagnóstico y, sobre todo, a la recaída, se considera un hecho determinante para conseguir acelerar el desarrollo de nuevos tratamientos efectivos. Los modelos PDX (*Patient-Derived Xenografts*) generados en ratones inmunosuprimidos a partir de muestras tumorales del paciente, son actualmente los modelos preclínicos más cercanos a la enfermedad original. A diferencia de lo que sucede en el cáncer del adulto, donde son cada vez más ubicuos, existen pocos modelos pediátricos. En los últimos años algunos grupos (principalmente, consorcios internacionales) han generado modelos PDX pediátricos. Mayoritariamente, se trata de modelos heterotópicos – implantación del tumor en tejido subcutáneo - a partir de líneas celulares o bien, en menor medida, mediante inyección ortotópica (en el órgano de origen) tras la disagregación de las muestras tumorales, requiriendo estos últimos importantes inversiones económicas. Estos modelos ortotópicos reflejan con mayor fidelidad la enfermedad original, al reproducir el microambiente tumoral y permiten reproducir con más exactitud las condiciones de farmacocinética y farmacodinámica que se dan en el paciente.

Esta tesis refleja el esfuerzo y la experiencia adquiridos generando modelos PDX de tumores sólidos pediátricos extracraneales, procedentes de pacientes tratados en el Hospital Universitario Vall d'Hebron. Los modelos se han generado mayoritariamente mediante implantación ortotópica (denominados PDOX) quirúrgica de fragmentos tumorales sólidos no disagregados, en el marco de un programa de Medicina Personalizada en un centro sanitario público. A partir de 135 muestras tumorales procedentes de 112 pacientes, se han establecido un total de 46 PDX, correspondiendo a 14 tipos de cáncer.

Se han generado modelos a partir de tumores tratados y no tratados, en su mayoría de alto riesgo, refractarios o en recaída (local o metastásica). Se han analizado diversos factores clínicos de los pacientes, así como factores relativos a la muestra tumoral y al método de implantación, que podrían influenciar en el éxito de la generación de modelos PDOX pediátricos y se ha estudiado la correlación entre el establecimiento de los modelos con la evolución clínica de los pacientes. Los modelos se han validado mediante examen histológico morfológico e inmunohistoquímico, hallando un 97,6% de correlación con los tumores originales. Se han recopilado los datos genómicos procedentes de los tumores de los pacientes como guía orientativa para la futura aplicación de los modelos establecidos. Varios de los PDX establecidos se han empleado para realizar experimentos de medicina personalizada en tiempo real y para estudiar nuevas moléculas con posibilidades terapéuticas.

Resum

La supervivència dels pacients amb tumors sòlids pediàtrics se situa al voltant del 80% als països desenvolupats, percentatge que malgrat les millors terapèutiques no ha augmentat en els darrers 20 anys, principalment per la baixa supervivència associada a alguns tipus tumorals d'alt risc i pels tumors en recaiguda (al voltant del 30%, fins i tot menor per a alguns subtipus). El fet de disposar de bons models preclínics que reflecteixin adequadament les particularitats i l'heterogeneïtat dels tumors pediàtrics al diagnòstic i, sobretot, a la recaiguda, es considera un fet determinant per aconseguir accelerar el desenvolupament de nous tractaments efectius. Els models PDX (*Patient-Derived Xenografts*) generats en ratolins immunosuprimits a partir de mostres tumorals del pacient, són actualment els models preclínics més propers a la malaltia original. A diferència del que passa en el càncer de l'adult, on cada vegada són més ubicis, hi ha pocs models pediàtrics. En els darrers anys alguns grups (principalment, consorcis internacionals) han generat models PDX pediàtrics. Majoritàriament, es tracta de models heterotòpics – implantació del tumor en teixit subcutani – a partir de línies cel·lulars o bé, en menor mesura, mitjançant injecció ortotòpica (a l'òrgan d'origen) després de la disagregació de les mostres tumorals, requerint aquests últims importants inversions econòmiques. Aquests models ortotòpics reflecteixen amb més fidelitat la malaltia original, en reproduir el microambient tumoral i permeten reproduir amb més exactitud les condicions de farmacocinètica i farmacodinàmica que es donen al pacient.

Aquesta tesi reflecteix l'esforç i experiència adquirits generant models PDX de tumors sòlids pediàtrics extracranials, procedents de pacients tractats a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron. Els models s'han generat majoritàriament mitjançant la implantació ortotòpica (anomenats PDOX) quirúrgica de fragments tumorals sòlids no disagregats, en el marc d'un programa de Medicina Personalitzada en un centre sanitari públic. A partir de 135 mostres tumorals procedents de 112 pacients, s'han establert un total de 46 PDX i corresponen a 14 tipus de càncer.

S'han generat models a partir de tumors tractats i no tractats, majoritàriament d'alt risc, refractaris o en recaiguda (local o metastàtica). S'han analitzat diversos factors clínics dels pacients, així com factors relatius a la mostra tumoral i al mètode d'implantació, que podrien influir en l'èxit de la generació de models PDOX pediàtrics i s'ha estudiat la correlació entre l'establiment dels models amb l'evolució clínica dels pacients. Els models s'han validat mitjançant examen histològic morfològic i immunohistoquímic, i s'ha trobat un 97,6% de correlació amb els tumors originals. S'han recopilat les dades genòmiques procedents dels tumors dels pacients com a guia orientativa per a la futura aplicació dels models establerts. Alguns dels PDX establerts s'han emprat per fer experiments de medicina personalitzada en temps real i per estudiar noves molècules amb possibilitats terapèutiques.

Abstract

The survival of paediatric solid tumours remains around 80% in developed countries, a percentage that despite therapeutic improvements has not increased in the last 20 years, mainly due to the low survival associated with some high-risk tumour types and with relapsed tumours (around 30%, even lower for some subtypes). Having good preclinical models that adequately reflect the particularities and heterogeneity of paediatric tumours at diagnosis and, above all, at relapse, is considered a determining factor in accelerating the development of new effective treatments. PDX (Patient-Derived Xenografts) models, generated in immunosuppressed mice from patient tumour samples, are considered the closest preclinical models to the original disease. Unlike what happens in adult cancer, where they are increasingly ubiquitous, there are few paediatric PDX models. In recent years, some groups (mainly international consortia) have generated paediatric PDX models in mice. These are mostly heterotopic models (implantation of the tumour in the subcutaneous tissue) from cell lines or, to a lesser extent, by orthotopic injection (in the organ of origin) after processing patient derived tumour samples, the latter requiring significant financial investment. These orthotopic models more faithfully reflect the original disease, by reproducing the tumour microenvironment and making it possible to reproduce more accurately the pharmacokinetic and pharmacodynamic conditions that occur in the patient.

This thesis reflects the effort and experience acquired generating PDX models of extracranial paediatric solid tumours from patients treated at the Vall d'Hebron University Hospital. The models have been generated mainly through surgical orthotopic implantation (named PDOX) of undisintegrated solid tumour fragments, within the framework of a Personalized Medicine program in a public health centre. From 135 tumour samples originating from 112 patients, a total of 46 PDX in mice have been established, corresponding to 14 types of paediatric cancer. Models have been generated from tumours at diagnosis (treatment-naive) and treated tumours, most of them high risk, refractory or relapsed (local or metastatic). Several clinical factors of the patients have been analysed, as

well as factors related to the tumour sample and the implantation method, which could influence the success of the generation of paediatric PDOX models, and the correlation between the establishment of the models with the clinical evolution of the patients was studied. The models have been validated by histological examination (morphology and immunohistochemistry), finding a 97,6% correlation. Genomic data from the patients' tumours have been compiled as a guideline for the future application of the established models. Some of the established PDX have even been used to carry out personalized medicine in real time and to study new molecules with therapeutic possibilities.

ÍNDICE

0. INTRODUCCIÓN

0.1 Investigación traslacional en cirugía pediátrica	37
0.2 El cáncer pediátrico: etiopatogenia, epidemiología, tratamientos actuales y supervivencia. La cirugía oncológica pediátrica.	38
0.3 Cáncer pediátrico de alto riesgo y en recaída.....	57
0.4 El acceso a nuevos tratamientos en cáncer pediátrico.....	57
0.5 La medicina de precisión en cáncer pediátrico.....	59
0.6 Los modelos preclínicos en cáncer pediátrico.....	63
0.6.1 Modelos preclínicos de tumores sólidos pediátricos.....	64
0.6.1.1 Líneas celulares.....	64
0.6.1.2 Organoides / Tumoroides.....	65
0.6.2.3 Xenoinjertos y xenoinjertos derivados de paciente.....	66
0.6.2 Patient Derived Xenografts en ratón: Antecedentes, Tipos.....	68

1. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	73
--------------------------------	----

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 EL PROGRAMA COMIK DEL HOSPITAL VALL D'HEBRON (<i>Cancer OMICs for Kids</i>)...76	
2. 2 DESARROLLO DE LOS CIRCUITOS Y LOS MODELOS PDX.....	83
2.2.1 DESARROLLO DEL CIRCUITO	83
2.2.1.1 Selección de los pacientes.....	85
2.2.1.2 Obtención de la muestra y detalle de las técnicas quirúrgicas.....	85
2.2.1.2 Restricciones durante el periodo de estudio.....	87
2.2.1.3 Procesado de la muestra.....	88
2.2.2 TÉCNICA DE IMPLANTACIÓN DE LOS PDX.....	88

2.2.2.1 Descripción del modelo animal	88
2.2.2.2 Criterios de punto final, procesamiento de las muestras.....	93
2.2.2.3 Perpetuación y conservación de los modelos.....	94
2.2.2.4 Utilización de modelos establecidos para la evaluación de fármacos y estrategias terapéuticas.....	95
2.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS MODELOS: METODOLOGÍA.....	97
2.3.1 Caracterización histológica.....	97
2.3.2 Caracterización genómica	100
2.4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	103
3. RESULTADOS	
3.1 ANÁLISIS DE LOS MODELOS Y RESULTADOS DE SU CARACTERIZACIÓN.....	106
3.1.1 Análisis descriptivo.....	106
3.1.2 Factores asociados al éxito de implantación.....	113
3.1.3 Caracterización histológica.....	119
3.1.4 Caracterización genómica.....	124
3.1.5 Correlación con la evolución clínica.....	125
3.2 ANÁLISIS DE LOS MODELOS POR TIPO TUMORAL.....	127
3.2.1 Nefroblastomas	127
3.2.2 Tumores Hepáticos.....	129
3.2.3 Neuroblastomas.....	133
3.2.4 Sarcomas.....	137
3.2.5 Otros tumores.....	149

3.3 APLICACIÓN DE LOS MODELOS: MEDICINA PERSONALIZADA EN TIEMPO REAL E INVESTIGACIÓN SOBRE MODELOS PRECLÍNICOS.....	152
3.3.1 Paciente 1.....	152
3.3.2 Paciente 2.....	158
3.3.3 Paciente 3.....	161
4. DISCUSIÓN.....	168
4.1 Análisis de los modelos	171
4.2 Factores asociados al éxito de implantación.....	177
4.3 Caracterización histológica.....	182
4.4 Correlación con la evolución clínica.....	185
4.5 Análisis de los modelos por tipo tumoral.....	186
4.6 Aplicación experimental de los modelos.....	200
4.7 Los retos pendientes de los modelos PDX.....	202
4.8 Debilidades y fortalezas de la tesis.....	204
5. CONCLUSIONES	
5.1 Conclusiones específicas	207
6. BIBLIOGRAFÍA.....	210
7. ANEXOS.....	227

Índice de Figuras

Índice de figuras

Sección	#	Descripción	Página
Introducción	1	Cirugía paciente con neuroblastoma de alto riesgo adrenal izquierdo con invasión del hilio renal que rodea parcialmente la aorta abdominal suprarrenal y los vasos renales izquierdos.	45
	2	Cirugía paciente con ganglioneuroma pélvico.	46
	3	Cirugía paciente afecto de nefroblastomas bilaterales con escasa respuesta a la quimioterapia.	48
	4	Cirugía hepatoblastoma PRETEXT II en paciente de 3 años con trombo en la vena cava al debut y afectación del lóbulo caudado.	50
	5	Cirugía tumor ovárico de células de la granulosa juvenil en lactante de 13 meses.	51
	6	Cirugía tumor germinal testicular del seno embrionario, en paciente postpuberal.	52
	7	Cirugía rhabdomiosarcoma embrionario de cúpula vesical en varón de 2 años.	53
	8	Cirugía sarcoma de Ewing originado en 9 ^a costilla, y afectando parcialmente a la 8 ^a costilla y al diafragma.	54
Hipótesis y objetivos			
Material y métodos	9	Esquema del funcionamiento del Programa COMIK (Cancer OMICs for Kids) del Hospital Universitari Vall d'Hebron.	77
Resultados	10	Éxito en la implantación de PDOX en función del tipo tumoral.	109
	11	Distribución histológica de los 46 Modelos PDX establecidos.	110
	12	Origen anatómico de las muestras implantadas.	111
	13	Evolución del proceso de implantación en la línea temporal.	111
	14	Técnicas de implantación.	112
	15	Riesgo al obtener la muestra. Matriz de correlación.	115
	16	Metástasis vs. Tumor primario. Matriz de correlación.	116
	17	Situación clínica del paciente. Matriz de correlación.	116
	18	Tipo de implantación. Matriz de correlación.	117
	19	Muestra de las fichas estandarizadas para reflejar el estudio histológico comparativo de cada modelo PDOX establecido.	119
	20	Ejemplo de modelo completamente concordante y discordante histopatológicamente.	120
	21	Ejemplo de crecimiento del componente más inmaduro en el PDOX originado de un nefroblastoma regresivo en el paciente.	122
	22	Ejemplo de crecimiento desdiferenciado en el PDOX originado de una metástasis pulmonar de hepatoblastoma.	122
	23	Metástasis pulmonar de osteosarcoma en el paciente, con densidad celular baja, que en el PDOX pasa a tener una densidad alta.	123
	24	Rabdomiosarcoma embrionario con patrón IHQ difuso para miogenina en el paciente, que en el PDOX pasa a tener un patrón focal.	123
	25	Curvas de supervivencia, Kaplan-Meier. Comparativa entre pacientes cuyos modelos se han establecido frente a los que no.	126
	26	VH-PDOX-WT2. Imagen del PDOX crecido y tinción H&E.	127
	27	WH-PDOX-WT3. Comparativa entre el tumor del paciente y del PDOX.	128
	28	VH-PDOX-HB1. Imagen de la necropsia del modelo.	130
	29	VH-PDOX-HB1. Comparativa H&E. Predominancia del componente embrionario.	130
	30	VH-PDOX-HB2. Comparativa entre el tumor del paciente y del PDOX. Predominancia del componente indiferenciado.	130
	31	VH-PDOX-HCC1. Comparativa entre IHQ del tumor del paciente y del PDOX. Pérdida de positividad para Hepatocyte.	133
	32	PDOX con neuroblastoma suprarrenal izquierdo, necropsia.	133

33	VH-PDOX-HB2. Ejemplo de neuroblastoma totalmente concordante	134
34	Caracterización comparativa VH-PDOX-NB5 con su muestra de origen VH-64	136
35	VH-PDOX-RMS1 y RMS2. Imágenes de las necropsias.	138
36	VH-PDOX-RMS1. Comparativa entre la histología del paciente y del PDOX.	139
37	Imágenes representativas de los MRT en el humano y en los PDOX.	141
38	VH-PDOX-MRT3. Comparativa histológica concordante.	141
39	VH-PDOX-DSRCT1. Necropsia. Tumor pélvico de crecimiento agresivo.	142
40	VH-PDOX-OS1. Necropsia.	144
41	VH-PDOX-OS3. Comparativa histológica entre la muestra del paciente y el modelo en ratón.	145
42	VH-PDOX-EWS3. Comparativa histológica entre la muestra del paciente y el modelo en ratón.	146
43	VH-PDOX-RB1. Imagen del ratón con el tumor en crecimiento. Comparativa histológica entre las muestras (paciente-PDOX).	149
44	VH-PDOX-SNC1. Necropsia del ratón y comparativa histológica (paciente-PDOX) con H&E.	150
45	VH-PDOX-GCT1. Necropsia del ratón y comparativa histológica (paciente-PDOX)	151
46	Caso 1. RMN pélvica al diagnóstico y pre-operatoria de la primera recaída.	153
47	TAC en 2 ^a recaída	154
48	Orthoxenograft/PDOX generado tras la implantación de un fragmento tumoral sólido en la próstata de un ratón macho.	154
49	Evaluación de fármacos en el PDOX.	156
50	Evaluación de respuesta farmacológica (Experimento 2). Necropsia.	156
51	Resultado de evaluación de fármacos en PDOX previamente tratado con Gemcitabina + Docetaxel	157
52	Caso 2. RMN abdominal al diagnóstico y TAC de tórax.	158
53	Orthoxenograft/PDOX procedente de eMRT al diagnóstico.	159
54	Resultados de la evaluación de fármacos en el PDOX.	160
55	Caso 3. Imágenes del AngioTAC y de la cirugía.	161
56	Orthoxenograft/PDOX correspondiente al Caso 3	163
57	Resultados de la evaluación de fármacos en el PDOX.	164
58	Esquema de humanización y tratamiento de los PDOX	165
59	Resultados de evaluación de Atezolizumab en PDOX humanizados	166
Discusión		
Conclusiones		

Índice de Tablas

Índice de tablas

Sección	#	Descripción	Página
Introducción	1	Tumores sólidos extracraneales en pacientes de 0 a 14 años. Supervivencia por tipo tumoral en España.	55
	2	Técnicas utilizadas en medicina de precisión del cáncer pediátrico.	59
	3	Ejemplos de los principales programas de medicina de precisión pediátrica internacionales.	61
	4	Tipos de PDX en función de las características técnicas empleadas en su generación.	67
Hipótesis y objetivos			
Material y métodos	5	Comparativa de las cepas de ratón utilizadas (NSG y Atípicos "Nude").	90
	6	Anticuerpos utilizados para la caracterización histológica por tipo tumoral.	99
Resultados	7	Parejas de modelos PDOX procedentes de un mismo paciente.	106
	8	Muestras implantadas y modelos establecidos por tipo tumoral y totales.	108
	9	Muestras implantadas y modelos establecidos por tipo tumoral y totales (detallado).	108
	10	Éxito en la implantación de PDOX en función del tipo tumoral.	109
	11	Éxito en la implantación de PDOX en función del tipo tumoral (agrupado).	109
	12	Tabla factores asociados al éxito de implantación	118
	13	Resumen del análisis histológico comparativo entre el tumor original y el PDOX por grupos tumorales.	121
	14	Resultados WES Caso 3.	163
Discusión	15	Principales publicaciones con series de tumores PDX pediátricos.	176
Conclusiones			

ABREVIATURAS

Lista de abreviaturas

#	Abreviatura	Significado
A	AAALAC ADN AFP AMS APSA ARMS AYA	International Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care Ácido desoxirribonucleico Alfa fetoproteína Arteria mesentérica superior <i>American Pediatric Surgeons' Association</i> Rabdomiosarcoma alveolar <i>Adolescents and Yound adults o adolescentes y jóvenes adultos</i>
B	BI	Bifurcación ilíaca
C	CEEA CEIC CEIM CNAG CNV COG CRG	Comité Ético de Experimentación Animal Comité Ético de Investigación Clínica Comité de ética de investigación Centro Nacional de Análisis Genómico <i>Copy number variant</i> o variante en número de copias Childrens' Oncology Group Centro de Regulación Genómica
D	DAB DMSO DSRCT	Diaminobencidina Sulfóxido de dimetilo Desmoplasic Small Round Cell Tumor o Tumor desmoplásico de célula redonda pequeña
E	EBV EEUU EFS EpSSG ERMS EWS	<i>Epstein-Barr virus</i> o virus Epstein-Barr Estados Unidos <i>Event-free survival</i> o supervivencia libre de eventos <i>European paediatric Sarcomas Study Group</i> Rabdomiosarcoma embrionario Sarcoma de Ewing
F	FBS FDA FELASA FFPE	<i>Fetal Bovine Serum</i> <i>Food and Drug Administration</i> <i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i> <i>Formalin-fixed, paraffin-embedded</i> o tejido fijado con formalina e incrustado en parafina
G	GCT GEMM GIST	Tumor de células germinales <i>Genetically engineered mouse models</i> Tumor del estroma gastrointestinal
H	HB HCC HCV HE HPV HRP	Hepatoblastoma Hepatocarcinoma <i>Hepatitis C Virus</i> o virus de la hepatitis C Hematoxilina y Eosina <i>Human papilloma virus</i> o virus del papiloma humano <i>Horseradish Peroxidase-labeled Antibodies</i>
I	IC ICCC ICI ICO IDIBELL IDRF IHQ IJC INDEL	Intervalo de confianza <i>International Classification of Childhood Cancer</i> <i>Immune checkpoint inhibitors</i> Instituto Catalán de Oncología Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge <i>Image Defined Risk Factors</i> Inmunohistoquímica Institut Josep Carreras Inserción o delección
J		
K		
L		
M	MAGIC	<i>Malignant Germ Cell International Consortium</i>

	MPNST	<i>Malignant peripheral nerve sheath tumor</i> o Tumor maligno de la vaina del nervio periférico
	MRT	<i>Malignant rhabdoid tumor</i> o Tumor rabdoide maligno
N	NB NET NGS NRSTS NSCLC NSG mice	Neuroblastoma Tumor neuroendocrino <i>Next-generation sequencing</i> o secuenciación de nueva generación <i>Non-rhabdomyosarcomas soft tissue sarcomas</i> o sarcomas de partes blandas no rhabdomiosarcomas <i>Non-small-cell lung cancer</i> <i>NOD scid gamma mouse</i>
Ñ		
O	OS OS	<i>Overall survival</i> o supervivencia global Osteosarcoma
P	PBMC PDX PDOX PerMed PFS PHITT	Células mononucleares de sangre periférica <i>Patient Derived Xenografts</i> o xenoinjertos derivados de paciente <i>Patient Derived Orthotopic Xenografts</i> o xenoinjertos ortotópico derivados de paciente <i>Personalized Medicine</i> o Medicina Personalizada <i>Progress free survival</i> o supervivencia libre de progresión <i>Paediatric Hepatic International Tumour Trial</i>
Q		
R	RB REDCAP RETI RMN RMS RNASeq RT RT-PCR RTSG	Retinoblastoma <i>Research Electronic Data Capture</i> Registro Español de Tumores Infantiles Resonancia magnética nuclear Rabdomiosarcomas <i>RNA sequencing</i> o secuenciación de ARN Radioterapia Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción <i>Renal Tumors Study Group</i>
S	SCID SG SLE SIOP SIOPEN SIOPEL SNC SNV SMT SPF STS	<i>Severe combined immunodeficient mice</i> Supervivencia global (equivalente a OS) Supervivencia libre de eventos (equivalente a EFS) <i>International Society of Paediatric Oncohematology</i> o Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica <i>International Society of Paediatric Oncohematology European Neuroblastoma Research Network</i> <i>International Society of Paediatric Oncohematology European Liver Tumors Research Network</i> Sistema Nervioso Central <i>Single nucleotide variant</i> o variante de un solo nucleótido <i>Single mouse testing</i> , Pruebas en un único ratón <i>Specific Pathogen Free</i> o libre de patógenos específicos <i>Soft tissue sarcoma</i>
T	TAC TASPE TC TMB	Tomografía axial computerizada Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos Tronco celiaco Carga mutacional tumoral
U		
V	VHIO VHIR	Instituto de Oncología Vall d'Hebrón Instituto de Investigación Vall d'Hebrón
W	WES WGS WT	<i>Whole exome sequencing</i> o secuenciación de exoma completo <i>Whole genome sequencing</i> o secuenciación de genoma completo Nefroblastoma
X		
Y		
Z		

0. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

0.1 Investigación translacional en cirugía pediátrica

A lo largo de la historia, algunos de los grandes avances de la medicina se han producido por la interacción entre la cirugía y la investigación básica. Sin embargo, en uno de sus editoriales de 2017, la revista *Nature* puso de relieve la necesidad de una mayor implicación de los cirujanos en la investigación básica moderna (*More surgeons must start doing basic science, James L. Stanfield*) (1). El editorial alerta del preocupante alejamiento de los especialistas quirúrgicos de la investigación, lo que se traduce, por ejemplo, en un menor número de publicaciones y un menor número de becas de investigación concedidas. El origen de este problema es multifactorial, destacando la creciente sobrecarga asistencial y administrativa (mayor en las especialidades quirúrgicas que en las médicas), la falta de motivación y la ausencia de soporte por parte de las instituciones.

Este grave problema no es ajeno a la investigación en cirugía pediátrica y más en concreto, en la cirugía oncológica pediátrica, uno de los pilares del tratamiento multimodal del cáncer del niño y el adolescente. Esta cuestión adquiere particular relevancia con la implantación de la medicina de precisión en cáncer pediátrico, por su capacidad de impactar a corto y a largo plazo en los tratamientos oncológicos, y cuyos avances recientes han demostrado que puede llegar a modificar los principios del tratamiento quirúrgico clásico de algunos de los tumores.

En junio del 2019, el Comité del Cáncer de la Sociedad Americana de Cirujanos Pediátricos (*American Pediatric Surgeons' Association, APSA*), realizó un llamamiento para lograr una mayor implicación en este campo por parte de los especialistas en cirugía pediátrica (2). En los últimos años, el estudio genético y molecular de los tumores sólidos pediátricos ha logrado identificar nuevas dianas terapéuticas que han supuesto un cambio radical en el planteamiento terapéutico en el caso de algunos tipos tumorales (3), permitiendo limitar e incluso evitar por completo resecciones quirúrgicas agresivas (como, por ejemplo, en algunos casos de fibrosarcoma infantil o de tumores miofibroblásticos

INTRODUCCIÓN

inflamatorios) o en otros casos, mejorar el pronóstico o alargar la supervivencia de los pacientes.

A pesar de los importantes avances logrados con la secuenciación de tumores pediátricos, identificando sus alteraciones genéticas y epigenéticas, desafortunadamente estos hallazgos no se han traducido en un impacto clínico significativo para la mayoría de los tumores (4). Una de las principales causas de este pobre impacto clínico se atribuye a la escasez de modelos preclínicos que reproduzcan de manera fidedigna el comportamiento de la enfermedad y que permitan evaluar tanto la eficacia como la toxicidad de los nuevos tratamientos, y trasladarlos con seguridad a la práctica asistencial. En este escenario, los cirujanos pediátricos, gracias a nuestra formación, acceso al tejido tumoral y habilidades técnicas, nos encontramos en una posición privilegiada para colaborar en su desarrollo y generar así estas valiosas herramientas preclínicas.

0.2. El cáncer pediátrico: Etiopatogenia, epidemiología, tratamientos actuales y supervivencia

Etiopatogenia

Existen enormes diferencias entre el cáncer pediátrico y el cáncer del adulto en lo relativo a su origen celular, epidemiología, complejidad genética, mutaciones "driver" y alteraciones mutacionales subyacentes; por tanto, los hallazgos en la investigación en cáncer del adulto no son extrapolables, en términos generales, al cáncer del niño y el adolescente (5).

Los tumores sólidos pediátricos pueden proceder de cualquier estirpe celular: endodérmica, ectodérmica o mesodérmica (6). El cáncer pediátrico difiere sustancialmente en su etiología del cáncer del adulto (4). Así, mientras que en este último la exposición a diversos agentes externos (hábitos, alimentación, carcinógenos ambientales) juega un papel fundamental por la acumulación estocástica de mutaciones oncogénicas a lo largo del tiempo, en el caso de los pacientes con cánceres pediátricos son las alteraciones que se producen durante el desarrollo las que están detrás de su génesis (5). Estas alteraciones

INTRODUCCIÓN

genéticas congénitas pueden afectar a las líneas somáticas o germinales (7). Existe una interacción entre determinada predisposición genética (heredada o constitucional) y diferentes factores, como son las alteraciones en los procesos mutacionales del desarrollo y la exposición a factores que los regulan (ambientales, etc.). Se estima que al menos en el 10% de los tumores pediátricos existe algún síndrome de predisposición genética subyacente (8), un porcentaje superior al 8% que se da en el cáncer del adulto.

Alex Kentsis (7) resume de manera muy concisa los diversos mecanismos relacionados con la génesis del cáncer del niño y el adolescente, que a veces se producen de manera simultánea en un mismo paciente:

1.- Predisposición constitucional al cáncer: Se refiere a la presencia de mutaciones en genes supresores de tumores y oncogenes debidas a la herencia familiar, a la aparición de mutaciones germinales *de novo*, o la presencia de mosaicismos genéticos. La actividad de los genes implicados se resume en 3 categorías principales: i) regulación de la mitosis celular (ej. *RB1*, *APC*, *TP53*), ii) reparación de daños en el ADN (ej. *BRCA1* y 2, *MLH 1* y 2) y iii) señalización del desarrollo y expresión genómica (ej. *RET*, *ALK*, *PTEN*, *NF1* y 2, *WT1*, *DICER1*, *SMARCB1*, *VHL*).

2.- Exposición ambiental: La exposición a diversos factores ambientales (entre los que se incluyen los propios agentes quimioterápicos y las radiaciones, frecuentemente vinculados al desarrollo de segundos tumores), supone un mayor riesgo de desarrollo de tumores en individuos con predisposición genética, pero también de tumores *de novo* en pacientes sin predisposición (ej. carcinoma diferenciado de tiroides). En la mayoría de los casos, estos factores interfieren en la reparación del ADN o en el ciclo celular.

3.- Infecciones oncogénicas: Diversos agentes infecciosos se han asociado con el desarrollo de tumores. Por ejemplo, el virus del papiloma humano (HPV) inhibe la función del *TP53* y otros genes supresores de tumores, asociándose al desarrollo de carcinoma de cérvix y de orofaringe. El virus Epstein-Barr (EBV) se relaciona con el desarrollo de linfomas y carcinoma de nasofaringe, el virus de la hepatitis C (HCV) con el hepatocarcinoma, etc. Es posible que, en el ámbito de la epidemiología (aún en desarrollo), se identifiquen en los próximos años nuevos factores subyacentes asociados con el desarrollo de tumores.

INTRODUCCIÓN

4.- Tumorogénesis del desarrollo y mutaciones endógenas: Es la causa subyacente en la gran mayoría de los cánceres de la infancia (5). Se produce por dos mecanismos no excluyentes: (a) la presencia de una población de progenitores celulares que presenta una capacidad alterada de reparación del ADN, y/o (b) la activación de nucleasas de ADN endógenas u otros mecanismos biológicos que producen mutaciones durante momentos concretos del desarrollo. Un ejemplo son las alteraciones en las ADN transposasas: el aumento de función en *RAG1/2* y las enzimas AID se asocian con el desarrollo de leucemias y linfomas pediátricos, y lo mismo sucede con *PGBD5* en los meduloblastomas, neuroblastomas, ependimomas, sarcomas de Ewing y otros sarcomas, incluyendo los tumores rhabdoides. En este sentido, la identificación de otros genes mutados durante el desarrollo, mediante el estudio de las mutaciones somáticas de los tumores de los pacientes, ayudará a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en un futuro próximo.

Epidemiología

El cáncer pediátrico es una enfermedad minoritaria, que constituye menos de un 2% del total de los cánceres diagnosticados a nivel mundial (aunque esta incidencia es variable según la pirámide poblacional de cada país). Sin embargo, su incidencia está aumentando globalmente de manera lenta pero paulatina, por causas no bien definidas (9).

A pesar de su baja frecuencia relativa, el cáncer sigue siendo la primera causa de muerte por enfermedad en niños mayores de 1 año y adolescentes en los países desarrollados. Por este motivo, el cáncer pediátrico es un importante problema social y de salud pública en Europa. Según datos de la SIOP (Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica) y la Comisión Europea (10), cada año en Europa más de 35.000 niños y jóvenes son diagnosticados de cáncer y más de 6.000 pacientes jóvenes mueren de cáncer. Anualmente, en España se diagnostican más de 1.800 nuevos casos de cáncer en niños y adolescentes según el Registro Español de Tumores Infantiles (RETI) (<https://www.uv.es/rnti/>) y más de 350 pacientes experimentan recaídas.

En el año 2025, se estima que habrá en Europa casi medio millón de supervivientes de cáncer infantil. Dos tercios de estos supervivientes presentarán problemas de salud y

INTRODUCCIÓN

psicosociales a largo plazo debidos tanto a su enfermedad como a consecuencia de su tratamiento, que pueden ser graves y afectar su vida diaria.

Por sus evidentes particularidades, el cáncer pediátrico tiene su propia clasificación (*International Classification of Childhood Cancer*, ICCC). Su versión más reciente es la de 2005 (ICCC-3) (11), e incluye tanto los tumores malignos como los benignos.

De acuerdo al estudio *International Incidence of Childhood Cancer* (IICC-3) (12) publicado en 2017, la leucemia continúa siendo el tumor más frecuente en niños, seguido por los tumores del sistema nervioso central y los linfomas, aunque existen algunas diferencias por áreas geográficas (13). El tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia es el neuroblastoma. Casi un 50% de los casos de neuroblastoma se clasifican como de alto riesgo, lo que se traduce en una supervivencia a 5 años inferior al 50%. El neuroblastoma es el causante del 15% de las muertes por cáncer en niños (14).

El siguiente en frecuencia es el nefroblastoma, seguido de los sarcomas óseos (osteosarcoma y sarcoma de Ewing). En los adolescentes (a partir de los 15 años), estos porcentajes son diferentes, siendo los tumores sólidos más frecuentes, por este orden, los tiroideos, los tumores germinales gonadales, y los sarcomas óseos (15).

El resto de los tumores tiene una baja incidencia. Destacaremos el hepatoblastoma, que constituye el cáncer hepático más frecuente en niños, seguido por el hepatocarcinoma. La incidencia de hepatocarcinoma aumenta en paralelo a la edad y se relaciona en algunos pacientes con hepatopatías de diversa naturaleza, como las hepatitis víricas. Dentro de los sarcomas de partes blandas, el rhabdomiosarcoma es el más frecuente en la edad pediátrica, representando casi la mitad de los casos. La otra mitad la conforman los llamados "sarcomas de partes blandas no rhabdomiosarcomas" (en inglés, *non-rhabdomyosarcomas soft tissue sarcomas* o NRSTS) que bajo esa denominación engloban un conjunto de más de 50 enfermedades muy diferentes entre sí, algunas de ellas típicas del paciente pediátrico (fibrosarcoma, tumor rabdoide, blastoma pleuropulmonar, etc), otras más habituales en el adolescente (sarcoma sinovial, sarcoma epitelioide, etc) y otras típicas del paciente adulto.

INTRODUCCIÓN

Tratamientos actuales: Papel de la cirugía pediátrica

El tratamiento de la gran mayoría de los tumores sólidos pediátricos consiste en esquemas multimodales (quimioterapia, cirugía y radioterapia, a las que se suman en algunos casos la inmunoterapia u otras modalidades terapéuticas), ajustados a los grupos de riesgo de cada tipo tumoral. Estos tipos tumorales tradicionalmente se han definido en base a los análisis histológicos e inmunohistoquímicos. La realización de amplios estudios internacionales multicéntricos ha permitido diseñar protocolos terapéuticos para los tumores más frecuentes del niño y adolescente. Prueba de ello son los distintos estudios propuestos por grupos internacionales, como la SIOP o el COG (Childrens' Oncology Group), que a través de ensayos clínicos sucesivos han perfilado esquemas de tratamiento para el neuroblastoma (ej. SIOPEN), el nefroblastoma (ej. SIOP-RTSG) o el hepatoblastoma (ej. SIOPEL, PHITT), por poner algunos ejemplos. Por el contrario, para los tumores más infrecuentes, y que constituyen un importante porcentaje de pacientes, no se dispone de protocolos estandarizados, y en el mejor de los casos, se tratan conforme a guías de práctica clínica consensuadas por grupos de expertos.

De forma conjunta, esta estrategia ha conducido a unas buenas tasas de curación global en el cáncer pediátrico en los países desarrollados, pero a costa de importantes secuelas para los pacientes, en parte originadas por los propios esquemas de tratamiento (como, por ejemplo, cardiotoxicidad, desarrollo de segundos tumores o infertilidad). En la actualidad, la mayoría de los estudios colaborativos intentan establecer un equilibrio entre beneficio terapéutico y toxicidad, por lo que no sólo aspiran a mejorar las actuales tasas de curación, sino a reducir las secuelas que sufren los pacientes a medio y largo plazo. Para alcanzar este objetivo es imprescindible la máxima personalización de los tratamientos (en inglés, "*tailoring*" haciendo referencia al diseño de tratamientos a medida), optimizando la clasificación de los grupos de riesgo (por ejemplo, identificando marcadores moleculares pronósticos que ayuden en la estratificación de los pacientes) y realizando estudios moleculares del tejido tumoral (cuya presencia puede ser imprescindible, por ejemplo, para poder incluir al paciente en determinados ensayos). Este planteamiento tiene como objetivo maximizar las opciones terapéuticas del paciente, evitando tratamientos

INTRODUCCIÓN

innecesarios y con posibles secuelas, o intensificando el tratamiento en los casos que así lo precisen.

La mayoría de estos protocolos internacionales incluyen una serie de recomendaciones o guías quirúrgicas, basadas en la evidencia científica y consensuadas por grupos de expertos, que permiten estandarizar los procedimientos quirúrgicos (16). El objeto de estas guías es asegurar unas mayores tasas de curación con una menor morbilidad, y, además, al reducir la presencia de sesgos en relación con el acto quirúrgico, para facilitar la realización de estudios comparativos. Un ejemplo clásico de la importancia de estandarizar los procedimientos oncológicos es la descripción de los principios quirúrgicos de la cirugía del nefroblastoma, establecidos por William E. Ladd y Robert E. Gross en 1953 (17) y consistentes en la realización de una laparotomía transversa amplia y revisión de la cavidad abdominal, abordaje transperitoneal de los vasos renales y ligadura precoz de los mismos, procediendo a continuación a la exéresis del tumor junto con la grasa perirrenal, evitando la rotura de la cápsula renal y la diseminación por vía linfática. Estas recomendaciones condujeron a una drástica reducción de la mortalidad intraoperatoria, sumamente elevada en aquella época, que junto a la introducción del tratamiento radioterápico y, posteriormente, quimioterápico por parte de Sidney Farber, permitieron pasar de una supervivencia del 30% a los dos años en 1940 al 89% en 1966.

Algunas prácticas quirúrgicas también han sido objeto de investigación por parte de los estudios internacionales pediátricos, aunque raramente de manera aleatorizada.

La cirugía juega un papel crucial dentro del tratamiento de los tumores sólidos y como tratamiento de soporte para las complicaciones y necesidades basales del niño y adolescente con cáncer. La cirugía oncológica ha emergido con fuerza en los últimos años como una subespecialidad de la cirugía pediátrica que requiere de la adquisición de un marco específico de conocimientos y habilidades que va más allá de la formación estándar de la especialidad (18). En España, la especialidad de cirugía pediátrica asume el tratamiento de todos los tumores sólidos pediátricos viscerales, independientemente de su localización, así como de los tumores de la pared abdominal y torácica. Además, dentro

INTRODUCCIÓN

del tratamiento del cáncer pediátrico, se incluyen las técnicas de preservación de la fertilidad, un aspecto particularmente sensible en pacientes en edades tan jóvenes.

La mayoría de los tumores sólidos pediátricos requieren tratamiento quirúrgico para lograr su curación, siendo paradigmáticos, por ejemplo, los hepatoblastomas o los nefroblastomas, en los que la cirugía no puede ser sustituida por otros tratamientos (como por ejemplo la radioterapia) y la curación no es posible sin lograr una resección completa de la lesión. Tal es la importancia de la exéresis que, en ambos casos, de no ser factible la resección tumoral por otros medios, el trasplante de órgano sólido inmediato (en el caso del hepatoblastoma) o diferido (en el caso del nefroblastoma bilateral) es a veces la única opción terapéutica. La calidad de la resección quirúrgica, la posibilidad de resecar por completo los tumores, el estadioje locoregional quirúrgico (muestreo ganglionar y biopsia de áreas sospechosas) y las complicaciones intraoperatorias (con especial relevancia de la rotura tumoral en determinadas histologías) determinan finalmente el estadioje tumoral, los grupos de riesgo, la intensidad del tratamiento y el pronóstico en la mayoría de los tumores sólidos pediátricos, independientemente de su localización.

El tratamiento quirúrgico de los tumores pediátricos incluye en ocasiones tumores considerados más propios del adulto (carcinoma suprarrenal, carcinoma de tiroides, hepatocarcinoma, etc.). El tratamiento quirúrgico en estos casos difiere en muchos aspectos del estándar en pacientes adultos y debe ajustarse al paciente pediátrico ya que, aun tratándose del mismo tipo tumoral, la biología tumoral suele ser bastante diferente. Mención especial merecen los denominados "AYA" (del inglés, *adolescents and young adults*, adolescentes y jóvenes adultos) quienes, presentando unas características más cercanas al paciente pediátrico, a menudo son tratados de acuerdo con estándares del adulto. Este hecho se ha demostrado que se traduce en unas menores tasas de supervivencia en distintos tipos tumorales, como por ejemplo los sarcomas de partes blandas (19).

A continuación, se muestra un resumen de algunos de los procedimientos quirúrgicos de resección tumoral más habituales en cirugía oncológica pediátrica, en relación con cada

INTRODUCCIÓN

tipo tumoral y de acuerdo con las guías vigentes (la gran mayoría, de los grupos SIOP). Todas las imágenes que ilustran las técnicas corresponden a casos intervenidos por nuestro equipo, y para muchos de ellos se ha intentado generar PDOX, objetivo de esta tesis:

1. *Neuroblastoma y otros tumores neurogénicos:* Los neuroblastomas que se producen fuera del sistema nervioso central se originan en las glándulas suprarrenales y/o en cualquier zona del sistema nervioso simpático, lo que incluye el tórax y el cuello. Muy habitualmente el tumor invade los ganglios loco-regionales. Con mucha frecuencia, los tumores rodean parcial o totalmente las estructuras vasculares y nerviosas, constituyendo cirugías de muy alta complejidad y elevado riesgo quirúrgico.

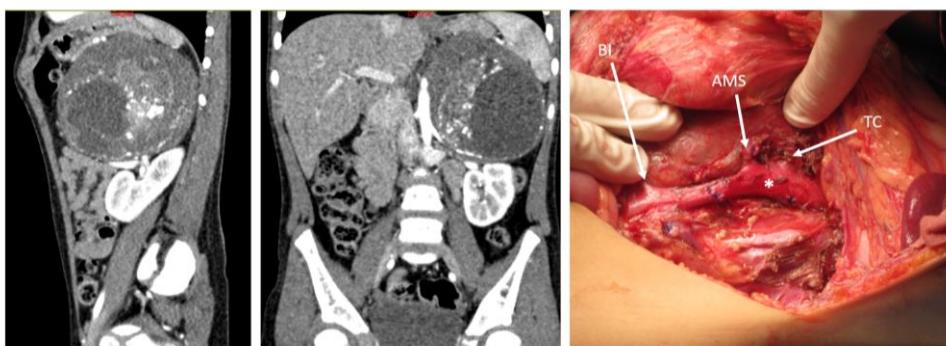


Figura 1. Paciente con neuroblastoma de alto riesgo adrenal izquierdo con invasión del hilio renal que rodea parcialmente la aorta abdominal suprarrenal y los vasos renales izquierdos (L2). Imágenes de AngioTAC abdominal, corte sagital y coronal tras quimioterapia neoadyuvante. Tratamiento quirúrgico. Se muestra la aorta abdominal y el origen del tronco celíaco y la arteria mesentérica superior, así como la bifurcación ilíaca, una vez resecados el tumor y las adenopatías junto con el riñón izquierdo. BI (bifurcación iliaca), AMS (arteria mesentérica superior), TC (tronco celiaco), * (aorta)

Es habitual, por ejemplo, que el tumor englobe por completo (en inglés, "*encasement*") los hilios vasculares renales, al origen del tronco celíaco o de la arteria mesentérica superior y sus ramas, o que esté rodeando la vena cava en su totalidad. En algunos casos los tumores pueden invadir el canal medular o desplazar la vía aérea. Por este motivo, actualmente, los neuroblastomas se clasifican al diagnóstico en función de la presencia o ausencia de los 20 factores de riesgo por imagen (denominados IDRF o *Image Defined Risk Factors*), los cuales se correlacionan con la morbimortalidad quirúrgica, así como con resecciones incompletas. Fueron definidos por Monclair et. al en 2009 y son la

INTRODUCCIÓN

base del estadio INRG (International Neuroblastoma Risk Group), empleado por todos los grupos internacionales. Su ausencia, en pacientes con enfermedad localizada (L1) es indicativa de cirugía directa (*upfront surgery*). La presencia al diagnóstico de dichos factores (L2) o de enfermedad metastásica (M), aconseja la administración de quimioterapia neoadyuvante, con el objetivo de reducir el riesgo quirúrgico y/o de frenar la progresión de la enfermedad. El protocolo europeo LINES del SIOPEN contempla la observación inicial (planteándose el tratamiento en caso de crecimiento o progresión) en los neuroblastomas congénitos (diagnóstico en menores de 3 meses) con enfermedad localizada de menos de 5cm, con biología favorable y sin síntomas de riesgo vital, en los neuroblastomas de biología favorable, L2, sin síntomas de riesgo vital y en pacientes menores de 18 meses, y en el grupo de pacientes "MS", formado por los pacientes menores de 12 meses con enfermedad metastásica (exceptuando la afectación ósea, pulmonar, pleural o del sistema nervioso central), con biología favorable y sin síntomas de riesgo vital.

Los subtipos malignos (neuroblastoma, ganglioneuroblastoma) son tributarios de tratamiento quimioterápico, mientras que los benignos (ganglioneuroma) no responden al mismo, por lo que se plantea la viabilidad de la resección completa sin secuelas, independientemente de la presencia de los citados IDRF.

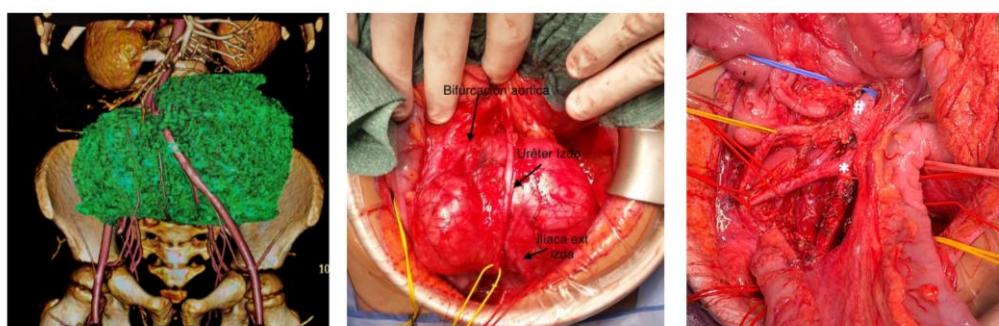


Figura 2. Paciente con ganglioneuroma pélvico, L2. Reconstrucción 3D a partir de AngioTAC. El tumor engloba parcialmente los vasos arteriales y venosos ilíacos, así como la bifurcación aórtica y los uréteres. Cirugía sin neoadyuvancia previa. Imagen intraoperatoria con el tumor y las estructuras anatómicas. Imagen tras resección completa.

Leyenda: # (vena cava), * (aorta)

La resección quirúrgica completa es un factor determinante en los tumores neurogénicos de riesgo intermedio y bajo (con la excepción de las masas

INTRODUCCIÓN

congénitas, que pueden involucionar), pero su papel en los neuroblastomas de alto riesgo genera controversia, ya que en estos casos existen otros múltiples factores biológicos que repercuten en la supervivencia. La resección fraccionada de la masa está permitida, sin afectar al pronóstico final. Se recomienda alcanzar una resección superior al 90% de la masa siempre que ello no suponga un riesgo vital o gravemente mutilante para el paciente. Durante la cirugía es preciso realizar un balance cuidadoso entre el grado de resección y el riesgo para el paciente, estando ampliamente descritas graves complicaciones quirúrgicas (isquemia intestinal, hemorragia masiva por lesión de los grandes vasos) e incluso el fallecimiento del paciente durante la intervención o en el postoperatorio inmediato.

En el caso de tumores pequeños y en ausencia de riesgo vascular, se puede plantear el abordaje mínimamente invasivo (20).

2. *Nefroblastoma y otros tumores renales:* La cirugía del nefroblastoma y el resto de los tumores renales, independientemente de su acceso (mediante cirugía abierta o mínimamente invasiva), debe garantizar que no se produzca rotura tumoral, que se reseguen todas las lesiones macroscópicas con márgenes adecuados y que se haga un adecuado muestreo ganglionar. Con el objetivo de facilitar esta tarea, el RTSG (*Renal Tumors Study Group*) de la SIOP (a diferencia de otros grupos internacionales) emplea una estrategia de tratamiento quimioterápico neoadyuvante previo a la cirugía, a partir de un diagnóstico basado únicamente en las pruebas de imagen (permitiendo la biopsia Trucut en casos seleccionados, y con un calibre máximo de 16G; la biopsia abierta se considera una rotura tumoral e inmediatamente sitúa el tumor en un estadío III). En caso de producirse una rotura tumoral significativa o de dejar algún resto tumoral (por ejemplo, un trombo tumoral), es necesario intensificar el tratamiento quimioterápico y realizar radioterapia local (con las secuelas que esta última conlleva en niños pequeños). La presencia de trombos vasculares, habitualmente de la vena renal y con extensión hacia la vena cava (pudiendo llegar a la aurícula), hace que estas cirugías sean ocasionalmente

INTRODUCCIÓN

muy complejas, llegando a requerir de cavotomías asistidas o no con circulación extracorpórea. En el caso de los carcinomas renales y de los sarcomas (sarcoma de células claras, tumor rhabdoide teratoide, otros) la rotura conlleva además un aumento muy significativo de las posibilidades de recaída local y a distancia. Por lo general, la linfadenectomía retroperitoneal radical solo se indica en el caso de carcinomas y sarcomas, aunque es foco de debate, mientras que en el nefroblastoma es necesario un muestreo ganglionar sistematizado de al menos 7 ganglios. El último protocolo europeo vigente, denominado RTSG-Umbrella 2016, permite realizar nefrectomías parciales y nefrectomías mínimamente invasivas en casos muy seleccionados (21), y nunca combinando ambas técnicas, ya que la rotura tumoral conlleva la necesidad de añadir radioterapia local, particularmente tóxica en pacientes pediátricos.

Mención aparte merecen los casos de tumores bilaterales, habitualmente nefroblastomas, en los cuales es imprescindible un tratamiento quirúrgico por parte de equipos expertos, para preservar el máximo volumen de nefronas que eviten un fallo renal (mediante nefrectomías parciales e incluso, enucleaciones), sin producir una rotura tumoral. Como último recurso, en los casos más graves e infrecuentes, se contempla la posibilidad de nefrectomía radical bilateral con autotrasplante renal o bien trasplante renal diferido tras completar dos años libre de enfermedad, aunque la morbitmortalidad de estos casos es muy importante.

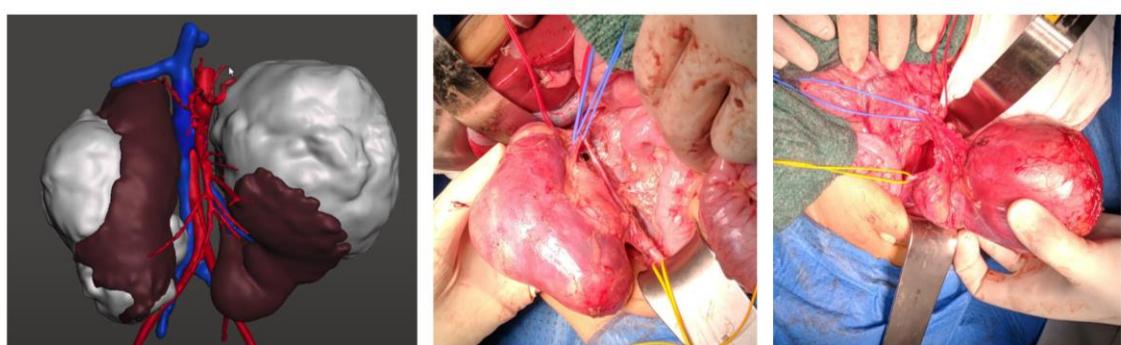


Figura 3. Paciente afecto de nefroblastomas bilaterales con escasa respuesta a la quimioterapia. Reconstrucción 3D a partir de AngioTAC. En gris, las áreas tumorales. Imágenes intraoperatorias del riñón derecho y del riñón izquierdo, una vez movilizados. Se logró resecar completamente las masas, preservando ambos riñones.

INTRODUCCIÓN

3. *Hepatoblastoma y otros tumores hepáticos malignos:* El tratamiento de los tumores hepáticos malignos pediátricos pasa siempre por una resección completa con márgenes, lo que se alcanza, bien mediante la realización de resecciones anatómicas, o mediante un trasplante hepático. Actualmente, el protocolo internacional PHITT (*Paediatric International Tumour Trial*) determina la aproximación quirúrgica, que en la mayoría de los hepatoblastomas se lleva a cabo tras administrar quimioterapia neoadyuvante. En algunos casos seleccionados de hepatoblastoma, y en los hepatocarcinomas localizados, se recomienda la cirugía de entrada (lo que puede incluir el trasplante hepático). Los tumores se clasifican de acuerdo a la clasificación radiológica al diagnóstico PRETEXT, actualizada en 2017 (22), en función de la extensión tumoral (dividiendo el hígado en 4 secciones y determinando cuántas es necesario resecar, lo que define los grupos I, II, III y IV) y según varias anotaciones (afectación vascular de la vena cava, la vena porta o las suprahepáticas, afectación extrahepática en contigüidad, afectación del lóbulo caudado, multifocalidad, rotura, metástasis linfáticas y metástasis a distancia). En los casos PRETEXT III más complejos y IV (10-20% de los casos) es necesaria una evaluación precoz para poder realizar un trasplante hepático en el caso de no hacerse resecable el tumor tras la neoadyuvancia. En algunos casos, pueden hacerse resecciones extremas con o sin reconstrucción vascular; no obstante, estas deben hacerse en centros con trasplante hepático pediátrico, por el riesgo de complicaciones o de insuficiencia hepática. La indicación de resección extrema frente a trasplante debe realizarse con enorme cuidado, ya que el trasplante hepático de rescate (en recaídas, frecuentemente debidas a resecciones quirúrgicas incompletas o marginales) tiene unos resultados de supervivencia muy pobres (82% para el trasplante de entrada frente al 30% en el rescate) (23).

INTRODUCCIÓN

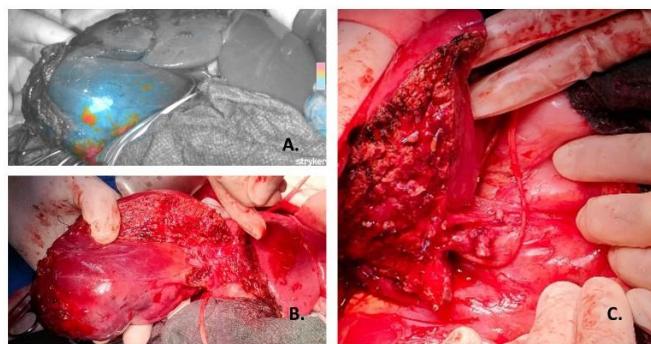


Figura 4. Hepatoblastoma PRETEXT II en paciente de 3 años con trombo en la vena cava al debut y afectación del lóbulo caudado. A. Imagen intraoperatoria. Tumor con captación de fluorescencia con verde de indocianina (en azul). B. Hepatectomía derecha anatómica. C. Remanente hepático.

4. *Tumores ováricos:* Los tumores malignos ováricos pediátricos primarios son poco frecuentes, en su gran mayoría son de origen germinal (por tanto, muy quimiosensibles), y presentan mucho mejor pronóstico que los tumores de la mujer adulta, mayoritariamente epiteliales. No obstante, existen también tumores malignos de los cordones sexuales (como los tumores juveniles de células de la granulosa), tumores de células de Sertoli/Leydig y tumores malignos epiteliales, así como otros subtipos extremadamente infrecuentes. El tratamiento quirúrgico en niñas y adolescentes requiere menor agresividad quirúrgica que en los tumores de tipo adulto, y suele limitarse a la salpingooforectomía del ovario afecto, con resección de todas las lesiones macroscópicamente visibles, de acuerdo con las recomendaciones del COG y del MAGIC (*Malignant Germ Cell International Consortium*). En tumores localizados o de pequeño tamaño (aun siendo metastásicos), la cirugía se realiza inmediatamente tras el diagnóstico (que incluye pruebas de imagen y marcadores tumorales); en casos localmente avanzados, se opta por realizar una biopsia percutánea e iniciar tratamiento neoadyuvante, con posterior exéresis tumoral, de los posibles implantes y de las adenopatías patológicas. La intervención debe, además, completar un adecuado estadiaje intraoperatorio (citología peritoneal, biopsia de lesiones sospechosas y adenopatías patológicas, exploración de vísceras abdominales y de superficies peritoneales). Las cirugías mutilantes y agresivas (salpingooforectomía bilateral, histerectomía,

INTRODUCCIÓN

citorreducción) se reservan para las neoplasias malignas epiteliales u otras histologías muy agresivas, y en casos seleccionados de recaídas tumorales.

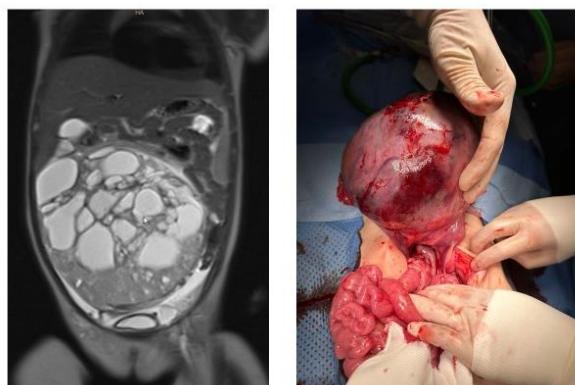


Figura 5. Tumor ovárico de células de la granulosa juvenil en lactante de 13 meses. Imagen de resonancia magnética e imagen intraoperatoria.

5. *Tumores testiculares:* Los tumores pediátricos testiculares son raros, menos de un 2% de los casos de cáncer infantil en varones prepuberales, con una incidencia algo mayor en adolescentes postpuberales. En niños prepúberes, el 80% de los casos corresponde a tumores germinales, y dentro de los tumores no germinales, predominan los tumores estromales de los cordones sexuales. La mayoría de los tumores prepuberales son benignos, mientras que en adolescentes sucede a la inversa. Incluiremos también los tumores paratesticulares, esencialmente el rabdomiosarcoma, por tener un planteamiento quirúrgico similar. Centrándonos en los tumores malignos, cuando las pruebas de imagen o los marcadores tumorales sugieren una neoplasia testicular o paratesticular maligna, si esta masa es de entrada resecable sin rotura, las guías internacionales recomiendan evitar las biopsias, y realizar una orquiectomía inguinal radical (evitando el abordaje escrotal) con un clampaje precoz del cordón espermático. De lo contrario, se recomienda obtener una biopsia *Trucut* e iniciar neoadyuvancia. La linfadenectomía retroperitoneal, a diferencia de los pacientes adultos, no está recomendada en los pacientes prepúberales y se reserva sólo en casos seleccionados (AFP persistentemente elevada en ausencia de lesiones por pruebas de imagen, en afectación ganglionar evidente).

INTRODUCCIÓN

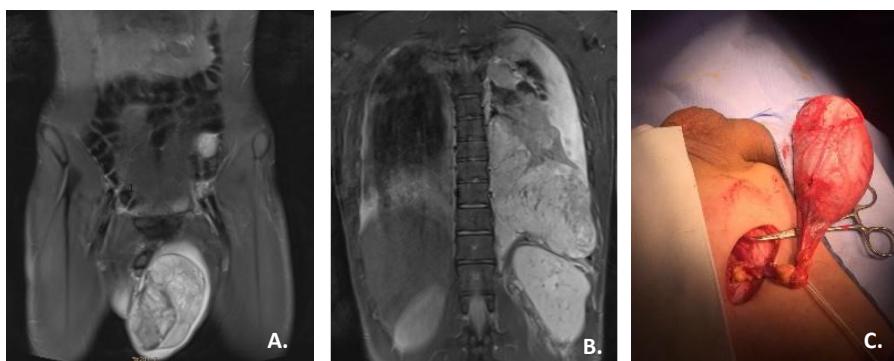


Figura 6. Tumor germinal testicular del seno embrionario, en paciente postpuberal. A. Resonancia magnética, corte coronal. Gran masa testicular. B. Metástasis pleurales masivas y pulmonares. C. Imagen de la cirugía del tumor primario (orquiectomía radical del teste derecho, abordaje inguinal) tras quimioterapia neoadyuvante.

6. *Sarcomas de partes blandas*: Resumir la cirugía de los sarcomas de partes blandas en unas líneas es tarea imposible, dado agrupa un gran número de diagnósticos diferentes, en áreas anatómicas muy diversas y con respuestas a los tratamientos adyuvantes muy dispares. Se expone a continuación, de forma muy resumida, la cirugía de los sarcomas pediátricos:
 - a. Rabdomiosarcomas: La mayoría de los rabdomiosarcomas (RMS) pediátricos se resecan tras administrar quimioterapia neoadyuvante, dado que suelen alcanzar un gran tamaño y es prioritario evitar su rotura, así como tratar de obtener unos márgenes quirúrgicos negativos. Además, debe realizarse un estadiaje ganglionar quirúrgico, que en determinados tumores (RMS paratesticulares en niños mayores de 10 años, RMS en extremidades). El tratamiento quirúrgico ha de contemplar las técnicas reconstructivas necesarias, y planificarlas adecuadamente en el marco del tratamiento multimodal. En niños pequeños se localizan mayoritariamente en zonas genitourinarias o de cabeza y cuello, y en adolescentes, en extremidades, aunque pueden aparecer en cualquier área anatómica. La cirugía con márgenes R0 o R1 es el tratamiento local de elección, sola o combinada con radioterapia, cuando la exéresis es factible sin ocasionar mutilaciones. De lo contrario, se opta por la radioterapia exclusiva (en sus diversas modalidades).

INTRODUCCIÓN

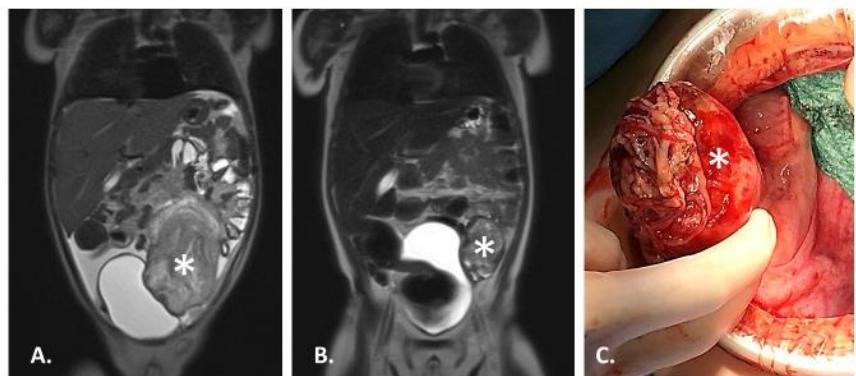


Figura 7. Rabdomiosarcoma embrionario de cúpula vesical en varón de 2 años. A. RMN al diagnóstico, gran masa pélvica (*) con origen mal definido. B. RMN tras completar quimioterapia neoadyuvante. C. Imagen intraoperatoria, tumor exofítico. Se realizó una cistectomía parcial.

- b. NRSTS: Bajo el término NRSTS se engloban más de 50 entidades, algunas de ellas típicas del niño, otras del adolescente y otras más propias del adulto. El tratamiento quirúrgico es variable, y su radicalidad depende de la quimiosensibilidad o radiosensibilidad de cada tipo tumoral, muy variables, y por norma general, escasas. El especialista quirúrgico debe conocer y actualizar las novedades terapéuticas que, en algunos tipos tumorales concretos, permiten evitar o limitar resecciones agresivas.
7. Sarcomas óseos: El papel de la cirugía pediátrica en los sarcomas óseos (los más comunes en niños, el osteosarcoma y el sarcoma de Ewing) se limita, en nuestro medio, al tratamiento de los tumores de la pared torácica (costales, esternales y claviculares). En la gran mayoría de los casos, el tratamiento quirúrgico corre a cargo de los equipos de cirugía ortopédica. Al plantear la cirugía, deberá tenerse en cuenta la quimiosensibilidad y la radiosensibilidad del tumor. La cirugía consiste (igual que en los sarcomas de partes blandas) en la exéresis en bloque de la tumoración, rodeada de tejido sano y con un adecuado margen de seguridad. Igualmente, deben plantearse las técnicas reconstructivas necesarias (en el caso del tórax, para recuperar tanto la estructura ósea como de partes blandas), para lo cual pueden emplearse tejidos autólogos (colgajos), hueso procedente de cadáver o prótesis de diferente índole. A pesar de los

INTRODUCCIÓN

avances en técnicas de salvamento de extremidad, la amputación puede llegar a ser necesaria en algunos pacientes.

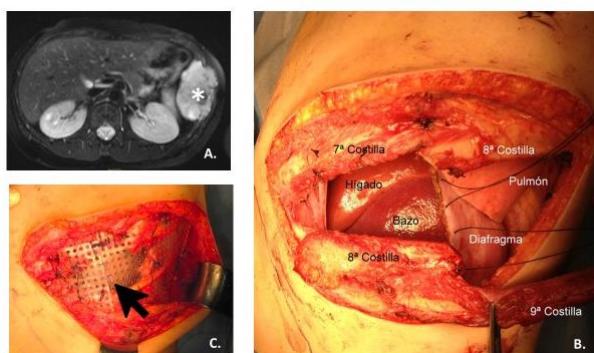


Figura 9. Sarcoma de Ewing originado en 9^a costilla, y afectando parcialmente a la 8^a costilla y al diafragma. A. RMN al diagnóstico. Masa (*) afectando a los últimos arcos costales, pared tóraco-abdominal anterior. B. Imagen intraoperatoria tras realizar resección en bloque con márgenes. Las estructuras anatómicas aparecen rotuladas. C. Imagen tras completar la reconstrucción de la pared ósea y del diafragma. Implante rígido reabsorbible (flecha) de poliéster reabsorbible de ácidos poli L-Láctico (82%) y PoliGlicólico (18%).

8. *Metástasis y otras lesiones pulmonares:* El tratamiento quirúrgico de las metástasis pulmonares, los tumores pulmonares y de la vía aérea (siendo estos dos últimos muy poco frecuentes) en pediatría depende del tipo tumoral y de su localización y extensión. El abordaje puede ser mediante cirugía abierta o toracoscópica, y el tipo de cirugía va desde la resección atípica (es decir, no anatómica) con márgenes hasta la lobectomía pulmonar o incluso la neumonectomía. En lesiones de pequeño tamaño y situadas en profundidad, es habitual emplear diversos métodos de marcaje percutáneo. En los tumores primarios pulmonares pueden ser necesarias técnicas de reconstrucción de la vía aérea (por ejemplo, en las resecciones lobares en manguito), muestreo ganglionar (dependiendo del tipo tumoral) o pleurectomías totales o parciales.
9. *Carcinoma de tiroides:* El carcinoma de tiroides, es un tumor raro en pediatría, pero mucho más frecuente en adolescentes. Las bases del tratamiento del carcinoma diferenciado de tiroides son en parte similares a las del paciente adulto (tiroidectomía total, salvo en casos seleccionados de bajo riesgo, y vaciamiento ganglionar selectivo en función de los compartimentos afectos. El pronóstico de los pacientes pediátricos, incluso en casos avanzados, es en general muy bueno, así como la respuesta a los tratamientos con radioyodo,

INTRODUCCIÓN

por lo que el planteamiento quirúrgico con perspectiva pediátrica debe evitar en lo posible las cirugías agresivas, dado que las secuelas son permanentes y potencialmente muy graves (parálisis de cuerdas vocales, necesidad de traqueostomía permanente, etc.).

Supervivencia

La supervivencia global actual del cáncer pediátrico en los países desarrollados alcanza el 80%, gracias a los enormes avances logrados a través de la colaboración internacional mediante ensayos clínicos multicéntricos, que han permitido alcanzar estándares de tratamiento para los tumores más frecuentes. Por desgracia, esta supervivencia parece haberse estancado en la última década, y todavía 1 de cada 5 niños fallece por su enfermedad (12), particularmente algunos tipos tumorales y muchos tumores sólidos metastásicos al diagnóstico. Además, las cifras de supervivencia no son similares en todos los tipos tumorales ni dentro de los diversos subtipos de un tipo tumoral.

Tipo tumoral	% Superv. 3 años	% Superv. 5 años
<i>Neuroblastomas</i>	82 (78-85)	78 (74-81)
<i>Retinoblastomas</i>	98 (97-100)	97(95-100)
<i>Nefroblastomas y otros tumores renales no epiteliales</i>	94 (91-6)	92 (89-95)
<i>Hepatoblastomas</i>	86 (79-94)	84 (75-92)
<i>Osteosarcomas</i>	76 (69-83)	69 (62-76)
<i>Sarcoma de Ewing y tumores relacionados</i>	79 (73-84)	73 (67-80)
<i>Rabdomiosarcomas</i>	76 (69-82)	69 (63-76)
<i>NRSTS</i>	76 (70-83)	72 (65-79)
<i>Tumores de células germinales extracraneales y extragonadales</i>	91 (82-99)	86 (75-96)
<i>Tumores de células germinales gonadales</i>	96 (91-100)	96 (91-100)
<i>Tumores epiteliales</i>	92 (87-97)	91 (86-96)

Tabla 1. Tumores sólidos extracraneales en pacientes de 0 a 14 años.

Supervivencia por tipo tumoral en España, cohorte de incidencia 2010-2015. Fuente: Informe RETI SEHOP

Los cánceres pediátricos son raros, muy diversos (más de 60 enfermedades diferentes), y en su mayoría son distintos de los cánceres de los pacientes adultos. A pesar de los buenos resultados globales (por ejemplo, la supervivencia a 5 años en tumores como el nefroblastoma de bajo riesgo o de riesgo estándar supera ampliamente el 90%), algunos

INTRODUCCIÓN

tumores o subtipos tumorales mantienen supervivencias estancadas en torno al 20-30% a los 5 años, a pesar de los esfuerzos internacionales. La supervivencia es pésima para los niños con cánceres de mal pronóstico como por ejemplo el neuroblastoma metastásico, algunos tipos de sarcoma y el glioma de alto grado (24).

Además, la progresión o recaída para la mayoría de los pacientes pediátricos con cáncer todavía se correlaciona con bajas tasas de supervivencia, independientemente de las diferentes combinaciones de tratamientos quimioterápicos y de terapias dirigidas. Hasta un 30%-40% de los niños con cáncer recaen y la mayoría de ellos (> 80%) finalmente morirá a consecuencia de su enfermedad (25). Además, los tratamientos actuales basados en quimio/radioterapia conllevan una alta tasa de secuelas graves, por lo que el desarrollo de tratamientos dirigidos a dianas moleculares específicas y menos tóxicos es una prioridad.

Los pacientes supervivientes arrastran importantes secuelas relacionadas con los tratamientos multimodales, que afectan tanto la esfera física como la emocional. Por ejemplo, se estima que 2/3 de los supervivientes de neuroblastoma de alto riesgo presentarán secuelas graves, algunas de ellas de por vida (26). Las secuelas de los tratamientos citotóxicos son muy variadas, incluyendo desde pérdida de audición, retrasos en el crecimiento, hipertensión arterial, hasta insuficiencia renal, fibrosis pulmonar o insuficiencia cardiaca. Las complicaciones asociadas a la radioterapia son también extensas. Además, para este grupo de población con una esperanza de vida larga, se suma el riesgo de los segundos tumores, siendo este hecho particularmente relevante en pacientes con predisposición genética. La cirugía, en ocasiones mutilante y que a menudo requiere grandes incisiones con cicatrices antiestéticas, es también una fuente de secuelas e incluso, en algunos casos, se asocia con una mortalidad no despreciable. La repercusión tanto individual como social de dichas complicaciones a largo plazo constituye un problema internacional de primer orden.

INTRODUCCIÓN

0.3 Cáncer pediátrico de alto riesgo y en recaída

Entre el 30% y el 40% de los niños y adolescentes con cáncer recaen y la mayoría de ellos (> 80%) termina falleciendo (25). En general, se considera que el cáncer pediátrico de alto riesgo es aquel con una supervivencia esperada inferior al 30% (27). En el caso de los tumores de alto riesgo y de los tumores en recaída, salvo algunas excepciones, el pronóstico no ha mejorado muy significativamente en las últimas décadas, a pesar de los esfuerzos en mejorar el tratamiento local, la intensificación de la quimioterapia, o los avances en tratamientos de soporte. En un estudio internacional realizado por nuestro grupo, la mediana de supervivencia de los niños con tumores en recaída y refractarios fue de 6,3 meses (28). Algunos de los ejemplos más evidentes son el neuroblastoma de alto riesgo con amplificación del gen MYCN, que pese a los esfuerzos internacionales mantiene supervivencias inferiores al 30% a 5 años, los tumores rhabdoides extracraneales, con supervivencias del 38,4% a 3 años (29), los sarcomas metastásicos, varios tipos de tumores del sistema nervioso central y algunos tumores considerados raros (30).

Hasta la fecha, las estrategias de salvamento consisten principalmente en regímenes de quimioterapia de segunda línea muy agresivos que logran el control de la enfermedad a corto plazo, pero la mayoría de los niños termina falleciendo en última instancia, y aquellos pocos que sobreviven, sufren graves secuelas. Se necesitan nuevos enfoques terapéuticos, que impliquen nuevos mecanismos de acción sin añadir toxicidades inaceptables.

0.4 El acceso a nuevos tratamientos en cáncer pediátrico

La incorporación de nuevos y eficaces tratamientos farmacológicos y no farmacológicos en pediatría presenta grandes retos inherentes; desde los aspectos éticos relacionados con el tipo de población diana, hasta la baja frecuencia de la mayoría de las patologías, que impide realizar ensayos clínicos prospectivos con suficiente rapidez. Estos mismos motivos hacen que el desarrollo de terapias o dispositivos específicamente pensados para la población pediátrica sean de escaso interés para la industria.

INTRODUCCIÓN

La gran mayoría de los tratamientos estándar para el cáncer pediátrico han sido aprobados de manera empírica, validando su efectividad en grandes cohortes internacionales. Además, por los motivos anteriormente citados, muy pocos de los nuevos fármacos contra el cáncer en adultos contienen autorización expresa para su uso en tumores pediátricos. La limitación al acceso a nuevos tratamientos en cáncer pediátrico es un problema no resuelto (31). Este hecho, no solo impide mejorar las tasas de supervivencia en determinados tipos tumorales, sino que conlleva enormes secuelas a largo plazo en los supervivientes, asociadas con frecuencia a las terapias convencionales validadas. La gran heterogeneidad oncogénica de los cánceres del niño y el adolescente, no sólo entre diferentes tipos tumorales, sino dentro de un mismo tipo, así como la presencia de alteraciones moleculares tumorales a menudo diferentes al diagnóstico y a la recaída, como consecuencia de la evolución tumoral secundaria a los tratamientos, hacen el problema sea aún mucho más complejo.

Además, es muy importante tener en cuenta que más del 90% de los fármacos que demuestran actividad preclínica fracasan al trasladarse a ensayos clínicos en humanos (32), en la mayoría de los casos por ser ineficaces o por mostrar toxicidades inaceptables. En este sentido, es muy importante resaltar lo importante que es disponer de modelos preclínicos avanzados, que mimeticen al máximo las características histológicas, genéticas/epigenéticas y de respuesta a los tratamientos que se dan en los tumores de los niños. Modelos que, pese a sus limitaciones, no solo han de permitir evaluar de una forma más fidedigna la eficacia de los tratamientos que los sistemas que se han venido utilizando hasta ahora, sino, además, evaluar la toxicidad asociada a los tratamientos. En este sentido, estos modelos preclínicos avanzados han de ayudar a los grupos cooperativos internacionales y a la industria farmacéutica en su objetivo común de conseguir tratamientos más eficaces y menos tóxicos con los que tratar a los niños y adolescentes con cáncer, sobre todo refractario y en recaída. Esta tesis es un intento conjunto de cirujanos, clínicos, investigadores básicos y pacientes/tutores de avanzar en esta línea, generando modelos donde poder ensayar y desarrollar estas estrategias.

INTRODUCCIÓN

0.5 La medicina de precisión en cáncer pediátrico

La medicina de precisión o personalizada, en este caso aplicada al cáncer pediátrico, busca identificar aquellos tratamientos con la mejor probabilidad de éxito para el tumor específico de cada paciente, en base a las características genotípicas y fenotípicas del mismo, y a la vez, reducir toxicidades innecesarias. La mayoría de las líneas de investigación, hasta el momento actual, se han centrado en:

- La secuenciación genómica
- Los estudios funcionales farmacológicos, *in vitro* e *in vivo*

Estos análisis han puesto de relevancia la enorme complejidad de la mayoría de los cánceres infantiles, donde las aberraciones no se limitan a mutaciones puntuales, sino que ocurren a nivel epigenético y a otros niveles, por lo que deben identificarse nuevos objetivos y líneas de investigación, combinando la elaboración de perfiles moleculares (de genoma completo, exoma completo, transcriptoma completo y/o metiloma) con datos procedentes de estudios funcionales.

Alteraciones en número de copias	Carga y Firma mutacionales	Fusiones genómicas	Expresión genómica	Metiloma	Línea germinal	SNV/InDels
WGS, WES, aCGH	WGS, WES	RNAseq, WGS, PCR	RNAseq, Microarray	Array	WGS, WES, panel	WGS, WES, panel

Tabla 2. Técnicas utilizadas en medicina de precisión del cáncer pediátrico. WGS: Whole genome sequencing. WES: Whole exome sequencing. aCGH: Array de hibridación genómica comprada. RNAseq: Secuenciación de ARN. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. SNV: *single nucleotide variant*, InDel: mutaciones por inserción o delección.

Adaptación de *The Lanscape of Pediatric Precision Oncology*, Cancers 2021

El conocimiento de las bases moleculares del cáncer pediátrico adquirido en las últimas décadas está permitiendo que la medicina de precisión en oncología pediátrica se haya convertido en una realidad, particularmente para los tumores en recaída o de mal pronóstico. Más raramente (salvo en algunos ejemplos concretos) los tratamientos personalizados han pasado a la primera línea de tratamiento. Estos estudios pan-genómicos y transcriptómicos en cáncer pediátrico difieren ampliamente de los hallazgos en adultos; frente al origen epitelial del cáncer adulto, con múltiples mutaciones somáticas,

INTRODUCCIÓN

el cáncer pediátrico suele originarse en tejidos mesodérmicos en desarrollo, con pocas mutaciones somáticas, y es frecuente que exista un único gen *driver*, que a veces es exclusivo para un tipo tumoral (5) (8). Este abanico único de mutaciones ocasiona que solo un 30-45% de los genes *driver* pediátricos coincida con los del adulto (8) (33). Lo más habitual (hasta en 1 de cada 4 tumores) es la mutación de genes que modifican el epigenoma, además, hasta en un 60% de los tumores existen alteraciones estructurales y alteraciones en el número de copias (33) y en un 8-10% de los casos se asocian a mutaciones germinales (la mayoría en genes de reparación de ADN, lo que abre la puerta a la inmunoterapia en este subgrupo) (34). Todo ello pone de relevancia la necesidad de ampliar los estudios hacia los análisis a gran escala. Actualmente, en España hay disponibles más de 40 ensayos clínicos pediátricos de fase 1-2 para cánceres infantiles, para los cuales el perfil molecular profundo ("deep molecular profiling") del tumor es un requisito crítico de cara a poder incluir pacientes. Esto hace que sea crucial implementar la preselección molecular.

Los hallazgos genómicos de la medicina de precisión han puesto de relevancia la enorme complejidad de la mayoría de los tumores infantiles, poniendo en evidencia que las aberraciones no se limitan a la presencia de mutaciones puntuales en genes concretos o a la presencia de traslocaciones, sino que también ocurren alteraciones a nivel epigenético, transcriptómico, de los microRNAs y a otros niveles. Hasta ahora, los medicamentos contra el cáncer dirigidos (*targeted*) solo benefician a una pequeña proporción de los cánceres pediátricos con *drivers* oncogénicos únicos (que pueden llegar al 50% de los tumores) (34) ya que la gran mayoría de las moléculas diseñadas por las farmacéuticas priorizan los genes mutados en el cáncer del adulto. Algunos ejemplos recientes han mostrado la actividad de los tratamientos dirigidos basados en alteraciones moleculares diana en cánceres pediátricos, como por ejemplo, la inhibición de NTRK en cánceres con fusión del gen NTRK (35), la inhibición de BRAF en el glioma de bajo grado BRAFV600E mutado (36), en el glioma de alto grado y en la histiocitosis de células de Langerhans, y la inhibición de ALK en el linfoma anaplásico de células grandes pediátrico con ALK-translocado o en los tumores miofibroblásticos inflamatorios (37). Estas afecciones tienen en común una única

INTRODUCCIÓN

alteración genética *driver* o un oncogén adicionado. De todos ellos, hasta la fecha, solo los inhibidores de *TRK* larotrectinib y entrectinib han sido aprobados para niños, y este último, solo para adolescentes. El resto de las moléculas únicamente se pueden emplear en el marco de los tratamientos compasivos.

Un claro ejemplo del enorme interés suscitado por las aplicaciones clínicas de la secuenciación tumoral son los programas internacionales, surgidos sobre todo en la última década, y enfocados a estudiar el perfil molecular genómico mediante NGS (*next-generation sequencing*) de los pacientes de alto riesgo, en recaída o refractarios, para emitir después un informe clínico y molecular que permite a los equipos tratantes priorizar las opciones terapéuticas disponibles (34). Entre ellos, destacan los programas *INFORM* en Alemania (el mayor hasta la fecha, con más de 1000 muestras analizadas), *MAPPYACTS* en Francia (500 muestras) o *Pediatric MATCH* en EE. UU. (422 muestras), por citar algunos ejemplos. En este sentido, en nuestro centro hospitalario, el programa *COMIK* (*Cancer OMics for Kids*), nació con un planteamiento similar y ha acercado las terapias dirigidas a los pacientes con tumores en recaída, progresión y alto riesgo al diagnóstico, incluyendo, como centro de referencia nacional, pacientes de todo el estado español y analizando un total de 105 muestras.

El éxito del programa *COMIK* ha culminado en el desarrollo del primer programa nacional de medicina de precisión en cáncer pediátrico, denominado *PENCIL-SEHOP*, multicéntrico y liderado por nuestro equipo, y en el programa *COMIK 2*, que introduce como novedad el cribado apoptótico BH3.

Programa de Medicina de Precisión	País	Centro Patrocinador
<i>INFORM</i> <i>MAPPYACTS</i> <i>SMPaeds</i> <i>iTHER</i> <i>Pediatric MATCH</i> <i>iCAT</i> <i>PROFILE</i> <i>COMIK</i> <i>ZERO</i> <i>SEHOP-PENCIL</i>	Alemania	German Cancer Research Center
	Francia	Gustave Roussy Cancer Center
	Reino Unido	Royal Marsden Hospital
	Países Bajos	Prinses Máxima Centrum
	EE.UU.	National Cancer Institute–Children’s Oncology Group
	EE.UU.	Dana Farber Cancer Institute
	Canadá	Terry Fox Research Institute
	España	Vall d’Hebron Research Institute
	Australia	Children’s Cancer Institute and Kids Cancer Center,
	España	Vall d’Hebron Research Institute

INTRODUCCIÓN

Tabla 3. Ejemplos de los principales programas de medicina de precisión pediátrica internacionales. INFORM (INdividualized therapy FOr Relapsed Malignancies in childhood), MAPPYACTS (MoleculAr Profiling for Pediatric and Young Adult Cancer Treatment Stratification), SMPaedz (Stratified Medicine Pediatrics), iTHER (individualized THERapy), Pediatric MATCH (Molecular Analysis for Therapy Choice), iCAT/iCAT2 (Individualized Cancer Therapy), PROFYLE (PRrecision Oncology For Young peopLE), COMIK (Cancer OMics for Kids), ZERO (Zero Childhood Cancer), SEHOP-PENCIL (Sociedad Española de Hematooncología Pediátrica-Personalised mEdicine for Cancer in children in Spain).

Este tipo de programas se han desarrollado gracias al abaratamiento de costes que supuso la aparición de técnicas de NGS, entre otros factores, y han demostrado la necesidad y utilidad de secuenciar de forma extensiva los tumores pediátricos, más allá de los paneles de secuenciación habitualmente utilizados.

Es complejo comparar los resultados de los diferentes programas, dado que no existe una definición estándar de alteraciones accionables y que, además, cada programa emplea diferentes estrategias de perfilado molecular (34).

Desafortunadamente, el número de mutaciones identificadas potencialmente tratables ("druggable") continúa siendo bajo. La dificultad de acceso de los pacientes pediátricos a los nuevos tratamientos farmacológicos impide además el acceso a tratamientos potencialmente efectivos; de ahí el creciente interés en el desarrollo de modelos preclínicos relevantes y que reflejen correctamente las particularidades del cáncer pediátrico, que permitan acelerar el proceso traslacional e incluso, optimizar el diseño de los futuros ensayos clínicos. La utilización de modelos preclínicos que reproduzcan con la máxima fidelidad el tumor original, incluyendo la heterogeneidad (histológica, genética y epigenética), el microambiente tumoral, la farmacodinámica y farmacocinética, etc., permitiría evaluar de forma segura los nuevos tratamientos en fases preclínicas, priorizando de ese modo los más exitosos y menos tóxicos, y acelerar la incorporación de tratamientos ya existentes en ensayos clínicos pediátricos en Fase 1-2. Estos modelos incluso pueden permitir la realización de ensayos paciente/modelo en los que evaluar paralelamente la respuesta y anticipar futuras recaídas.

Además, estudios recientes evidencian el valor añadido de los estudios funcionales en modelos preclínicos *in vitro* e *in vivo* dentro de los programas de medicina personalizada a la hora de identificar tratamientos viables más allá de las dianas moleculares actualmente conocidas (27), por ejemplo, realizando "quimio perfiles" de los tumores.

INTRODUCCIÓN

0.6 Los modelos preclínicos en cáncer pediátrico

Esta necesidad de salvar los escollos que afectan a las fases preclínicas del estudio farmacológico, así como la posibilidad de estudiar mecanismos biológicos tumorales, llevó a la comunidad científica a desarrollar diversos modelos preclínicos. Los primeros modelos surgen en la década de 1970 (38). La validación de los modelos preclínicos pasa por probar primero la eficacia del tratamiento estándar en los mismos, para posteriormente evaluar la de las segundas o terceras líneas de tratamiento posibles (39).

Actualmente, los diferentes modelos de tumores sólidos son la base de los estudios preclínicos farmacológicos, y han permitido desarrollar numerosos tratamientos, principalmente en la oncología del adulto. A partir del año 2000, algunos grupos comienzan a testar de manera sistemática varios modelos preclínicos pediátricos (40) (41). Además, como ya hemos comentado, los modelos preclínicos conforman uno de los pilares de los programas de medicina personalizada, al permitir evaluar la eficacia terapéutica de posibles dianas y de explorar opciones de tratamiento adicionales.

Dado que el cáncer pediátrico es de por sí una enfermedad poco frecuente, y que sus tasas de curación actual son muy elevadas, el número de pacientes candidatos a nuevas terapias es muy escaso. Además, los pacientes que suelen ser candidatos a la medicina personalizada generalmente han sido tratados de manera intensiva, por lo que presentan una enfermedad sumamente resistente a las terapias disponibles. Los modelos preclínicos avanzados surgen como una manera de reflejar adecuadamente la enfermedad de este subgrupo de pacientes y de testar tratamientos, incluso permitiendo llevar a cabo ensayos clínicos aleatorizados en los animales (42), algo difícilmente posible de otro modo en esta población.

Nos centraremos en los modelos preclínicos de tumores sólidos pediátricos extracraneales, por ser el objeto de la presente tesis.

INTRODUCCIÓN

0.6.1 Modelos preclínicos de tumores sólidos pediátricos

Existen diversos modelos preclínicos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Resumiremos brevemente sus características, ventajas y desventajas, así como su capacidad para recapitular los tumores originales en toda su complejidad.

0.6.1.1 Líneas celulares

Son modelos tumorales que crecen *in vitro*, desarrollados a partir de los años 50 del siglo pasado, de la mano de los estudios en virología. Las líneas celulares destacan por su facilidad de acceso, fácil manejo, bajo coste y pocos requerimientos para su mantenimiento. Son modelos muy útiles y estandarizados a la hora de realizar estudios moleculares, genéticos y bioquímicos (38). Por contra, presentan importantes limitaciones a la hora de imitar la respuesta biológica y terapéutica de los tumores en su microambiente (43). Su crecimiento *in vitro* mediante pasos sucesivos produce una presión de selección hacia las células mejor adaptadas a crecer en esas condiciones. Además, las líneas celulares comerciales disponibles o las generadas en los distintos laboratorios son pobres al tratar de representar la enorme variabilidad y riqueza de subtipos tumorales, así como la heterogeneidad intrínseca existente en el propio tumor. Además, en su gran mayoría, las líneas pediátricas proceden de muestras de pacientes obtenidas al diagnóstico (pacientes no tratados), lo que las convierte en modelos no válidos a la hora de replicar la situación de pacientes en recaída, que son los candidatos más frecuentes para participar en ensayos clínicos fase 1 y 2. El empleo de líneas celulares está detrás de muchos de los fracasos en la traslación de compuestos efectivos en estudios preclínicos a ensayos clínicos (44).

Para sortear esta situación, en muchas ocasiones se intenta imitar *in vitro* la situación de los pacientes en tratamiento, seleccionando clones de células que se hacen “resistentes” a los tratamientos tras mantenerlas en constante contacto con los fármacos. Aunque estas líneas resistentes pueden ayudarnos a entender los mecanismos de resistencia, distan bastante de la situación real de adquisición de resistencia que se da en un tumor *in vivo*.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las líneas celulares, son líneas continuas, desarrolladas a partir del cultivo de un tumor primario y perpetuadas *in vitro* indefinidamente. Se trata de líneas que, a pesar de sus ventajas, pueden sufrir con el tiempo contaminación por otras líneas celulares e inestabilidad en su genoma. Por contra, los cultivos celulares más cercanos al tumor de un paciente concreto son los denominados “cultivos primarios”, que se originan de células obtenidas de tumores en fresco, tejidos u órganos. A pesar de su similitud con la fuente original, crecen lentamente, sufren importantes limitaciones de forma análoga a las líneas comerciales, como son su supervivencia limitada, la selección celular a través de los diferentes pasos y no ausencia de exposición al microambiente tumoral.

0.6.1.2 Organoides / Tumoroides

El desarrollo de cultivos celulares tridimensionales, con sistemas microfisiológicos, resuelve parcialmente el problema de las líneas celulares. Estos tumoroides, esferoides u organoides deben ser representativos de las alteraciones genéticas que confieren un peor pronóstico a cada tumor concreto, así como de aquellas que confieren resistencia al tratamiento.,

La generación de tumoroides es una técnica muy reciente; no fue hasta 2011 que se logra establecer los primeros (45). Se trata de cultivos celulares *in vitro* tridimensionales, generados a partir de muestras humanas, que reflejan algo mejor que las líneas celulares la situación *in vivo*. Su desarrollo, junto con el de los PDX, ha supuesto un importante avance en los estudios farmacológicos y, junto con estos últimos, reproducen con mayor fidelidad la heterogeneidad genómica y fenotípica tumoral (46). Pueden ser generados directamente y con relativa facilidad a partir de material tumoral, y se emplean con frecuencia para estudiar la sensibilidad tumoral a compuestos farmacológicos. Su gran ventaja frente a los modelos *in vivo* es que permiten evitar o limitar el uso de animales, en consonancia con las “3R” de la investigación (*Replacement, Reduction, Refinement*).

Existen diferentes tipos de cultivos 3D (14) como, por ejemplo, los esferoides, útiles para el estudio de la morfogénesis, arquitectura y composición tumoral, y para el desarrollo preclínico de compuestos, por ejemplo, en neuroblastoma (47), o los organoides,

INTRODUCCIÓN

generados a partir de biopsias de pacientes o de modelos PDX (más representativos de la diversidad tumoral), y útiles para identificar vías de señalización, respuestas farmacológicas y fenotipos de invasión.

0.6.1.3 Xenoinjertos y xenoinjertos derivados de paciente

Se trata de modelos *in vivo* (generalmente, en ratones inmunodeprimidos) fundamentales en la investigación biomédica actual. Los xenoinjertos (en inglés, *xenografts*) resuelven muchas de las limitaciones de las opciones anteriormente citadas. La mayoría de los modelos de xenoinjertos se generan a partir de líneas celulares cultivadas, por lo que en parte presentan los mismos problemas que las propias líneas (selección de las células mejor adaptadas para crecer en cultivo) y son más caros y complejos de desarrollar y mantener. Sin embargo, por otro lado, mantienen elementos clave implicados en la tumorogénesis, como las interacciones entre el tumor y el estroma (46).

En los últimos años se ha generado un enorme interés por los xenoinjertos derivados de paciente, los llamados PDX (*Patient Derived Xenographs*). Estos modelos presentan a priori la ventaja de utilizar tejido tumoral del propio paciente, que representa mucho mejor la heterogeneidad intra e intertumoral al compararse con los modelos generados a partir de líneas celulares establecidas (48).

Los primeros xenoinjertos tumorales se generaron en los años 50 del siglo pasado (49), aunque su verdadero auge se produjo tras descubrirse los ratones atípicos desnudos (en inglés, *nude*) en la década de 1960 y la sucesiva generación de nuevas cepas optimizadas para realizar xenoimplantes, como los ratones “*scid*” (*severe combined immunodeficient mice*) (48). Las variantes genéticas de las distintas cepas de ratones de laboratorio se actualizan periódicamente y pueden encontrarse en la página web *Mouse Genome Informatics* (http://www.informatics.jax.org/searches/marker_form.shtml).

Si nos centramos en los modelos en ratón, más allá de las diferentes mutaciones que confieren a cada cepa una menor o mayor inmunodeficiencia (desde los animales “*nude*”, con deficiencia únicamente en las células T, hasta los animales NSG, que presentan una

INTRODUCCIÓN

inmunodeficiencia combinada severa), podemos realizar distintas clasificaciones de los modelos de xenoinjerto en función de sus distintas características:

Lugar de implantación del tumor	Heterotópicos (generalmente subcutáneos) Ortotópicos (mismo órgano de origen)
Técnica de implantación	Inyección (requiere disagregar la muestra)
	Quirúrgica (fragmento sólido que conserva arquitectura y estroma)
Origen de la muestra	Líneas celulares Tumor del paciente (PDX)
Inmunidad	Animales inmunodeprimidos Animales inmunocompetentes humanizados (mediante la inyección de células del sistema inmune humano)

Tabla 4. Tipos de PDX en función de las características técnicas empleadas en su generación

No obstante, los modelos PDX en ratón presentan también algunas desventajas. Por un lado, la cantidad de muestra necesaria para establecer el modelo (aunque es variable según las series y los tipos tumorales), y la más significativa, el tiempo necesario para lograr que el tumor crezca con éxito en el primer animal injertado (lo que en inglés se denomina "*engraftment*") y para después expandir el modelo a otros animales. Este decalaje a menudo limita su aplicación para la medicina de precisión en tiempo real aplicada a la práctica clínica.

Como alternativa surgen otros modelos animales interesantes para la generación de xenoinjertos, como por ejemplo el pez cebra. Este modelo, económico y sencillo de generar (que, además, desde el punto de vista bioético, ofrece la ventaja de realizarse en un animal más primitivo, de acuerdo con los principios de las 3 R), es muy atractivo por ejemplo para el estudio de fármacos y mecanismos celulares. Inicialmente los peces cebra se usaron como modelos de carcinogénesis (50), permitiendo el descubrimiento de muchos de los genes supresores de tumores, pero más recientemente se han comenzado a realizar también xenotrasplantes a partir de tumores humanos (51). Una de sus principales cualidades es que se trata de animales transparentes, lo que permite su examen directo al microscopio. Su otra ventaja, quizás la más interesante, es la rapidez con la que se genera el modelo, permitiendo hacer ensayos en el plazo de una semana (39). Dicha calidad sitúa esta opción a la cabeza de lo que denominamos medicina personalizada en tiempo real,

INTRODUCCIÓN

ya que el modelo en ratón puede llegar a tardar en generarse de semanas a meses. Sin embargo, las evidentes diferencias con el ser humano en anatomía (por ejemplo, los peces cebra carecen de ciertos órganos como el pulmón), fisiología (se trata de animales poiquilotermos), vías de administración (los fármacos penetran a través de su sistema digestivo, piel y branquias), microambiente tumoral etc., son aspectos limitantes a la hora de trasladar directamente al paciente los resultados obtenidos de los ensayos de eficacia a nuevas drogas. Así pues, los resultados obtenidos deberán valorarse con precaución y posiblemente, validarse con otros sistemas experimentales, aunque pueden ser muy importantes como método de evaluación, e incluso recientemente se ha publicado un artículo que sugiere su uso como sistema para evaluar la capacidad de diseminación del cáncer de pulmón de células no pequeñas (52).

0.6.2 Patient derived xenografts en ratón: Antecedentes, tipos

Los primeros modelos de xenoinjerto en ratón se realizaron en ratones atípicos o *nude*, después en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) y posteriormente, en las nuevas cepas aún más inmunodeficientes (53).

Los modelos preclínicos *in vivo* más frecuentemente utilizados en la actualidad se basan en la generación de *xenografts* en ratones inmunodeprimidos, a partir de líneas celulares crecidas *in vitro*, cultivadas monocapa e inyectadas en el tejido subcutáneo del flanco del animal. Se trata de un procedimiento relativamente sencillo, aunque mantiene algunas de las limitaciones inherentes al uso de las líneas celulares que hemos descrito: no representan correctamente la heterogeneidad tumoral ni reproduce la enfermedad metastásica (54), ni reproducen adecuadamente el efecto del microambiente donde se desarrolla el tumor original (55), al estar implantados en el subcutáneo. En su conjunto, estos factores podrían explicar parcialmente por qué muchas moléculas que a nivel preclínico parecen ser altamente efectivas, tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales, no son eficaces al ser trasladadas al uso en pacientes. Sin embargo, son modelos muy útiles para realizar estudios sobre proliferación tumoral y para validar agentes terapéuticos citotóxicos.

INTRODUCCIÓN

En contraposición a los modelos procedentes de líneas celulares, surgen los denominados modelos PDX, es decir, *patient-derived xenografts*, para los cuales se utiliza material tumoral del propio paciente, el cual incluye una parte del estroma, los fibroblastos y algunas células inmunitarias. Estos modelos preservan la heterogeneidad tumoral y representan con más fidelidad la variabilidad entre distintos los tumores.

Los modelos PDX pueden ser heterotópicos (generalmente, subcutáneos) u ortotópicos (en principio, los más fieles al tumor original al implantarse en el órgano de origen). Varios trabajos han demostrado que los modelos subcutáneos no son capaces de reproducir correctamente la heterogeneidad de los tumores, su capacidad de metastatizar ni están influenciados por el microambiente (54). Por el contrario, los modelos ortotópicos (también llamados PDOX) son superiores en la hora de reproducir el microambiente (56), y reproducen más fielmente la arquitectura y morfología tumoral, así como las características moleculares (48). No obstante, los modelos ortotópicos tampoco alcanzan (por lo general) a representar correctamente la enfermedad metastásica, que suele ser la responsable del fallecimiento de los pacientes, lo que puede estar detrás del fracaso al trasladar algunos fármacos de la investigación a la práctica clínica (54).

Para la implantación del tumor en el órgano de origen pueden emplearse diferentes técnicas. Lo más habitual es disagregar la muestra tumoral mediante su procesamiento. De este modo, se obtienen las células necesarias, que generalmente se suspenden en una matriz en gel (*Matrigel®*, *Geltrix®*), para posteriormente inyectarlas en el animal (habitualmente, de manera ecoguiada). La alternativa a la técnica de inyección es la implantación quirúrgica de un fragmento tumoral no procesado, el cual - a diferencia de las muestras procesadas - incluye células estromales y mantiene la arquitectura original. Esta opción es técnicamente más compleja, pero teóricamente es la que preserva más fielmente las características del tumor del paciente (57).

Además, se pueden generar los denominados modelos aloinjerto o "*allografts*", mediante la implantación, subcutánea u ortotópica (*orthoallografts*), de tumores previamente desarrollados en ratones modificados genéticamente (GEMM, *genetically engineered*

INTRODUCCIÓN

mouse models) en ratones inmunosuprimidos. Esta técnica permite la expansión y evolución espaciotemporal de estos tumores en los ratones atípicos, así como su estandarización para estudios de evaluación de fármacos. Un ejemplo es el trabajo realizado con cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) inducido en ratones mediante la mutación del gen *KRAS* (58).

Actualmente y debido a la relevancia del sistema inmune, se están generando modelos singénicos, basados en la implantación de líneas celulares o modelos tumorales murinos en ratones inmunocompetentes. Dichos modelos se desarrollan en un entorno inmunocompetente, pero muchas veces no reproducen las características de los tumores humanos al tratarse de tumores murinos inducidos mediante mutagénesis química o generados mediante ingeniería genética (los denominados GEMM) mediante la introducción de diferentes mutaciones. Una de las principales aplicaciones de estos modelos es ensayar tratamientos de inmunoterapia (38).

Pese a esta capacidad de mimetizar los tumores el paciente, algunos autores ponen de relieve las limitaciones de los modelos PDX en ratón. Entre ellas, está la necesidad de establecerse en un receptor inmunodeprimido, el hecho de implantar tejido humano en un microambiente murino, su elevado coste, la complejidad de su realización, la lentitud de su establecimiento y la dificultad para reflejar correctamente la enfermedad metastásica (54). A largo plazo, con los sucesivos pasos, se ha visto que también pueden experimentar cambios genéticos y fenotípicos (59), y de ahí la importancia de su validación mediante la comparación histológica y genómica (WES, WGS, transcriptoma) con el tumor original.

La relevancia de estos modelos ha llevado a que los grandes consorcios internacionales en medicina de precisión del cáncer pediátrico, como el *European Innovative Therapies for Children with Cancer–Paediatric Preclinical Proof-of-Concept Platform* (ITCC-P4) y el estudio *MoleculAr Profiling for Pediatric and Young Adult Cancer Treatment Stratification* (MAPPYACTS) en Europa, o el *Pediatric Preclinical Testing Consortium* (PPTC) - actualmente denominado PIVOT - en Estados Unidos, estén estableciendo sus propias plataformas preclínicas que permitan acelerar la oncología pediátrica traslacional.

INTRODUCCIÓN

Esto demuestra que, tanto la optimización en la generación de dichos modelos como su validación son de particular interés para la comunidad investigadora del cáncer del niño y el adolescente.

1. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.1. Hipótesis

El cáncer infantil sigue siendo un desafío para nuestra sociedad, dado el número inaceptable de niños que mueren o que sufren graves secuelas a largo plazo o durante toda su vida a consecuencia de la enfermedad y de sus tratamientos. Aunque la supervivencia global se sitúa en torno al 80% en los países desarrollados, esta no se ha conseguido mejorar en los últimos 20 años, a pesar de las mejoras terapéuticas introducidas. Permanece en torno al 30% en algunos tipos tumorales, y es incluso más baja en los pacientes de alto riesgo y en pacientes en recaída. La llegada de la medicina de precisión, con el acceso a los datos genómicos de los tumores, está permitiendo mejorar el tratamiento en determinados subgrupos de pacientes afectos de alteraciones genómicas concretas. Sin embargo, para la mayoría de los pacientes pediátricos, por el momento esto no se ha traducido en una mejora en los tratamientos, haciéndose necesario investigar por qué ocurre esto y cómo mejorar estos tratamientos.

En los próximos años se va a disponer cada vez de más información específica sobre el tumor de un paciente, así como de potentes herramientas de predicción de respuesta a los tratamientos, como la inteligencia artificial y el *machine learning*. En su conjunto, todas estas nuevas aproximaciones hacen que cada vez sea más necesario el disponer de buenos modelos preclínicos *in vivo* como herramientas donde poder evaluar la efectividad de las aproximaciones terapéuticas potencialmente efectivas. Modelos que nos permitan trasladar estos resultados con ciertas garantías de éxito a los pacientes y que, además, nos permitan evaluar la relación efectividad/toxicidad, muy importante en los tratamientos oncológicos, pero especialmente importante en el cáncer del niño y adolescente.

1.2. Objetivos de la tesis doctoral

El principal objetivo de esta tesis doctoral es la generación de un banco de modelos preclínicos de tumores sólidos pediátricos de mal pronóstico y/o refractarios a los tratamientos capaces de reproducir la complejidad y la heterogeneidad de los tumores

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

pediátricos. El objetivo final para la generación de estos modelos PDX es facilitar la transición hacia una medicina personalizada de precisión, basada en las características moleculares del tumor del paciente, y ser herramientas avanzadas con las que poder evaluar la efectividad de nuevas estrategias terapéuticas.

Objetivos específicos:

- I. Generar un banco de modelos preclínicos *Patient Derived Orthotopic Xenografts* (PDOX)/orthoxenografts) a partir de fragmentos sólidos/biopsias en fresco de tumores de pacientes con cáncer pediátrico de mal pronóstico, refractarios a los tratamientos o con limitadas opciones terapéuticas en la recaída, generados tras la implantación ortotópica (en el mismo órgano de origen) en ratones inmunosuprimidos.
- II. Evaluar e identificar potenciales factores asociados al éxito de la generación de los modelos PDX ortotópicos pediátricos
- III. Realizar la caracterización histopatológica de los modelos generados y evaluar su concordancia con los tumores primarios de los que se derivan.
- IV. Utilizar los modelos en investigaciones en medicina personalizada en tiempo real, así como en el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 El programa COMIK del Hospital Vall d’Hebron (*Cancer OMics for Kids*)

El programa COMIK (acrónimo de *Cancer OMics for Kids*) es la plataforma de medicina personalizada (PerMed) o de precisión en cáncer pediátrico del Hospital Universitario Vall d’Hebron. El proyecto nace en el año 2016, liderado por el servicio de Oncohematología Pediátrica del Hospital Vall d’Hebron junto con el Grupo de Investigación Traslacional del Cáncer en la Infancia y Adolescencia del VHIR (Vall d’Hebron Institut de Recerca), con la colaboración de la Unidad de Cirugía Oncológica Pediátrica del Vall d’Hebron, el Grupo de investigación del programa ProCURE, liderado por el Dr. Alberto Villanueva, del ICO/IDIBELL (Institut Català d’Oncologia/Institut d’Investigació Biomèdica de Bellvitge) y su *spin-off* “Xenopat” S.L. Inicialmente, las muestras se recogieron y procesaron bajo el proyecto “Colección Banco de Tumores” de la Dra. Soledad Gallego Melcón y Dr. Josep Roma Castanyer (Referencia Registro Nacional de Biobancos, sección colecciones, C.0002311, del Instituto de Salud Carlos III), el cual incluye una autorización expresa para el uso de los tejidos tumorales en proyectos de investigación y experimentación biomédica. Posteriormente, se diseñaron consentimientos específicos en el marco del Proyecto COMIK, que fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación (CEIm) del Hospital Vall d’Hebron con fecha 7.12.2020 y número de registro PR(AMI)633/2020.

El programa nace con dos objetivos:

- 1) Mejorar la supervivencia y reducir las morbilidades en niños sin otras opciones terapéuticas al aumentar su acceso a la innovación
- 2) Adquirir conocimientos sobre la biología tumoral para desarrollar nuevas combinaciones dirigidas a múltiples rasgos diferenciales del cáncer pediátrico.

El proyecto se alinea con los objetivos de la *European Paediatric Cancer Mission* (60) que pretende lograr reducir a la mitad el número de muertes por cáncer en la infancia para el año 2030.

MATERIAL Y MÉTODOS

Dichos objetivos se desarrollan a través de dos líneas de trabajo principales. La primera consiste en la implementación y evaluación de una plataforma de perfiles moleculares profundos para tumores sólidos infantiles recidivantes y refractarios, incluyendo secuenciación del exoma completo (WES) y de ARN (RNASeq), como herramienta de preselección de pacientes para su posterior inclusión en ensayos clínicos de fase inicial o de canasta (*basket trials*). En la segunda línea de trabajo, para aumentar y mejorar las opciones terapéuticas disponibles, se integran los resultados de perfil molecular profundo con una evaluación funcional *in vivo*. Para ello, el proyecto propone generar, siempre que sea factible, xenoinjertos derivados del paciente (PDX) en ratones atípicos o inmunosuprimidos. Dichos modelos, una vez establecidos, se utilizarán para el desarrollo de futuras líneas de investigación en oncología pediátrica. Por tanto, la generación de estos modelos PDX - objeto de la presente tesis doctoral - se concibe como una línea estratégica del programa COMIK. Esta línea de trabajo constituye un hecho diferencial respecto a otros programas similares, que únicamente se centran en el cribado molecular como eje de su aproximación hacia la medicina de precisión.

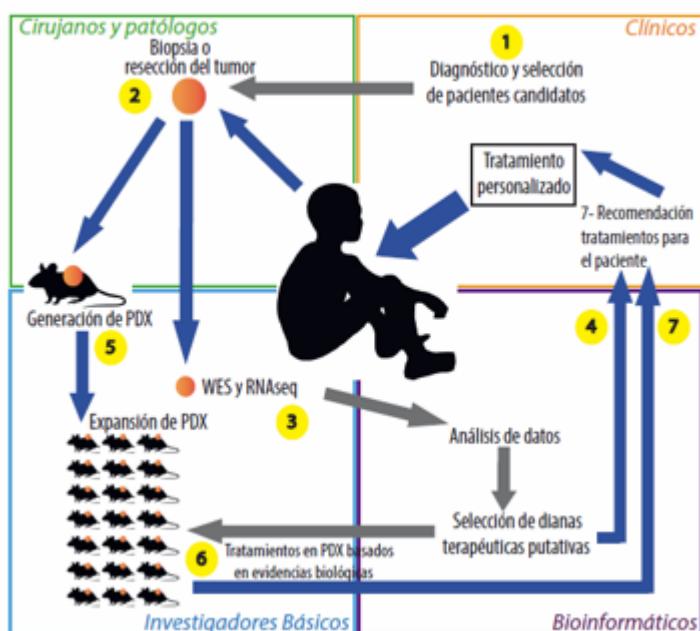


Figura 9. Esquema del funcionamiento del Programa COMIK (Cancer OMics for Kids) del Hospital Universitari Vall d'Hebron

Los pacientes pediátricos y adolescentes con cáncer constituyen una población muy vulnerable, a menudo subrepresentada en los ensayos clínicos gestionados por las

MATERIAL Y MÉTODOS

compañías farmacéuticas y con mucha dificultad para acceder a los tratamientos innovadores. Este problema se ve acentuado por el hecho de que la mayoría de los cánceres pediátricos, son considerados enfermedades raras, por lo que la investigación tiende a centrarse únicamente en los cánceres más comunes, como las leucemias pediátricas. Los pacientes con cánceres menos frecuentes, como el hepatoblastoma o los tumores rhabdoides, no tienen acceso a ensayos en fases tempranas, lo que también sucede en otros tumores más comunes (como el tumor de Wilms o los linfomas) cuando recaen. Al incluirse en el programa PDX del proyecto COMIK todos los tipos tumorales sólidos pediátricos extracraneales diagnosticados (incluyendo los más comunes, los raros y los ultra raros), garantizamos una equidad en la busca de mejoras terapéuticas.

El programa COMIK de Vall d'Hebron es el único en España que realiza WES a todos los pacientes. Nuestro grupo ha sido acreditado, además, como centro de perfiles moleculares por el proyecto europeo MAPPYACTS. Ello se ha traducido en un aumento del 70% en el número de ensayos de fase 1-2 para oncología y hematología en nuestra unidad de ensayos clínicos, habiéndose duplicado los pacientes reclutados de 2019 a 2020.

Desde el punto de vista de la recogida y gestión de datos:

1. *Tipo de datos:*

El estudio COMIK incluye dos tipos de datos: datos clínicos de los participantes del estudio, datos genómicos sin procesar (tanto de línea germinal como somáticos) y datos de los estudios en animales realizados en el laboratorio del ICO-IDIBELL/Xenopat. Los datos clínicos recopilados incluyen: 1) Información demográfica, edad, género, antecedentes relevantes, detalles de terapias anteriores, número de recaídas, situación actual al ingresar al estudio; 2) Viabilidad del perfil molecular (porcentaje relativo de células tumorales, tiempo desde la entrada en el estudio hasta la publicación del informe, perfil molecular contribuyente sí/no); 3) Resultados del perfil molecular (número de opciones terapéuticas sugeridas y priorización); 4) El tratamiento recibido después de la participación en el estudio,

MATERIAL Y MÉTODOS

las terapias posteriores y el ensayo clínico elegido y; 5) Respuesta al tratamiento, valorando SLP (supervivencia libre de enfermedad) y SG (supervivencia global).

Los datos genómicos sin procesar proceden de la secuenciación de alto rendimiento de WES y RNASeq realizada en el ADN de la línea germinal del paciente, obtenida en muestras de sangre, y en el ADN somático, obtenido de la muestra tumoral.

Para el estudio de los PDX (objeto de la presente tesis) se han diseñado tres hojas de recogida de datos enfocadas a intentar identificar los factores más relevantes que podrían influenciar a la hora de establecer los modelos (Anexo I). Se han establecido varios niveles de seguridad para cumplir con las normativas de protección de datos y garantizar que la correlación entre los datos clínicos del paciente y sus códigos de muestra únicamente esté disponible para las investigadoras clínicas del proyecto con acceso a la base de datos (Gabriela Guillén y Alexandra Navarro).

En primer lugar, cada una de las muestras empleadas en el proyecto COMIK se pseudonimiza e identifica con la letra "T" seguida de un número, de manera que un mismo paciente puede ser el origen de diferentes muestras tumorales. En el libro del laboratorio del grupo de investigación se han registrado de forma sistemática todos los procedimientos llevados a cabo con las muestras, incluyendo aquellas que se implantaron en animales, garantizando la trazabilidad de las muestras tumorales frescas obtenidas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron, previa comprobación del personal responsable de la existencia del consentimiento informado firmado por los tutores de los menores. Los modelos PDX desarrollados en ICO-IDIBELL/Xenopat, se identificaron como "PDOX-T...", donde "T" corresponde a la muestra que daba origen al modelo.

Posteriormente, estos datos se procesaron en una segunda pseudonimización. Las muestras incluidas en el proyecto de generación de PDX se recodificaron en orden correlativo (VH-1, VH-2, etc) y los modelos PDX se recodificaron de acuerdo con el subtipo histológico que representaban y al orden de generación (ej. VH-PDOX-WT1 corresponde con el modelo -PDOX- de nefroblastoma -WT- generado en primer

MATERIAL Y MÉTODOS

lugar -1 -). La correlación entre la nueva codificación de las muestras y los PDOX con los códigos asignados en el libro del laboratorio quedó custodiada en una hoja Excel maestra, alojada en el espacio informático en la intranet del Vall d'Hebron Institut de Recerca perteneciente al grupo de Medicina Personalizada.

Resumidamente, los datos incluidos en la base son:

- Datos clínicos del paciente: Incluyendo la información basal de los pacientes previamente descrita, registrando además la fecha de intervención quirúrgica o de realización de biopsia, la técnica de obtención, el tipo de muestra obtenida, datos relevantes del informe de Anatomía Patológica, la evolución posterior del paciente (estabilidad, recaída, progresión), última fecha de seguimiento y fecha de fallecimiento, de producirse. Se incluyó el número de historia clínica (SAP) para poder identificar las muestras obtenidas de un mismo paciente. A este nivel de seguridad, como hemos definido anteriormente, solo podía acceder el personal clínico del estudio.

Para la presente tesis, se decidió cerrar la fecha de seguimiento de los pacientes a 31 de diciembre de 2021, sin incluirse para el análisis ni los pacientes ni los modelos PDX establecidos con posterioridad a la misma.

Definiciones utilizadas:

- Recidiva: Tumor que reaparece, por lo general después de un período de duración variable durante el cual no se pudo detectar, tanto a nivel local como a distancia.
- Progresión: Tumor que continúa creciendo o diseminándose.
- Refractario: Tumor que no responde a los tratamientos, de acuerdo con las exploraciones de imagen.

Para definir los grupos de riesgo al diagnóstico, se emplearon las clasificaciones correspondientes a protocolos de los grupos europeos dedicados al tratamiento de cada tumor. El grupo de riesgo en el momento de obtención de la muestra

MATERIAL Y MÉTODOS

se consensuó con el equipo clínico (por ejemplo, un tumor que al diagnóstico podía considerarse de riesgo intermedio, si recaía y la biopsia se obtenía de dicha recaída, pasaba a alto o muy alto riesgo, en función de las posibilidades de supervivencia).

- Datos histológicos: Se han recopilado datos relevantes comparativos tanto del análisis histológico del tumor primario como del análisis del *xenograft* generado en el animal (patrón de crecimiento, morfología celular, pleomorfismo, mitosis, inmunohistoquímica). Se diseñó con el equipo de anatomicopatólogos un sistema de varios ítems para comparar el grado de similitud del tumor del paciente con el tumor del animal (que denominamos “concordancia”), basado fundamentalmente en el mantenimiento de la línea celular original, la morfología celular y la arquitectura tumoral.
- Datos relativos a la generación de los modelos PDX: Se registró el tipo de implante (ortotópico/subcutáneo/ambos), la muestra empleada, la fecha de implante respecto a la obtención de la muestra, el medio de conservación, la cepa de animales empleada (ratones *nude* atípicos o NSG), su edad, el éxito o no del implante y los datos relevantes de los sucesivos pasos (fundamentalmente, el número de animales implantados y el tiempo transcurrido desde el implante hasta el sacrificio del ratón –considerándose este como el tiempo de crecimiento del tumor -).

2. Recopilación y acceso a los datos

Los datos del estudio relativos a la generación de los PDX se recopilaron y administraron utilizando las herramientas de captura de datos electrónicos REDCap (Vanderbilt University, USA/ National Institutes for Health - NIH/NCATS UL1 TR000445) alojadas en el Vall d’Hebron Institut de Recerca (VHIR) (61) (62). REDCap (Research Electronic Data Capture) es una plataforma de software segura basada en la web, diseñada para respaldar la captura de datos para estudios de investigación, que proporciona 1) una interfaz intuitiva para la captura validada de datos; 2) pistas de auditoría para rastrear la manipulación de datos y los

MATERIAL Y MÉTODOS

procedimientos de exportación; 3) procedimientos de exportación automatizados para descargar los datos a los paquetes estadísticos habitualmente utilizados; y 4) procedimientos de integración e interoperabilidad de datos con fuentes externas. Los datos clínicos se obtuvieron retrospectivamente de los registros médicos de los pacientes. Cada tumor analizado se ha identificado con un número de estudio, encabezado por la letra "T". Los datos histológicos se han obtenidos mediante el procesamiento y análisis de las muestras del tumor primario y del tumor del xenoinjerto (de haber crecido de forma exitosa) por parte de la patóloga referente pediátrica y de los técnicos de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron. Los datos del proceso de generación de los modelos PDX se obtuvieron del registro de laboratorio de ICO-IDIBELL/Xenopat. Los datos genómicos se obtuvieron en instalaciones de secuenciación (QGenomics, CNAG-CRG) y después se proporcionaron al equipo del proyecto.

3. Gestión, documentación y gestión/preservación de datos: Todos los datos obtenidos están depositados en REDCap, un servidor seguro y especialmente diseñado para estudios clínicos. Los resultados del estudio se pueden comunicar en reuniones científicas y de esta forma, contribuirán a la literatura científica con el objetivo de mejorar el tratamiento de los pacientes. En ningún momento estas comunicaciones se harán de tal manera que se pueda identificar a un paciente individual. Los datos del paciente y las muestras de tejido están codificados y pseudononimizados, y solo se podrán identificar de forma indirecta.
4. Seguridad y confidencialidad de los datos: El acceso a esta información y a la identidad de los participantes del proyecto ha estado estrictamente restringido a los médicos a cargo del paciente. Además, se han observado los siguientes principios de protección de datos: los datos se han procesado de manera justa y legal, los datos se han utilizado solo para el propósito clínico especificado, la cantidad de datos recopilados es relevante y no excesiva, se han tomado todos los esfuerzos razonables para garantizar la precisión de los datos, los datos se han utilizado de acuerdo con los derechos del paciente y los datos se han almacenado de forma segura.

MATERIAL Y MÉTODOS

5. Intercambio de datos y acceso: El uso y la transferencia de datos de pacientes asociados con muestras de tejido están cubiertos por el reglamento de la UE 2016/679 sobre la protección de las personas físicas con respecto al procesamiento de datos personales y sobre la libre circulación de dichos datos (Datos generales Reglamento de protección), que garantiza la protección de las personas con respecto al procesamiento de datos personales (incluidos los datos sensibles) y el intercambio de dichos datos. Según este reglamento, los Estados miembros están obligados a proteger los derechos y libertades fundamentales de las personas físicas, y especialmente su derecho a la privacidad con respecto al tratamiento de "datos personales" y "datos sensibles".

La documentación del Consentimiento Informado fue aprobada por el Comité de Ética en Investigación de Vall d'Hebron (CEIm). Los Datos Personales de cualquiera de las partes se utilizarán únicamente según lo permitan los Formularios de Consentimiento Informado y de acuerdo con todas las leyes aplicables en España. Los datos pseudonimizados estarán disponibles para los investigadores del equipo investigador, así como para otros investigadores externos, para la realización de análisis secundarios. Las solicitudes de datos serán revisadas por el equipo de investigadores del proyecto.

2. 2 Desarrollo de los circuitos y de los modelos PDX

2.2.1 Desarrollo del circuito

La creación de un circuito ágil, óptimo y adecuado a los recursos humanos y materiales disponibles se estableció tras una primera prueba de concepto. Este punto se consideró muy importante desde el principio para aumentar las posibilidades de éxito de nuestra aproximación. Aunque puede parecer un aspecto banal, es muy importante resaltarlo ya que implica la coordinación de un número importante tanto de profesionales del ámbito clínico como investigadores traslacionales. Así, tras varios casos iniciales de puesta a punto,

MATERIAL Y MÉTODOS

se reanalaron los procedimientos detectándose aspectos mejorables y se estableció el circuito definitivo, consistente en:

- Identificación del paciente candidato por parte del Comité de Tumores Sólidos Extracraneales Pediátrico, en base a las pruebas diagnósticas iniciales (debuts) o a la historia clínica (recaída o progresión). El circuito se activa siempre que dentro de los procedimientos médicos necesarios para el manejo clínico del paciente es factible la posibilidad de obtener tejido fresco del tumor primario. Nunca se tomaron muestras de forma excepcional para realizar estos procedimientos fuera del circuito clínico del paciente.
- Firma del consentimiento informado por parte del paciente y/o sus tutores legales, de manejo de tejidos biológicos para el Biobanco de Tumores y/o del Proyecto COMIK, así como del consentimiento informado del procedimiento quirúrgico.
- Programación del procedimiento de obtención de tejido (biopsia o resección quirúrgica) y preaviso al equipo del VHIR y al equipo de ICO-IDIBELL/Xenopat.
- Obtención de la muestra. Desde quirófano, aviso inmediato al equipo del VHIR, quienes llevan el tejido en fresco en mano hasta Anatomía Patológica, con la finalidad de reducir el tiempo que transcurre desde la obtención de la muestra y de valorar la muestra de mayor calidad (tumor viable) mediante examen macroscópico de las piezas de resección. En el caso de muestras obtenidas mediante biopsia percutánea (de pequeño tamaño), el equipo de Patólogas distribuye el material disponible, estableciendo el siguiente orden de priorización: 1. Diagnóstico clínico, 2. Secuenciación de la muestra tumoral (de considerarse necesaria), 3. Generación de modelos, 4. Congelación de tejido sobrante para biobanco del Hospital Vall d'Hebron.
- De confirmarse la disponibilidad de material para PDX, el equipo de ICO-IDIBELL/Xenopat se desplaza hasta el VHIR para recoger la muestra en fresco y proceder a su implante en sus instalaciones en el mínimo tiempo posible.
- Los animales implantados se mantienen vivos hasta que se confirma el crecimiento del tumor en el ratón, momento en que se sacrifican y se procede a implantar el

MATERIAL Y MÉTODOS

tumor crecido (Pase 1) en otros ratones con el objetivo de perpetuar el tumor/modelo (Pase 2 y sucesivos). Además, en paralelo, se procesa parte de la muestra para estudio histopatológico, se congela tejido para estudios moleculares, y una parte se criopreserva como tejido vivo viable. Los ratones implantados con los tumores en los que no se ha identificado crecimiento tumoral se han mantenido vivos un mínimo de 9 y un máximo de 12 meses, en un intento de conseguir el crecimiento del tumor.

- Las muestras de *xenografts* incluidas en parafina y las laminillas teñidas con hematoxilina-eosina procesadas en ICO-IDIBELL/Xenopat, son enviadas al Hospital Vall d'Hebron para completar los estudios anatomo-patológicos y la caracterización comparativa respecto al tumor original del que derivan, y que está custodiado en el Servicio de Anatomía Patológica del Vall d'Hebron.

2.2.1.1 Selección de los pacientes

Se incluyeron pacientes menores de 21 años, con tumores de alto riesgo (supervivencia esperada inferior al 30%), así como pacientes en recaída o progresión. A la hora de establecer modelos PDX, también se incluyeron algunos tumores que, aunque presentan un mejor pronóstico, son poco frecuentes y para los cuales existen pocas o nulas líneas de tratamiento en caso de recaída tras recibir el tratamiento estándar. Para la generación de los modelos, aunque inicialmente sólo se incluyeron tumores extracraneales, dadas las dificultades de generar modelos ortotópicos quirúrgicos en el sistema nervioso central, posteriormente, tras la adquisición de nuevas habilidades técnicas de implantación por parte del referente en el desarrollo de los modelos (Dr. Alberto Villanueva), se decidió incluir algunos casos de tumores cerebrales y oftálmicos.

2.2.1.2 Obtención de la muestra y detalle de las técnicas quirúrgicas

Las muestras se obtuvieron al diagnóstico (para la mayoría de las histologías) o tras completar tratamiento neoadyuvante (por ejemplo, en los nefroblastomas), así como en

MATERIAL Y MÉTODOS

las recaídas y progresiones, siempre tras discutir la indicación en el Comité Multidisciplinar de Tumores Sólidos Extracraneales. El protocolo para el uso de la muestra se revisó y aprobó de acuerdo con el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los tutores legales del paciente para implantar el tumor en ratones.

Las muestras se obtuvieron por dos vías:

- Quirúrgica: Corresponde a fragmentos tumorales obtenidos tras la resección o biopsia quirúrgica. Las técnicas quirúrgicas oncológicas que se practicaron se han detallado previamente (apartado 0.2. de la Introducción), e incluyen abordajes convencionales (abiertos) y mínimamente invasivos. Las técnicas empleadas por otras especialidades quirúrgicas (Oftalmología, Neurocirugía, Traumatología, etc.) no presentan particularidades significativas a los efectos del estudio, y van más allá del objetivo de esta tesis.
- Percutánea: Las biopsias percutáneas fueron obtenidas por el equipo de Radiología Pediátrica, en coordinación con el equipo de Cirugía Pediátrica en la mayoría de las ocasiones. El procedimiento consiste en la realización de una o varias pruebas de imagen, la identificación del área tumoral más accesible, más representativa y viable (evitando en lo posible zonas necróticas o quísticas) y que comporte tanto el menor riesgo de complicaciones para el paciente como de producir diseminación tumoral. Mediante ecografía (o más raramente, TAC), se dirige una aguja gruesa coaxial, a través de la cual se introduce una segunda aguja con sistema Tru-Cut® (el cual consta de una aguja gruesa, un obturador y una aguja externa hueca), que realiza disparos con los que se obtienen varios cilindros. Se emplearon agujas Tru-Cut® de calibres 18G, 16G y 14G, conforme a las recomendaciones pediátricas (según el tipo tumoral y el tamaño de la masa, entre otros factores), con una longitud entre 1-2cm. Se obtuvieron tantos cilindros como se pudieron conseguir con seguridad para el paciente, estando el límite en el criterio de la persona que realizaba la técnica (mínimo de 2 cilindros, máximo de 10). Las muestras se remitieron en fresco al servicio de Anatomía Patológica en suero fisiológico, para su inmediata selección.

MATERIAL Y MÉTODOS

A la hora de distribuir las muestras obtenidas, se mantuvo el orden de priorización previamente definido: 1. Diagnóstico, 2. Secuenciación, 3. Generación de PDX (se remitieron 1 o 2 cilindros).

2.2.1.2 Restricciones durante el periodo de estudio

Durante el periodo de estudio, sucedieron dos hechos importantes que hay que mencionar y afectaron de forma importante, aunque temporal, nuestra capacidad de generar nuevos modelos:

- Pandemia por SARS-Cov2: Desde el inicio de las restricciones por la pandemia (Estado de Alarma), en marzo de 2020 hasta junio de 2020, el Servicio de Anatomía Patológica prohibió el envío de muestras tumorales en fresco por motivos de bioseguridad. Estas restricciones afectaron también a los animalarios, y fueron ampliadas hasta mediados/finales de septiembre del 2020, prohibiendo la implantación de tejidos frescos humanos (pediátricos y no pediátricos). Estas prohibiciones sanitarias impidieron la implantación de nuevos tumores transitoriamente. Sin embargo, durante este periodo de tiempo, se pudo mantener vivos a los animales con tumores implantados con anterioridad a la emergencia sanitaria, y realizar pases sucesivos a otros animales, aunque en un número bastante limitado.
- En los últimos años se ha ido extendiendo por los animalarios de muchos centros de investigación una infección por *Corynebacterium bovis* que también ha obligado a frenar la implantación de nuevos modelos durante algunos periodos de la realización de esta tesis. De forma bastante residual, fue preciso sacrificar algunos ratones implantados con tumores pediátricos a causa de la infección. Este hecho nos hizo perder tres modelos diferentes que estaban creciendo en animales.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.1.3 Procesado de la muestra para su implantación en ratones

Las muestras tumorales obtenidas en el quirófano se remitieron en fresco al laboratorio de ICO-IDIBELL/Xenopat, en un recipiente estéril en medio de DMEM (medio *Eagle* modificado de *Dulbecco*) rico en glucosa, L-glutamina y suplementado con antibióticos (5 mM penicilina/estreptomicina) y suero bovino fetal (FBS) al 10% (*Hyclone, Logan, UT, USA*), o bien en medio IMDM (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific*) suplementado con FBS al 20% (*South America Premium, Biowest*), 1% de suplemento de insulina-transferrina-selenio más 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific*) y 5 µg/ml de plasmocina (*InvivoGen*).

Todas las muestras recogidas en condiciones estériles para ser implantadas se mantuvieron a temperatura ambiente, y las implantaciones quirúrgicas se realizaron mayoritariamente en los ratones atípicos en el mismo día de la obtención de la muestra. Cuando se produjeron problemas logísticos, tanto por parte de los equipos clínicos (intervención urgente, horario no reglado para recogida de muestra, etc..) como del personal implicado en la implantación del tumor en el ratón, la implantación se realizó al día siguiente.

2.2.2 Técnica de implantación de los PDX

2.2.2.1 Descripción del modelo animal

La generación de los modelos PDOX se llevó a cabo en el Animalario del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), una instalación de última generación. El material que entra a la zona libre de patógenos específicos (SPF) se somete a autoclavado. El personal cuenta con todas las capacidades técnicas y legales para trabajar con modelos animales. El animalario está acreditado por la AAALAC (*International Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care*) (Unidad 1155).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los roedores se alojaron en jaulas ventiladas individualmente en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, a 21-23°C y 40%-60% de humedad, de acuerdo con los parámetros ambientales adecuados recomendados por FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*). En cada jaula había un máximo de 5 ratones y solo se individualizaron si se producían episodios de agresión (aislando al ratón agresor), lo que sucede sobre todo con ratones macho y en determinadas estaciones del año. Se les permitió acceso libre a una dieta irradiada y a agua esterilizada.

Todos los procedimientos quirúrgicos en animales se realizaron bajo el amparo del "Procedimiento 9111", aprobado por la Generalitat de Catalunya y del que es investigador principal/responsable uno de los codirectores de esta tesis, el Dr. Alberto Villanueva. Los experimentos se realizaron de acuerdo con las guías de Conducta Ética en el Cuidado y Uso de Animales, como se establece en las Guías Internacionales de Principios para la Investigación Biomédica con Animales, desarrollados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas.

Para la realización de esta tesis, en todos los experimentos se aplicaron los criterios de las 3 R, y se utilizaron ratones macho y hembra, para mantener el equilibrio por sexos. Mayoritariamente (80%) se usaron ratones atípicos cepa: Crl:NU-*Foxn1^{nu}* (ENVIGO), y en una menor proporción (20%) – basada en la disponibilidad en el animalario - se usaron ratones de la cepa NSG: NOD.Cg-*Prkdcscid Il2rg^{tm1Wjl}*/SzJ (HARLAM/JACKSON LAB), con autorización de las compañías para la cría en el estabulario.

Los ratones utilizados para la implantación de los tumores tenían un mínimo 6 semanas de vida, y para el implante primario del tumor nunca se utilizaron ratones mayores de 10 semanas, independientemente de la cepa utilizada. Para todas las muestras implantadas se priorizó la implantación ortotópica, y solo en los casos en los que dispusimos de material suficiente se hizo también implantación subcutánea y excepcionalmente, cuando la logística necesaria para la implantación ortotópica no estaba disponible. De igual forma, se priorizó la cepa de ratones atípicos comprados sobre la de NSG, y esta última se usó cuando había suficiente material sobrante y había ratones disponibles de cría del estabulario de estas características.

MATERIAL Y MÉTODOS

El hecho de utilizar dos cepas de ratones y dos aproximaciones de implantación (ortotópica y subcutánea, en algunos casos) responde a la intención de maximizar las posibilidades de implantación/crecimiento del tumor primario del niño. Los ratones atípicos o *nude* no tienen pelo y son deficientes para células T, pero tienen células B funcionales, mientras que los ratones NSG tienen pelo, son albinos y están mucho más inmunosuprimidos. En la siguiente tabla se pueden apreciar las características de las cepas desde un punto de vista inmunológico:



Nombre Común	NSG	Atípicos ("Nude")
Nomenclatura completa	NOD.Cg- <i>Prkdcscid Il2rg</i> ^{tm1Wjl} /SzJ	Crl:NU- <i>Foxn1</i> ^{nu}
Cél. B maduras	Ausente	Presentes
Cél. T maduras	Ausente	Ausentes
Células dendríticas	Defectuosas	Presentes
Macrófagos	Defectuosos	Presentes
Células <i>natural killer</i>	Ausentes	Presentes
Sistema hemolítico del complemento	Ausente	Presente
Fugas	Muy escasa	N/A
Tolerancia a la radiación	Baja	Elevada
Incidencia de tumores espontáneos	Baja	Baja

Tabla 5. comparativa de las cepas utilizadas. N/A: no se aplica
Fugas (en inglés, *leak*): Tendencia a producir algunos linfocitos T y B conforme envejecen.

Para la realización de los procedimientos quirúrgicos, los animales fueron anestesiados con un flujo continuo de mezcla de isoflurano/oxígeno al 2%. Las muestras tumorales, tanto derivadas de pieza quirúrgica como de biopsia, se implantaron sin digestión enzimática, manteniendo la arquitectura y estructura tridimensional de las mismas. La muestra se disgregó mecánicamente sólo en el caso de los tumores o metástasis cerebrales, algunos tumores óseos y de los retinoblastomas, inyectando en la tibia, intracraveal o intraocularmente un volumen de 10-30 µl, aunque en el caso de los retinoblastomas también implantó un fragmento sólido en el ojo. La implantación quirúrgica se realizó en la zona anatómica correspondiente, fijándose el fragmento tumoral (de unos 3x3 mm³) al órgano con una sutura monofilamento no reabsorbible de polipropileno (Prolene®,

MATERIAL Y MÉTODOS

Ethicon) de 7.0. Los actos quirúrgicos fueron específicos para cada localización, pero los podemos resumir de una forma genérica:

- Tumores localizados en la cavidad abdominal o el retroperitoneo: Se practicó una laparotomía paramediana (lateral) para las masas situadas en ovario, riñón y suprarrenales (63) (64) (65), o transversa (medial) a diferentes alturas para el resto de localizaciones (66), como el hígado, la vejiga, o la próstata. En todos los casos se expuso el órgano correspondiente donde implantar el tumor. Por ejemplo, en el caso de hepatoblastomas, hepatocarcinomas y metástasis hepáticas, los ratones se colocaron en posición supina, se desinfectó la piel del área quirúrgica, se realizó una pequeña incisión transversal en la piel (~5–8 mm) en la línea media abdominal (aproximadamente 1 cm por debajo del xifoides), y se accedió a la cavidad peritoneal cortando la capa muscular (~1 cm) a partir de la línea alba en ambas direcciones (~medio centímetro a la derecha y medio a la izquierda). Se exteriorizó el lóbulo izquierdo del hígado (utilizando un hisopo de algodón estéril húmedo empapado en solución salina estéril), y se realizó un pequeño bolsillo con las pinzas curvas de microdissección, para abrir la cápsula hepática en la cara anterior del hígado, anclándose en el bolsillo un fragmento tumoral de 3x3 mm³ con sutura Prolene® 7.0. Posteriormente se reubicó el lóbulo hepático en la cavidad peritoneal retirando el hisopo estéril, cerrándose posteriormente la incisión abdominal con grapas quirúrgicas.
- Tumores de partes blandas localizados en las extremidades: La implantación se hizo en el músculo de la parte superior del muslo de la pierna (67). Para los tumores malignos de la vaina del nervio periférico (MPNST) se hizo una pequeña incisión en el músculo para mostrar el nervio ciático y el tumor se fijó a su superficie y se hizo crecer alrededor del epineuro (68).
- Tumores óseos (osteosarcomas, tumores de Ewing y metástasis óseas): Se siguieron dos aproximaciones distintas de implantación: i) inyección en la tibia mediante inyección infrarrotuliana, para lo cual se disgregó el tumor mecánicamente; y ii) implantación sólida en el hueso mediante la apertura de una ventana en el hueso y posterior fijación del tumor con Prolene® 7.0.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Tumores localizados en la cavidad torácica: Se realizó una toracotomía derecha, para la cual los ratones se situaron en posición de decúbito lateral izquierdo, y se realizó una pequeña incisión transversal de la piel (5-8 mm) en la pared torácica derecha. Los músculos de la pared torácica se separaron mediante disección fría, exponiendo los músculos intercostales, practicándose una incisión intercostal de 2 a 4 mm entre la tercera y cuarta costilla, introduciendo una pequeña pieza de tumor de 2 a 4 mm³ en la cavidad torácica. A lo largo de este trabajo hemos utilizado de forma simultánea, siempre y cuando hemos dispuesto de suficiente material, dos aproximaciones quirúrgicas diferentes: (i) depósito de la muestra tumoral entre el lóbulo pulmonar inferior y el lóbulo medio y (ii) anclaje de la muestra tumoral a la superficie del pulmón con sutura Prolene 7.0. En caso de disponer de poco material siempre se priorizó la segunda aproximación, fijando la muestra/biopsia a la superficie del pulmón. La incisión de la pared torácica (músculo y piel) se cierra con grapas (58).
- Tumores craneales y metástasis cerebrales: La muestra tumoral/biopsia se disgregó mecánicamente en suero salino y se inyectó intracranealmente (10-25 µl de volumen) en la parte posterior derecha de la corteza cerebral con una aguja 25G (69).
- Tumores oculares: Para la implantación de los retinoblastomas se siguieron dos aproximaciones distintas de implantación: i) inyección intraocular de un disgregado mecánico del tumor/biopsia; y ii) se realizó una pequeña incisión en el globo ocular introduciendo un fragmento tumoral muy pequeño, suturándose posteriormente el globo ocular con Prolene® 9.0. (70)
- Tumores subcutáneos y metástasis en la mama: Para los tumores subcutáneos se hizo una pequeña incisión en el tejido subcutáneo del ratón y se introdujo un pequeño fragmento de tumor, cerrándose la incisión con grapas quirúrgicas. La metástasis en la mama de un rabdomiosarcoma se implantó fijando el tumor con Prolene® 7.0 en la almohadilla de grasa mamaria (71).

Después de la cirugía, y siguiendo los protocolos aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA), los animales fueron tratados con analgesia para reducir el

MATERIAL Y MÉTODOS

posible dolor y sufrimiento postquirúrgico. Los ratones se monitorizaron dos veces a la semana para medir su peso corporal y comprobar la evolución.

Dependiendo del lugar de implantación y de las características intrínsecas del tumor primario, los tumores implantados de forma ortotópica se hicieron evidentes a palpación en un periodo de 2 a 6 meses después del injerto. En el caso de tumores implantados en la cavidad torácica y en el cráneo, la falta de movilidad, la pérdida de peso, las alteraciones de los ritmos respiratorios y los problemas de movimiento de los ratones se utilizaron como indicadores del crecimiento del tumor.

De todos los tumores implantados y que crecieron, se tomó muestra al sacrificio del ratón para fijar en formol y hacer estudios histopatológicos, se congeló muestra a -70°C para estudios moleculares, y se criopreservó parte del tumor, como tejido viable, en suero bovino fetal (FBS) al 90 y sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 10 %.

2.2.2.2 Criterios de punto final, procesamiento de las muestras

Para los tumores implantados y crecidos en el tejido subcutáneo, la mama, y los sarcomas de partes blandas musculares, por tanto, fácilmente visibles y medibles con pie de rey, se estableció como criterio de punto final un volumen máximo de 1.500 mm³. También se consideraron criterios de punto final la presencia de ulceraciones o costras y el deterioro clínico significativo (que detallaremos a continuación), aunque los tumores tuvieran un tamaño inferior.

Los tumores implantados de forma ortotópica en la cavidad peritoneal son más difíciles de medir sin el uso de técnicas de imagen avanzadas, se usó el método de palpación. Para ello, establecimos un sistema de clasificación análogo al que el Dr. Alberto Villanueva y su grupo lleva utilizando en los últimos 10 años en la generación de modelos ortotópicos para cánceres de adultos, y que incluye cuatro categorías: T1, T2, T3 y T4, donde T3 equivale a un tamaño de un tumor de aproximadamente 1.000-1.500 mm³, y T4 de aproximadamente 1.500-2.000 mm³. Inicialmente, los ratones se sacrificaron en la categoría T3, y si su bienestar por el crecimiento tumoral no se veía alterado, se sacrificaron en categoría T4.

MATERIAL Y MÉTODOS

De igual forma, si el tumor a palpación presentaba una categoría T1 o T2, pero provocaba malestar animal, aunque el tamaño tumoral fuese pequeño, se procedió al sacrificio del animal.

Para las muestras implantadas en la cavidad torácica, se consideraron criterios de punto final la cianosis, los problemas respiratorios, la inmovilidad y las pérdidas de peso acusadas. Para las muestras implantadas intracranialmente, se consideraron criterios de punto final la inmovilidad, las pérdidas de peso acusadas y la parálisis de las extremidades posteriores. De forma global para todos los tipos tumorales implantados y las diferentes localizaciones, se consideraron criterios de punto final el deterioro agudo en la salud del animal, la caquexia manifiesta, los problemas respiratorios, la falta de movilidad y las pérdidas de peso superiores al 10% en 24 horas.

Tras el sacrificio, se trajeron los órganos para examen, así como el tumor, si este estaba presente. Los tumores injertados se criopreservaron en una solución de FBS no inactivado al 90 % y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (10270, *Thermo Fisher, Gibco*), y se almacenaron en nitrógeno líquido para futuras implantaciones y para análisis moleculares avanzados. Se fijaron fragmentos tumorales representativos y luego se procesaron para su inclusión en parafina. Todos los protocolos con animales fueron revisados y aprobados de acuerdo con el Comité Ético de Experimentación Animal y Cuidado Animal Institucional regional.

2.2.2.3 Perpetuación y conservación de los modelos

En algunos casos se realizaron varios pasos para inmortalizar el modelo y/o realizar experimentos farmacológicos, tanto de medicina personalizada como para desarrollo de nuevos fármacos. Para ello, el tumor crecido en el primer animal (Pase 1) se cortó en pequeños fragmentos y se implantó en serie en 1 a 5 animales nuevos (Pase 2), para perpetuar el modelo y lograr tejido suficiente para llevar a cabo experimentos farmacológicos. Después de cada pase los tumores se congelaron, se incluyeron en parafina y se criopreservaron en una solución de DMSO al 10% y FBS no activado al 90% (10270, *Thermo Fisher, Gibco*).

MATERIAL Y MÉTODOS

2.2.2.4 Utilización de modelos establecidos para la evaluación de fármacos y estrategias terapéuticas

Durante el periodo de realización de esta tesis se han utilizado varios de los modelos generados para la evaluación preclínica de diversos fármacos y estrategias terapéuticas. Estos experimentos se han realizado en colaboración con otros investigadores básicos del Programa COMIK del Vall d'Hebron, así como con otros investigadores del campo de la pediatría oncológica. En este sentido, destacamos cuatro trabajos, tres de ellos publicados y un cuarto en vías de publicación. Estos artículos aparecen al final de esta tesis (Anexo II) como artículos de colaboración y en ellos, los modelos generados han sido muy importantes para validar las hipótesis y los resultados. Resaltamos los modelos utilizados en las siguientes publicaciones, en las cuales colabora como coautora la doctoranda:

- I. Metástasis mamaria de un Rhabdomiosarcoma (modelo VH-PDOX-RMS2). MEK and MCL-1 sequential inhibition synergize to enhance rhabdomyosarcoma treatment. Alcon C, Martín F, Prada E, Mora J, Soriano A, Guillén G, Gallego S, Roma J, Samitier J, Villanueva A, Montero J. Cell Death Discov. 2022 Apr 7;8(1):172. doi: 10.1038/s41420-022-00959-w
- II. Neuroblastoma suprarrenal (modelo VH-PDOX-NB5). The oral KIF11 inhibitor 4SC-205 exhibits antitumor activity and potentiates standard and targeted therapies in primary and metastatic neuroblastoma models. Masanas M, Masiá N, Suárez-Cabrera L, Olivan M, Soriano A, Majem B, Devis-Jauregui L, Burgos-Panadero R, Jiménez C, Rodriguez-Sodupe P, Boloix A, Toledano I, Guillén G, Navarro A, Llobet-Navas D, Villanueva A, Sánchez de Toledo J, Roma J, Noguera R, Moreno L, Krauss R, Gallego S, Santamaría A, Segura MF. Clin Transl Med. 2021 Oct;11(10):e533. doi: 10.1002/ctm2.533
- III. Rhabdomiosarcoma embrionario (modelo VH-PDOX-RMS3). Sequential combinations of chemotherapeutic agents with BH3 mimetics to treat rhabdomyosarcoma and avoid resistance. Alcon C, Manzano-Muñoz A, Prada E, Mora J, Soriano A, Guillén G, Gallego S, Roma J, Samitier J, Villanueva A, Montero J. Cell Death Dis. 2020 Aug 15;11(8):634. doi: 10.1038/s41419-020-02887-y

MATERIAL Y MÉTODOS

IV. Tumores Rabdoides procedentes de tres pacientes diferentes (modelos VH-PDOX-MRT2, VH-PDOX-MRT3, primario del VH-PDOX-MRT4 y su metástasis pulmonar VH-PDOX-MRT5). Actualmente, en colaboración con el Dr. Octavio Romero y la Dra. Montserrat Sánchez-Céspedes del Institut Josep Carreras (IJC) de Badalona, estamos desarrollando una colaboración para evaluar el potencial de una nueva estrategia terapéutica a nivel preclínico en estos 4 modelos. Este trabajo que está en proceso de escritura.

A continuación, planteamos el esquema básico que hemos seguido para la realización de uno de estos experimentos de evaluación preclínica de fármacos en uno de los PDOX generados, concretamente el publicado en el artículo III. Los demás esquemas experimentales se pueden consultar en la sección de Material y Métodos de los otros artículos publicados:

- Se sacrificó un ratón correspondiente al modelo VH-PDOX-RMS3 que crecía ortotópicamente en la parte superior del muslo de la pierna derecha (fruto del segundo pase). Se recolectaron los tumores y se cortaron en pequeños fragmentos de 4 x 4 mm³, y a su vez, estos fragmentos tumorales se reimplantaron en 20 ratones jóvenes. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño homogéneo (1200 a 1500 mm³), los ratones se asignaron aleatoriamente a los diferentes grupos de tratamiento (n=4/grupo): i) Placebo; ii) ABT-199 (100mg/kg); iii) vincristina (1 mg/kg), iv) S63845 (20 mg/kg); y v) vincristina (1 mg/kg) combinada con S63845 (20 mg/kg).

Se administraron por vía intravenosa mediante inyección en la vena de la cola la vincristina (1 vez a la semana, 3 semanas consecutivas) y el S63845 (tres días consecutivos a la semana, 2 semanas consecutivas). El ABT-199 se administró diariamente por sonda oral durante 21 días. Después del inicio del tratamiento, los tumores se midieron con un calibrador cada 2 o 3 días y el volumen del tumor se calculó mediante la fórmula $v = (w^2 \times l) / 2$, donde "l" es el diámetro más largo (*length*) y "w" el ancho (*width*). Los tratamientos se llevaron a cabo

MATERIAL Y MÉTODOS

durante un período de tres semanas, momento en que los animales fueron sacrificados. En el momento del sacrificio, se diseccionó el tumor y se pesó. Se congelaron o fijaron fragmentos representativos y luego se procesaron para su inclusión en parafina.

2.3. Caracterización de los modelos: Metodología

2.3.1 Caracterización histológica

Las muestras tumorales procedentes de los pacientes se fijaron en formaldehído al 10% y se incluyeron en parafina. Se tiñeron secciones de 4 µm con hematoxilina-eosina-safranina (HES) para determinar la morfología. En todos los casos en que fue posible, se determinaron el porcentaje de necrosis y el índice proliferativo. Para ello, se procesaron después de un procedimiento de recuperación de antígeno inducido por calor utilizando un anticuerpo de ratón anti-Ki67h humano (1:20; *Dako Ref:M075501 clon MIB-1*) y anticuerpos específicos para cada tipo de tumor relevante, visualizados con el kit Klear Mouse DAB (*GBI Labs*) y un microscopio Olympus CX31.

El porcentaje de necrosis se calculó comparando el porcentaje de células tumorales viables frente al de células necróticas en el volumen tumoral total, de acuerdo con el procedimiento estándar.

La inmunohistoquímica (IHQ) para los anticuerpos de sinaptofisina y CD99 se realizó con el kit de detección Optiview DAB (Ref: 06396500001: Ventana Medical Systems, Roche), el cual contiene un amplificador de señal, y para el resto de los anticuerpos con el kit DAB universal UltraView (Ref:760-500: Ventana Medical Systems, Roche). Las IHQ se llevaron a cabo en secciones de tumores procedentes de pacientes y PDX fijadas en formalina e incluidas en parafina, y se tiñeron en el instrumento BenchMark ULTRA. Resumidamente, las muestras se desparafinaron con solución EZ prep (10x), la recuperación de antígenos se realizó usando Cell Conditioning CC1, Prediluted pH 8 y finalmente las muestras se bloquearon con peróxido de hidrógeno al 3%. Los anticuerpos primarios específicos

MATERIAL Y MÉTODOS

utilizados para cada tipo tumoral, así como sus tiempos de incubación, se especifican a continuación en la Tabla 6.

Después de la incubación de los anticuerpos primarios, se dispensó el anticuerpo secundario Universal HRP Multimer, que contiene un cóctel de anticuerpos marcados con peroxidasa (*Horseradish Peroxidase-labeled Antibodies*, HRP), seguido de detección colorimétrica mediante DAB. A continuación, las secciones se contrastaron con hematoxilina y se montaron bajo cubreobjetos.

Se digitalizó una sección representativa única de la tinción de HES y la IHQ de la muestra tumoral del paciente y del modelo animal mediante el escáner Pannoramic 1000 con el software 3DHISTECH® (Budapest, Hungría) utilizando una resolución de 0,24 micrómetros/píxel. Posteriormente se tomaron fotos representativas de las imágenes digitalizadas a 20X (escala indicada en la foto de 100 µm).

La concordancia entre los cortes histológicos procedentes de tumores de pacientes y de PDX se determinó mediante tres criterios: la evaluación del patrón de crecimiento (infiltrativo o expansivo), la morfología celular (célula redonda, fusiforme u otra morfología) y la expresión inmunohistoquímica según tipo tumoral. Consideramos este último criterio como el de mayor peso a la hora de determinar la similitud entre ambas muestras, dado que es indicativo del linaje celular.

Además, y sin considerarlos esenciales para determinar la concordancia, se evaluaron las siguientes características descriptivas:

- Si la tinción inmunohistoquímica específica resultó positiva (entendida como expresión de tinción, a excepción de la tinción de INI-1 que se considera positiva si pierde la expresión normal) se evaluó su patrón de distribución (focal/difuso) y su intensidad (alta, media, baja).
- También se evaluaron la densidad celular intratumoral (alta, media, baja), la presencia o ausencia de pleomorfismo, el porcentaje de necrosis, el índice mitótico y, en los neuroblastomas, el MKI (índice mitosis-cariorrexis).

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de Tumor	Anticuerpo primario	Tipo de anticuerpo	Referencia y casa comercial	Tiempo de incubación
Neuroblastoma	CROMOGRANINA	Mouse monoclonal	LK2H10 (Roche)	16 min
	SINAPTOFISINA	Rabbit Monoclonal	MRQ40 (Roche)	40 min
Nefroblastoma	Wt1	Mouse monoclonal	6F-H2 (Roche)	1h
Rabdomiosarcoma	Miogenina	Mouse monoclonal	F5D (Roche)	40 min
Tumor rabdoide maligno	INI-1	Mouse monoclonal	MRQ-27 (Roche)	52 min
Osteosarcoma	SATB2	Rabbit Monoclonal	EP281 (Roche)	32 min
Sarcoma de Ewing	CD99	Mouse monoclonal	O13 (Roche)	36 min
	NKX2.2	Mouse monoclonal	EP336 (Roche)	1h
Hepatoblastoma	HEPATOCITE	Mouse monoclonal	OCH1E5 (Roche)	28 min
	B-CATENINA	Mouse monoclonal	(14) (Roche)	28 min
DSRCT	AE1/AE3	Mouse monoclonal	AE1/AE3 (Roche)	20 min
	DESMINA	Mouse monoclonal	D33 (Roche)	44 min
Retinoblastoma	SINAPTOFISINA	Rabbit Monoclonal	MRQ40 (Roche)	40 min
Disgerminoma	PLAP	Mouse monoclonal	NB10 (Roche)	32 min
Sarcoma cél claras	VIMENTINA	Polyclonal	(V9) (Roche)	20 min
	CD56	Rabbit Monoclonal	MRQ42 (Roche)	32 min
SARCOMA INDIFERENCIADO	VIMENTINA	Polyclonal	(V9) (Roche)	20 min
TMVN	S100	Polyclonal	(Roche)	16 min
	HISTONA-3	Rabbit Monoclonal	RM175 (Cell Signalling)	Dil. 1/1000 incuba 32 min

Tabla 6. Anticuerpos utilizados para la caracterización histológica por tipo tumoral. DSRCT: Tumor desmoplásico de célula redonda pequeña (*Desmoplastic Small Cell Round Tumor*), TMVN: Tumor maligno de la vaina nerviosa (también MPNST: *malignant peripheral nerve sheath tumor*)

MATERIAL Y MÉTODOS

2.3.2 Caracterización genómica

Aunque el planteamiento inicial de este trabajo contemplaba realizar la secuenciación del exoma (WES) comparativa de forma pareada entre el tumor primario y el PDOX, debido a una cuestión económica no ha sido posible realizarla para la mayoría de los modelos. Dada la limitación de los recursos disponibles, se priorizó la realización del WES en los tumores primarios, ya que esta es esencial para determinar las alteraciones moleculares y realizar recomendaciones terapéuticas basadas en estos hallazgos que permitan el acceso de los pacientes a nuevas oportunidades terapéuticas en ensayos clínicos. Durante el periodo de estudio, los pacientes se secuenciaron a través de los dos programas activos de medicina personalizada:

- COMIK: El programa propio del Servicio de Oncohematología Pediátrica del Hospital Vall d'Hebron.
- MAPPYACTS: El programa internacional liderado por el Instituto Gustave Roussy (París, Francia), en el que el Hospital Vall d'Hebron participó en los años 2019 y 2020.

El WES se realizó en la empresa Qgenomics para todos los pacientes incluidos en COMIK (22 muestras secuenciadas de las 46 que generaron modelos PDOX) y en el CNAG (Centro Nacional de Análisis Genómico) para todos los pacientes incluidos en MAPPYACTS (4 muestras secuenciadas de las 46 que generaron modelos PDOX). En el caso de MAPPYACTS también se realizó RNAseq cuando fue posible.

Whole Exome Sequencing

El ADN genómico (ADNg) del tumor congelado y de las muestras de sangre del paciente se extrajo con el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor. La cuantificación del ADN se realizó mediante Qubit (Thermo Fisher Scientific) y la calidad de la muestra se comprobó valorando la integridad del ADN por electroforesis. Para llevar a cabo la secuenciación del exoma, el ADNg se fragmentó y se preparó la librería utilizando el kit KAPA library (Roche), se hibridó con el kit de captura SeqCap EZ MedExome

MATERIAL Y MÉTODOS

(Roche) y se secuenció en el secuenciador NextSeq500 (Illumina) para producir lecturas de 2x150 pares de bases para alcanzar una profundidad de cobertura media de 55-65X para el ADNg germinal y 200X para el ADNg del tumor.

En el análisis bioinformático se incluyó la detección de variantes del número de copias (CNV), variantes de un solo nucleótido (SNV), pequeñas inserciones/delecciones (*indel*) y la carga mutacional del tumor (TMB) de muestras somáticas, así como SNV e *indel* de muestras de línea germinal. El primer paso del análisis bioinformático fue alinear las lecturas de secuenciación con el genoma de referencia humano GRCh37 (hg19) mediante la herramienta BWA (72) (73). El control de calidad de las lecturas generadas se realizó con MultiQC v1.7. La llamada de variantes para la identificación de SNV e *indel* se llevó a cabo mediante la herramienta GATK Haplotype Caller (74) junto con FreeBayes y Strelka2 (75) para el ADNg de la línea germinal y mediante la herramienta VarDict (76) junto con MuTect2 (77), Strelka2 y VarScan2 (78) para el ADNg de la línea somática. Se consideraron como fiables las variantes de la línea germinal y somática que se identificaron por al menos dos programas informáticos. Para determinar el efecto de las variantes, utilizamos la anotación SnpEff (79). Otra información incluida en el análisis fue el número de lecturas de la variante, la frecuencia alélica de la variante, la importancia clínica y patológica de la variante en la base de datos ClinVar (80) y la presencia de la variante en la base de datos COSMIC (81). Se usó Control-FREEC (82) para investigar el perfil de alteraciones cromosómicas numéricas y segmentarias y las CNV y la frecuencia del alelo B (BAF). La carga mutacional se calculó según Chalmers et al. 2017 (83) contando todas las SNV e *indels* de la región codificante, incluidas las variantes sinónimas.

Las variantes se filtraron según los siguientes criterios: frecuencia poblacional máxima de la variante <1 %, listado de genes en cáncer, frecuencia alélica de la variante tumoral >10 %, frecuencia alélica de la variante en línea germinal >30 % y la consecuencia de la variante (*missense*, *stop-gained*, *frameshift*, *inframe and splicing*). Las CNV se filtraron según los siguientes criterios: se consideraron amplificaciones cuando el número de copias > 5 y delecciones cuando el número de copias < 1,5. La interpretación de las alteraciones moleculares encontradas se basó en la revisión bibliográfica y plataformas online como

MATERIAL Y MÉTODOS

Cancer Genome Interpreter (84) y Varsome (85) y bases de datos como StJudePortal, cBioPortal, OncoKB y Clinicaltrials.gov. Finalmente, las alteraciones se clasificaron como patogénicas, probablemente patogénicas, variantes de significado incierto, probablemente benigna o benigna (86).

Actualmente, hemos realizado el WES solamente en uno de los modelos PDOX, VH-PDOX-NB5, y estamos en proceso de realizar esta aproximación para todos los PDOX generados en los que el tumor original ha sido también secuenciado, no pudiendo incluir dichos resultados en esta tesis. A modo de ejemplo, presentaremos en la sección de resultados el análisis pareado tumor primario vs. PDOX de un neuroblastoma suprarrenal, publicado en el artículo II (64) anteriormente comentado, *The oral KIF11 inhibitor 4SC-205 exhibits antitumor activity and potentiates standard and targeted therapies in primary and metastatic neuroblastoma models. Clin Transl Med. 2021 Oct;11(10):e533.* El WES del PDOX se realizó del mismo modo que para las muestras del paciente y siguiendo el mismo análisis bioinformático. El único paso adicional que se llevó a cabo para el PDOX fue porque el WES del PDOX tiene lecturas tanto de origen humano como murino, por lo que las lecturas de origen murino podrían dar como resultado falsos positivos en el análisis de mutaciones. Por este motivo, utilizamos el programa Xenofilter del paquete R para eliminar las lecturas de secuencias de origen de ratón y conservar las secuencias humanas (umbral de discrepancia = 8) (87).

RNA Sequencing

Brevemente, para llevar a cabo el RNAseq utilizamos el kit de captura TruSeq Stranded mRNA LT (Illumina) capture kit y lecturas pareadas de 2x75pb, más de 90 millones de lecturas pareadas. Las fusiones se identificaron con el programa bioinformático FusionCatcher.

2.4 Análisis de los resultados y métodos estadísticos empleados

Los datos de interés generados durante el proyecto se depositaron en la base de datos creada específicamente mediante la plataforma REDCap, asegurando su almacenamiento y seguridad. Posteriormente, se exportaron para su análisis mediante R (versión 4.2.2), un software libre ampliamente utilizado en la comunidad científica y referencia en el mundo de la Estadística (88).

En primer lugar, se aplicaron técnicas de estadística descriptiva, con el fin de caracterizar los datos y examinar sus tendencias o distribuciones. En concreto, se calcularon medias, medianas, cuartiles, desviaciones estándar, rangos (mínimos y máximos) y frecuencias o proporciones, en aquellas variables en el estudio, ya sean informativas sobre pacientes, muestras implantadas, PDOX generados o subgrupos de interés.

Por otro lado, la inferencia estadística se basa en métodos que emplean los datos muestrales para hacer generalizaciones o predicciones acerca de una población. La técnica inferencial más aplicada a lo largo de este trabajo es el test Chi-cuadrado de Pearson, una prueba no paramétrica utilizada con la finalidad de estudiar la interdependencia entre dos o más variables a partir de tablas de contingencia. La hipótesis nula (H_0) establece que las variables categóricas no están correlacionadas y, por tanto, las proporciones entre ellas son similares. Su ecuación matemática es la siguiente, donde O_i son valores observados y E_i son valores esperados:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Asimismo, se han introducido correcciones actuales en el desarrollo del test Chi-cuadrado, tales como la corrección de continuidad de Yates para tablas de contingencia 2x2 y tamaños muestrales pequeños, con el objetivo de reducir una sobreestimación de la significancia estadística (89), además de la implementación de simulaciones de Monte Carlo (2000 réplicas) mediante un muestreo aleatorio de las tablas de contingencia para el cálculo de p-valores en situaciones con proporciones desequilibradas o valores iguales a cero (90). En cuanto a la representación gráfica de resultados, se ha utilizado el paquete

MATERIAL Y MÉTODOS

corrplot (91), el cual permite la exploración visual de matrices de correlación, donde se muestran los distintos grupos de variables analizadas mediante el test Chi-cuadrado, así como las tendencias de correlación a través de los valores de residuos de Pearson, calculados como (observado – esperado) / raíz cuadrada (esperado).

En cuanto a inferencia estadística aplicada en variables cuantitativas, los datos sobre necrosis y Ki67 en el tumor del paciente se estudiaron mediante el test U de Mann-Whitney, también denominado suma de rangos de Wilcoxon, el cual consiste en una prueba no paramétrica donde la hipótesis nula (H_0) se interpreta como la igualdad de medianas entre grupos. La ecuación general para el cálculo del estadístico U es la siguiente, donde R es la suma total del grupo y n cada valor por separado:

$$U_1 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$

Por último, a lo largo del trabajo se ha establecido un nivel de significancia estadística igual a 0,05 (p-valores inferiores necesarios para rechazar la hipótesis nula, H_0).

3. RESULTADOS

RESULTADOS

3.1 Análisis de los modelos y resultados de su caracterización

A lo largo de los 7 años del estudio, se han generado un total de 46 modelos PDX ortotópicos (PDOX), también llamados *orthoxenografts*, procedentes de muestras no disgregadas de tumores sólidos pediátricos. Los resultados se detallan a continuación.

3.1.1 Análisis descriptivo

Durante el periodo de estudio, 135 muestras procedentes de 112 pacientes se destinaron a la implantación en ratones para generar modelos PDOX. Las muestras implantadas corresponden a 16 grandes grupos tumorales diferentes. En 90 pacientes se obtuvo 1 sola muestra destinada a la implantación, en 21 pacientes se obtuvieron 2 muestras y en el caso de un paciente se obtuvieron 3 muestras.

Hemos generado un total de 46 modelos PDOX procedentes de 40 pacientes que representan a 14 de los 16 grupos tumorales implantados; no se logró establecer ningún modelo de carcinoma del adulto ni de tumor neuroendocrino. En 34 pacientes se estableció un único modelo PDOX por paciente, mientras que en 6 pacientes pudimos establecer 2 modelos por paciente, procedentes de distintas muestras tumorales. En 5 de estos 6 pacientes los PDOX representan diferentes etapas de la enfermedad.

Modelos del mismo paciente	Mismo momento enfermedad o distinto	Detalle del momento de la enfermedad
VH- PDOX-MRT1 VH- PDOX-MRT2	MISMO	Biopsia al diagnóstico (aguja gruesa) Biopsia al diagnóstico (incisional)
VH- PDOX-OS1 VH- PDOX-OS2	DISTINTO	Recaída, metástasis pulmonar, pre-tratamiento Progresión, metástasis pulmonar, post-tratamiento
VH- PDOX-MRT4 VH- PDOX-MRT5	DISTINTO	Biopsia al diagnóstico (aguja gruesa) Progresión, metástasis pulmonar, post- tratamiento
VH- PDOX-NB1 VH- PDOX-NB3	DISTINTO	Cirugía del tumor primario, post-tratamiento Recaída, cirugía metástasis cerebral, post-tratamiento
VH- PDOX-HB1 VH- PDOX-HB3	DISTINTO	Cirugía del tumor primario, post-tratamiento Recaída, cirugía recidiva local, post-tratamiento
VH- PDOX-HB5 VH- PDOX-B6	DISTINTO	Biopsia al diagnóstico (aguja gruesa) Cirugía del tumor primario, post-tratamiento

Tabla 7. Parejas de modelos PDOX procedentes de un mismo paciente.

RESULTADOS

Los modelos mantienen la estructura tridimensional original, al proceder de muestras no procesadas, y a partir de los mismos se ha generado un banco de tejido criopreservado de tumor vivo, apto para su uso preclínico en un futuro, y de tejido congelado instantáneamente (*snap-frozen*), que se utilizará para estudios moleculares. Algunos de los modelos PDOX generados corresponden a tipos tumorales infrecuentes, con escasa representatividad tanto en modelos preclínicos *in vivo* e *in vitro*, lo que todavía los hace más valiosos.

La edad media de los pacientes en el momento de obtener la muestra fue de 7,5 años (DS 6.1) con un rango de edad de 1 mes a 20 años, y esta distribución se mantiene similar tanto en el grupo de pacientes cuyo PDX se estableció como en el que no. El 40% de las muestras procedían de lactantes o preescolares (menores de 3 años), el 48,9% de niños de 4 a 15 años y un 11,1% de pacientes AYA (mayores de 16 años, adolescentes y adultos jóvenes). La distribución por sexos fue simétrica, con un 50,4% de muestras procedentes de pacientes de sexo femenino y el resto (49,6%) de sexo masculino.

La mayoría de las muestras fueron obtenidas por la Unidad de Cirugía Oncológica Pediátrica de Vall d'Hebron (79,3%), seguida del Servicio de Radiología del mismo hospital (9,6%). El resto, procedieron de otros servicios del centro o de centros externos.

Las muestras procedieron de la resección quirúrgica de los tumores en un 68% de las ocasiones, de biopsias percutáneas con aguja gruesa (Tru-Cut®) en un 28,9% y solo en un 3% de biopsias incisionales.

Proporcionalmente, la mayoría de las muestras implantadas correspondieron a sarcomas (36,3%) y neuroblastomas (24,4%), seguidos de un 14,1% de nefroblastomas y un 11,1% de tumores hepáticos. El restante 14,1% corresponde a una variedad de otros tipos tumorales (tumores germinales, carcinomas del adulto, retinoblastomas, tumores del sistema nervioso central y tumores neuroendocrinos).

La Tabla 7 muestra los tipos de tumores sólidos implantados, junto con el número de PDX establecidos:

RESULTADOS

		Imp.	Est.				Imp.	Est.
	Neuroblastoma	33	6	Hepáticos N = 15	Hepatoblastoma		11	6
	Nefroblastoma	19	9		Hepatocarcinoma		4	1
Sarcomas N = 49	Sarcoma de Ewing	14	3	Otros Tumores N = 19	Tumores germinales		6	1
	Rabdomiosarcoma	10	5		Carcinomas del adulto		5	0
	Osteosarcoma	9	4		Retinoblastoma		3	1
	Otros STS	7	2		Tumores del sistema nervioso central		3	1
	MRT	5	5		Tumores neuroendocrinos		2	0
	Otro sarcoma óseo	1	1					
	DSRCT	3	1				135	46
TOTAL								

Tabla 8. Muestras implantadas y modelos establecidos por tipo tumoral y totales. Imp.: Implantados, Est: Establecidos. STS: Soft tissue sarcomas. MRT: Malignant rhabdoid tumor. DSRCT: Desmoplastic Small Round Cell Tumor

A continuación, detallamos algunos tipos tumorales de la tabla anterior, que engloban varias entidades muy diferentes entre sí:

Grupo Tumoral	Subtipo Tumoral	Muestra VH	Muestras Implantadas	PDX Establecidos
NRSTS	Sarcoma indiferenciado	VH-74	1	1
	MPNST	VH-86	1	1
	Sarcoma sinovial monofásico SYT-SSX2 positivo	VH-19	1	0
	Sarcoma alveolar	VH-25	1	0
	Condrosarcoma	VH-66	1	0
	Sarcoma epitelioide	VH-82	1	0
	GIST wild type	VH-132	1	0
Tumores germinales	Disgerminoma ovárico	VH-85	1	1
	T. células de la granulosa juvenil	VH-6	1	0
	Tumor del seno endodérmico ovárico	VH-26	1	0
	Tumor germinal mixto maligno (seno endodérmico) testicular	VH-43	1	0
	Disgerminoma ovárico	VH-98	1	0
	Disgerminoma ovárico	VH-108	1	0
NET	Carcinoide atípico bronquial	VH-48	1	0
	Paraganglioma maligno	VH-103	1	0
Carcinomas del adulto	Carcinoma renal papilar	VH-5	1	0
	Carcinoma papilar de tiroides	VH-47	1	0
	Carcinoma tímico	VH-90	1	0
	Carcinoma adrenocortical	VH-105	1	0
	Carcinoma papilar de tiroides	VH-110	1	0

Tabla 9. Detalle de algunos grupos tumorales. NRSTS: Sarcomas de partes blandas no rabdomiosarcoma. MPNST: Tumor maligno de la vaina neural periférica. GIST: Tumores estromales gastrointestinales. NET: Tumores neuroendocrinos

La Tabla 10 incluye el porcentaje de éxito en la implantación en función del tipo tumoral. Los datos se exponen en orden decreciente, destacando la elevada tasa de éxito del primo-implante en algunos tipos tumorales (como los MRT) frente a los pobres resultados obtenidos en tumores agresivos y relativamente frecuentes, como es el caso del

RESULTADOS

neuroblastoma o el Sarcoma de Ewing. El gráfico de barras muestra los modelos PDOX establecidos en orden decreciente (de mayor número de modelos a menor) según su histología:

	Tipo tumoral	Imp/Est	% Exito
1º	MRT	5/5	100
2º	Otro S. óseo	1/1	100
3º	Hepatoblastoma	11/6	55
4º	RMS	10/5	50
5º	Nefroblastoma	19/9	47
6º	Osteosarcoma	9/4	44
7º	Retinoblastoma	3/1	33
	T. SNC	3/1	33
	DSRCT	3/1	33
8º	Otro STS	7/2	29
9º	Hepatocarcinoma	4/1	25
10º	Sarcoma Ewing	14/3	21
11º	Neuroblastoma	33/6	18
12º	T. germinales	6/1	17
13º	C. del adulto	5/0	0
	NET	2/0	0

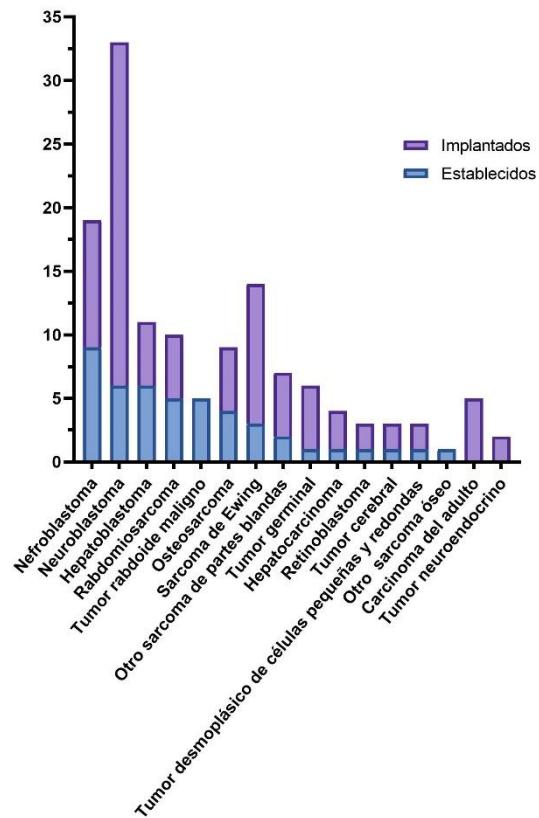


Tabla 10 y Figura 10. Éxito en la implantación de PDOX en función del tipo tumoral.

Cuando los agrupamos en categorías más extensas, la proporción y el porcentaje de éxito son los siguientes:

	Categoría	Imp/Est	% Éxito
1º	Nefroblastomas	19/9	47
2º	Tumores hepáticos	15/7	47
3º	Sarcomas	49/21	43
4º	Neuroblastomas	33/6	18
5º	Otros tipos tumorales	19/3	16

Tabla 11. Éxito en la implantación de PDOX en función del tipo tumoral (agrupado). Imp/Est: Implantados/Establecidos. % Éxito de implantación. Algunas categorías engloban distintos tipos tumorales. Tumores hepáticos: Hepatoblastomas y Hepatocarcinomas. Sarcomas: Óseos (Osteosarcoma, sarcoma de Ewing, Otros), RMS y NRSTS. Otros tipos tumorales: Resto de los tumores incluidos en el estudio que no se enmarcan en las categorías previas.

RESULTADOS

El siguiente gráfico muestra la distribución por histologías.

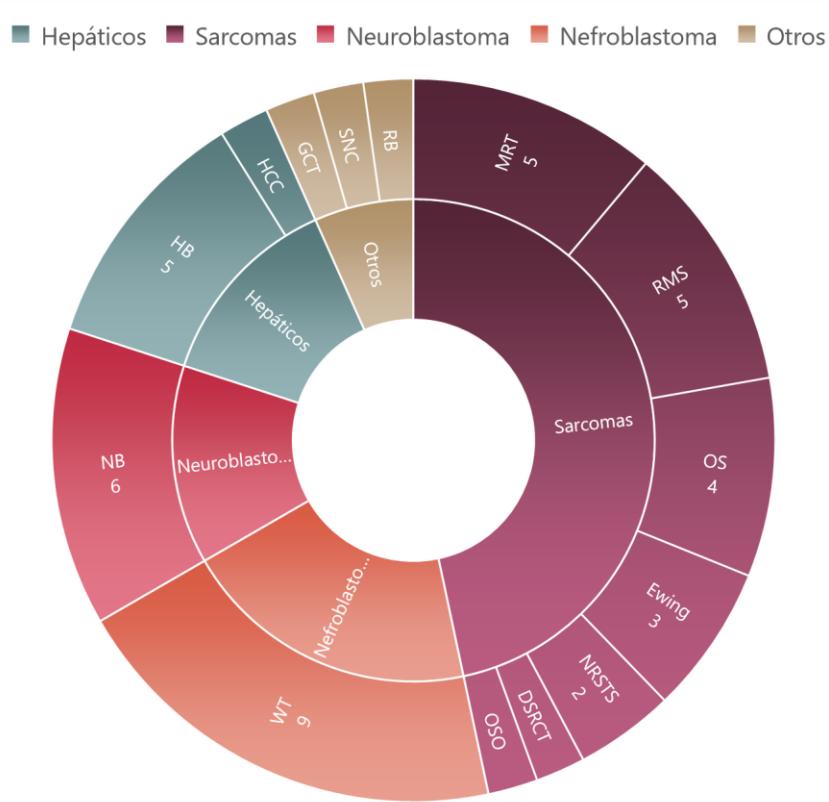


Figura 11. Distribución histológica de los 46 Modelos PDX establecidos. SNC: Sistema nervioso central. GCT: Tumores de células germinales. RB: Retinoblastoma. NB: Neuroblastoma. WT: Nefroblastoma. HB: Hepatoblastoma. HCC: Hepatocarcinoma. MRT: Tumor rabdoide-teratoide. RMS: Rabdomiosarcoma. OS: Osteosarcoma. NRSTS: Sarcomas de partes blandas no-rabdomiosarcoma. DSRCT: Tumor desmoplásico de célula redonda pequeña. OSO: Otros sarcomas óseos. En los subtipos sin numeración, el número de modelos establecidos es uno.

En cuanto a la situación clínica de los pacientes, destacaremos que:

- En el momento de obtener la muestra, un 22,96% de los tumores se consideró de muy alto riesgo, un 46,6% de alto riesgo, un 25,9% de riesgo intermedio y un 4,4% de bajo riesgo.
- El 62,2% de las muestras se obtuvo de pacientes con tumores localizados y un 37,8% de pacientes con tumores metastásicos.
- Un 68,9% de las muestras (93) procedían de pacientes al diagnóstico (50 muestras) o en la primera línea de tratamiento (43 muestras), y un 31,1% (42 muestras) de pacientes en situación de recaída, progresión o refractariedad.

RESULTADOS

Respecto al origen de la muestra, el 80% (108) procedía del tumor primario, frente al 20% (27 muestras) que se obtuvo de metástasis a distancia. Un 40,7% de las muestras se obtuvieron pretratamiento (55 muestras), frente a un 59,3% (80 muestras) que procedieron de tumores tratados (con quimioterapia o radioterapia). En el grupo pretratamiento se incluyen las recaídas tumorales sucedidas meses o años después de haberse considerado al paciente libre de enfermedad. El origen anatómico de las muestras fue el siguiente:

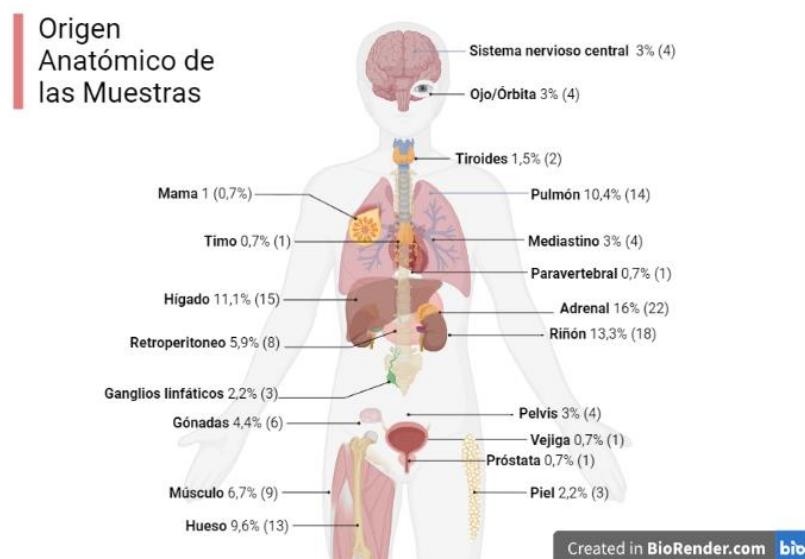


Figura 12. Origen anatómico de las muestras implantadas.

Las localizaciones anatómicas más frecuentes del origen de la muestra fueron, por este orden, la glándula adrenal, el riñón, el hígado y el pulmón. Esto se trasladó, en general, a la zona de implantación en el animal.

La siguiente gráfica muestra la evolución del proceso de implantación en la línea temporal, incluyendo el número de muestras implantadas anualmente, así como el número de modelos generados:



Figura 13. Evolución del proceso de implantación en la línea temporal.

RESULTADOS

La tasa global de éxito en el proceso de implantación fue del 34,1% (46 muestras generaron modelos PDOX), frente al 65,9% (89 muestras) de las que no se logró generar un modelo PDX.

La implantación de las muestras tumorales en los ratones se realizó de manera ortotópica exclusiva en el 45% de los casos (61 muestras), simultáneamente ortotópica y subcutánea en el 50,4% (68 muestras), y únicamente subcutánea en el 4,4% (6 muestras).

De las 129 muestras implantadas ortotópicamente se obtuvieron 45 (34,9%) implantes exitosos, frente a las 74 muestras implantadas en subcutáneo, que resultaron en 13 (17,6%) modelos establecidos. Cuando el tumor creció en ambas localizaciones (12 PDX), se optó por caracterizar y perpetuar el modelo ortotópico.

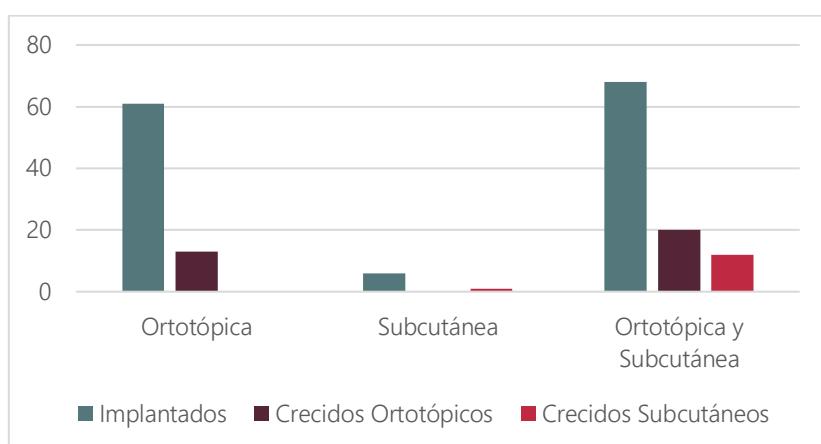


Figura 14. Técnicas de implantación. El eje X representa el tipo de implantación (Ortotópica, Subcutánea, Ambas). El eje Y el número de animales. Leyenda: Número de ratones implantados (verde), Número de tumores ortotópicos crecidos, Número de tumores subcutáneos crecidos.

El 83,7% de las muestras se implantaron en el mismo día de su obtención, el 14,8% el día después y el 1,5% (2 muestras) pasados dos o más días.

Respecto al material tumoral disponible para implantar, el 71,1% de las muestras (96 muestras) corresponde a fragmentos tumorales (procedentes de resección quirúrgica o de biopsias incisionales) frente al 29% de cilindros Tru-Cut® (39 muestras).

Las muestras se implantaron inicialmente en un total de 159 animales y fueron exitosas en 53 de ellos (para algunas muestras se estableció más de un modelo PDX de entrada, pero

RESULTADOS

solo se contabilizó un modelo establecido por muestra). Esto nos da una tasa de éxito en el implante primario del 33,3 % de los ratones.

El 60,7% (82) de las muestras se implantaron solo en ratones atípicos (*nude*), el 21,5% (29) solo en ratones NSG y el 17,8% (24) en ambas cepas de ratones. En total, los modelos resultaron exitosos en 35 animales *nude* (33,01 % de éxito), y en 18 animales NSG (33,96 % de éxito); estas cifras incluyen 7 muestras que crecieron en ambos modelos. En estos 7 casos, en general se optó por perpetuar el modelo *nude*.

Se analizó el tiempo de crecimiento de los modelos en función de algunas variables:

- Primer pase:
 - El tiempo de crecimiento medio (mediana) de los implantes ortotópicos fue de 104 días (rango 40-320 ±69,2) frente a los 90 días (rango 50-70 ± 57,4) de los subcutáneos.
 - El tiempo de crecimiento medio (mediana) en los animales *nude* fue de 94 días (rango 43-320 ± 75,14) y en los animales NSG fue de 90 días (rango 54-270 ± 61,58).
- Segundo pase
 - El tiempo de crecimiento medio (mediana) de los implantes ortotópicos fue de 84 días (rango 50-310, ± 59,9).

3.1.2 Factores asociados al éxito de implantación

Se han analizado separadamente un conjunto de diferentes factores para determinar cuáles pueden influir en el éxito a la hora de establecer los modelos PDX (PDX y subcutáneos). Estos factores se pueden ver resumidos en la Tabla 12.

No resultaron estadísticamente significativos los siguientes parámetros:

- Clasificación de riesgo del paciente al diagnóstico: Se compararon separadamente los grupos muy alto riesgo, alto riesgo, riesgo intermedio/estándar, y bajo riesgo sin hallarse diferencias ($p = 0,057$) (Chi-cuadrado de Pearson con un valor de p simulado, basado en 2000 réplicas). Se agruparon los datos en dos categorías: alto y muy alto riesgo

RESULTADOS

frente a riesgo bajo e intermedio, sin hallarse tampoco diferencias ($p=0,659$) (Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates).

- Tumor al diagnóstico localizado vs. metastásico: No existieron diferencias ($p=1$) (Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates).

- Edad y sexo del paciente: No se apreciaron diferencias entre los grupos de edad lactantes/preescolares, niños hasta 15 años y mayores de 16 años - AYA ($p=0,813$) (Chi-cuadrado de Pearson) ni por sexo biológico ($p=1$) (Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates).

- Muestras procedentes de tumores tratados (quimioterapia, radioterapia) vs. pretratamiento: $p=0,646$ (Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates).

- El tamaño de la muestra tumoral disponible para implantar (fragmento vs. cilindros Trucut) no influyó en el éxito del establecimiento de los modelos: ($p=0,627$) (Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates).

- El momento de implantación de la muestra (en el mismo día frente al día siguiente) ($p=0,326$) (Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates).

- Tipo de cepa empleado (Athymic nude mice vs. NSG) ($p= 1$) (Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates).

- Porcentaje de necrosis en el tumor del paciente: Los porcentajes de necrosis en la muestra tumoral del grupo PDOX crecidos (media 17,2%, mediana 5% $\pm 24,35$) y del grupo no crecidos (media 31,47%, mediana 10% $\pm 37,77$) se compararon mediante el test de Wilcoxon (*Wilcoxon rank sum test*) sin hallar una diferencia significativa ($p = 0,098$).

También se compararon dos grupos con porcentajes de necrosis elegidos al azar frente al éxito de implantación:

- Necrosis mayor o menor del 50%: $p=0,23$ (Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates)

RESULTADOS

- Necrosis mayor o menor del 90%: $p=0,14$ (Chi-cuadrado de Pearson con un valor de p simulado, basado en 2000 réplicas)

Por último, se compararon 3 grupos (necrosis menor del 50%, entre el 50 y el 90%, y mayor del 90%) ($p=0,23$) (Chi-cuadrado de Pearson con un valor de p simulado, basado en 2000 réplicas).

Sí resultaron significativos para el éxito de la implantación los siguientes parámetros:

Los análisis estadísticos de las posibles correlaciones se han acompañado de gráficos de matriz de correlación basada en los residuos de Pearson. En ellos, podemos observar el número de eventos observados en relación con lo esperable. El eje "Y" representa el éxito de implantación (SÍ) y el fracaso (NO) en todos los gráficos. El eje X recoge los grupos analizados. En la gráfica, a mayor área del círculo, mayor es la desproporción entre la cifra esperada y la hallada (y viceversa). De igual forma cuanto más cercano al rojo es el color la cifra es inferior a la esperable, y cuanto más cercano al azul la cifra es superior a lo esperado.

- Clasificación de riesgo del tumor en el momento de obtención de la muestra: La

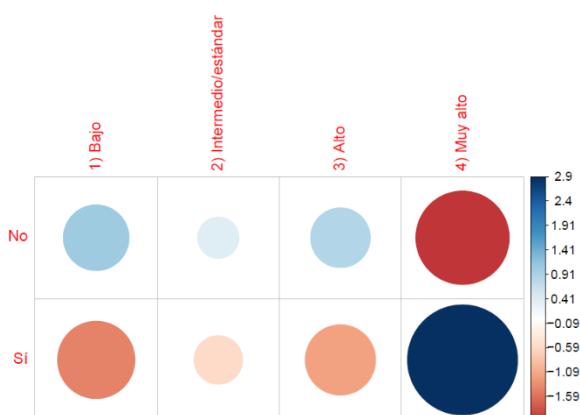


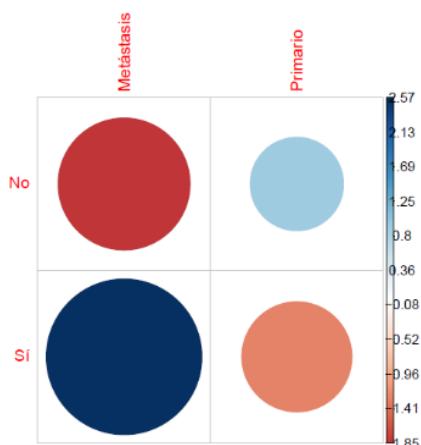
Figura 15. Riesgo al obtener la muestra. Matriz de correlación.

clasificación de riesgo sí resultó significativa a la hora de determinar el éxito de la implantación ($p=0,00049$) (Chi-cuadrado de Pearson con un valor de p simulado, basado en 2000 réplicas). Particularmente, destacó para la categoría "muy alto riesgo", en la que el número de eventos (implantaciones exitosas) fue muy superior al esperado. El eje "Y" representa

el éxito de implantación (SÍ) y el fracaso (NO). El eje X, recoge los grupos de riesgo. Sin embargo, al analizar agrupadamente (alto/muy alto vs. bajo/intermedio), no se observaron diferencias ($p = 0.17$) (Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates).

RESULTADOS

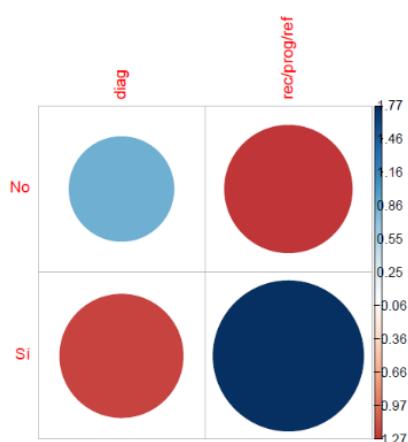
- Muestra procedente de metástasis ($p=0,0009$) frente a muestra procedente del tumor primario (Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates).



De manera análoga a la gráfica anterior, el eje "Y" representa el éxito de implantación (Sí) y el fracaso (NO). El eje X, recoge el origen de la muestra (metástasis o tumor primario)

Figura 16. Metástasis vs Tumor primario. Matriz de correlación.

- Situación clínica del paciente (tumores al diagnóstico o en primera línea de tratamiento vs tumores en recaída, progresión o refractariedad) ($p=0,015$) (Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates).



De manera análoga a la gráfica anterior, el eje "Y" representa el éxito de implantación (Sí) y el fracaso (NO). El eje X, recoge la situación clínica del paciente en el momento de obtención de la muestra (diag = al diagnóstico/1^a línea, rec/prog/ref = recaída, progresión, refractariedad). Se aprecia la tendencia en el grupo diagnóstico a no establecer los modelos, frente a la de sí establecerlos en el grupo de recaída/progresión/refractariedad

Figura 17. Situación clínica. Matriz de correlación.

RESULTADOS

-Tipo de implantación ortotópica ($p=0,013$) frente a subcutánea (Chi-cuadrado de

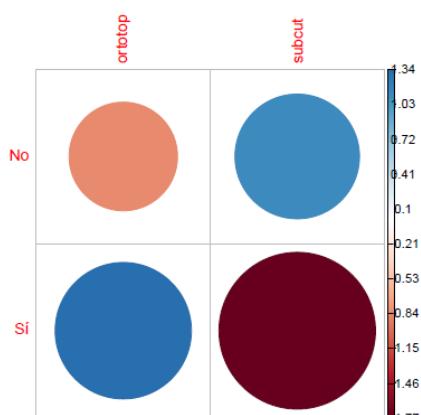


Figura 18. Tipo de implantación.
Matriz de correlación.

Pearson con corrección de continuidad de Yates). En el gráfico podemos apreciar como los implantes subcutáneos crecieron con mucha menor frecuencia de lo esperable.

De manera análoga a la gráfica anterior, el eje "Y" representa el éxito de implantación ("Sí") y el fracaso ("No"). El eje X, recoge el tipo de implante (ortotópico, subcutáneo).

- Ki67 de la muestra tumoral del paciente: La mediana del Ki67 de los tumores establecidos fue mayor que la de los no establecidos. La comparación mediante el test de Wilcoxon (*Wilcoxon rank sum test*) de los valores del índice de proliferación celular en las muestras tumorales de paciente de los PDOX establecidos (mediana 30%, $\pm 29,25$) frente al de las muestras tumorales de los PDOX no establecidos (mediana 15%, $\pm 27,1$), resultó significativa ($p=0,023$).

RESULTADOS

	Total (n= 135)	PDX establecidos (n= 46)	PDX NO establecidos (n = 89)	p-valor
Sexo				
Femenino	68 (50.4)	23 (50.0)	45 (50.5)	1
Masculino	67 (49.6)	23 (50.0)	44 (49.5)	
Extensión al diagnóstico				
Localizado	84 (62.2)	29 (63.0)	55 (61.8)	1
Metastásico	51 (37.8)	17 (37.0)	34 (38.2)	
Riesgo al diagnóstico				
Bajo	5 (3.7)	0 (0.0)	5 (5.6)	0.05747
Intermedio / Estándar	47 (34.8)	16 (34.8)	31 (34.8)	
Alto	68 (50.4)	21 (45.6)	47 (52.8)	
Muy alto	15 (11.1)	9 (19.6)	6 (6.8)	
Riesgo al diagnóstico (Grupos)				
Bajo / Intermedio / Estándar	52 (38.5)	16 (34.8)	36 (40.5)	0.6493
Muy Alto / Alto	83 (61.5)	30 (65.2)	53 (59.5)	
Edad (años) a la biopsia				
Preescolares (0-3 años)	54 (40.0)	19 (41.3)	35 (39.3)	0.8131
Niños (4-15 años)	66 (48.9)	21 (45.7)	45 (50.6)	
Adolescentes y adultos jóvenes (16-21)	15 (11.1)	6 (13.0)	9 (10.1)	
Momento de la obtención de muestra				
Biopsia diagnóstica / cirugía 1ª línea	93 (68.9)	25 (54.3)	68 (76.4)	0.0152
Recaída / Progresión / Refractariedad	42 (31.1)	21 (45.7)	21 (23.6)	
Riesgo momento de obtención de muestra				
Bajo	6 (4.4)	0 (0.0)	6 (6.7)	<0.001
Intermedio / Estándar	35 (25.9)	10 (21.7)	25 (28.1)	
Alto	63 (46.7)	16 (34.8)	47 (52.8)	
Muy alto	31 (23.0)	20 (43.5)	11 (12.4)	
Riesgo momento de obtención de muestra (Grupos)				
Bajo / Intermedio / Estándar	41 (30.4)	10 (21.7)	31 (34.8)	0.1706
Muy Alto / Alto	94 (69.6)	36 (78.3)	58 (65.2)	
Tratamiento recibido				
Pre-tratamiento	55 (40.7)	17 (37.0)	38 (42.7)	0.6466
Post-tratamiento	80 (59.3)	29 (63.0)	51 (57.3)	
Origen de la muestra				
Tumor primario	108 (80.0)	29 (63.0)	79 (88.8)	<0.001
Metástasis	27 (20.0)	17 (37.0)	10 (11.2)	
% Necrosis en la muestra				
Media (Desviación Estándar)	27.8 (28.2)	35.22	31.5 (37.8)	
Mediana (rango)	20.0 (0.0-95)	5 (0.0-93.0)	10.0 (0.0-100)	0.0981
Ki67 en la muestra				
Media (Desviación Estándar)	26.7 (34.4)	35.2 (29.3)	24.3 (27.1)	
Mediana (rango)	10.0 (0.0-100)	30.0 (1.0-95.0)	15.0 (0.0-95.0)	0.0234
Tipo de implantación (n=203) *				
Ortotópica	129 (63.5)	45 (77.6)	84 (57.9)	0.01362
Subcutánea	74 (36.5)	13 (22.4)	61 (42.1)	
Tipo de ratón (n=159) *				
Atímico	106 (66.7)	35 (66.0)	71 (67.0)	1
NGS	53 (33.3)	18 (34.0)	35 (33.0)	
Tipo de muestra implantada				
Fragmento	96 (71.1)	31 (67.4)	65 (73.0)	0.6275
Trucut	39 (28.9)	15 (32.6)	24 (27.0)	
Tiempo hasta la implantación				
Mismo día	113 (83.7)	41 (89.1)	72 (80.9)	0.3263
Día después u otro día	22 (16.3)	5 (10.9)	17 (19.1)	
Seguimiento				
Eventos** después de la obtención de la muestra	55 (40.7)	26 (56.5)	29 (32.6)	0.01249
No eventos** después de la muestra	80 (59.3)	20 (43.5)	60 (67.4)	
Supervivencia				
Exitus después de la obtención de la muestra	45 (33.3)	24 (52.2)	21 (23.6)	0.001656
No exitus después de la muestra	90 (66.7)	22 (47.8)	68 (76.40)	

Tabla 12. Análisis de los posibles factores que influyen en el éxito de establecimiento de los modelos.

RESULTADOS

* Cada una de las 135 muestras puede haberse implantado en más de un formato y más de un ratón. Por tanto, la n de Tipo de implantación y Tipo de ratón es mayor a la n total de muestras del estudio.

** Eventos: Recaída/Progresión/Refractariedad

3.1.3 Caracterización histológica

Una de las patólogas expertas en tumores pediátricos del Hospital Vall d'Hebron (Dra. Alexandra Navarro) realizó comparativas entre el tumor original y el tumor desarrollado en los PDOX. Los resultados del estudio comparativo de cada uno de los modelos se detallan en las siguientes fichas (Anexo III).

Dichas fichas recogen las principales características analizadas en el estudio realizado mediante la tinción de hematoxilina-eosina (H&E) y las tinciones inmunohistoquímicas (IHQ) tanto del tumor original como del PDOX, acompañadas de fotografías representativas de las mismas. Los elementos concordantes se señalan en color verde, y los discordantes en naranja. Al pie de la ficha, se identifica el anticuerpo inmunohistoquímico seleccionado en cada caso (en función del más representativo en el tumor original del paciente).

VH- ...	PACIENTE	PDOX
Histología		
Patrón de crecimiento		
Citomorfología		
Densidad celular		
Pleomorfismo		
Mitosis		
Necrosis		
Positiva / Negativa		
Patrón		
Intensidad		
H&E		
IHQ		
Concordante		
No concordante		

Figura 19. Muestra de las fichas estandarizadas para reflejar el estudio histológico comparativo de cada modelo PDOX establecido.

Este análisis histológico comparativo fue factible en 41 modelos de 46, y los resultados conjuntos de dicha caracterización comparativa se resumen en la Tabla 13. El análisis

RESULTADOS

detallado de los resultados reflejados en esta tabla se desarrolla en el apartado “3.2 Análisis de los modelos por tipo tumoral” de la presente tesis doctoral.

Tras el análisis de diferentes aspectos tumorales, se concluyó que 40 de los 41 modelos comparados (97,6%) fueron mayoritariamente concordantes con el tumor de procedencia. La arquitectura fue concordante en el 75% de los modelos evaluados, la citomorfología en el 87,8% y la inmunohistoquímica, en el 92,5%. Sólo se consideró discordante un modelo, correspondiente a un MPNST (VH-PDOX-NRSTS2), en el que las diferencias en arquitectura y citomorfología eran tan significativas que no se pudo constatar (en ausencia de estudios moleculares) que se tratase del mismo tumor que la muestra original.

En el resto de los modelos existieron pequeñas discordancias, pero que globalmente no ponían en duda la identificación del tumor xenoinjertado como análogo del tumor del que procedía originalmente.

VH-PDOX-HB5	PACIENTE	PDOX
Histología	Hepatoblastoma epitelial	Hepatoblastoma
H&E	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Moderada
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	2
	Necrosis	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Local
	Intensidad	Débil
H&E		
IHQ (*)		

VH-PDOX-NRSTS2	PACIENTE	PDOX
Histología	Tumor maligno de la vaina del nervio periférico (MPNST)	ND
H&E	Patrón de crecimiento	Infiltrativo
	Citomorfología	Célula fusiforme
	Densidad celular	Moderada
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	6
	Necrosis	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Local
	Intensidad	Moderada
H&E		
IHQ (*)		

Figura 20. Izquierda, ejemplo de modelo completamente concordante (VH-PDOX-HB5). Derecha, único modelo discordante de los 41 estudiados comparativamente (VH-PDOX-NRSTS2). Esta discordancia deberá confirmarse mediante futuros estudios moleculares.

RESULTADOS

Diagnóstico	Modelos establecidos y estudiados	Evaluación histológica	Arquitectura	Citomorfología	IHQ	Concordancia Global
Nefroblastoma	8	Concordante	8	7	7	8/8
		Discordante	-	1	1	
		No evaluable	-	-	-	
Hepatoblastoma	6	Concordante	3	5	5	6/6
		Discordante	2	1	1	
		No evaluable	1	-	-	
Hepatocarcinoma	1	Concordante	1	1	-	1/1
		Discordante	-	-	1	
		No evaluable	-	-	-	
Neuroblastoma	6	Concordante	5	5	6	6/6
		Discordante	1	1	-	
		No evaluable	-	-	-	
MRT	5	Concordante	3	5	5	5/5
		Discordante	2	-	-	
		No evaluable	-	-	-	
Rabdomiosarcoma	4	Concordante	2	3	4	4/4
		Discordante	2	1	1	
		No evaluable	-	-	-	
DSRCT	1	Concordante	-	1	1	1/1
		Discordante	1	-	-	
		No evaluable	-	-	-	
Sarcoma indiferenciado	1	Concordante	1	1	1	1/1
		Discordante	-	-	-	
		No evaluable	-	-	-	
MPNST	1	Concordante	-	-	1	0/1
		Discordante	1	1	-	
		No evaluable	-	-	-	
Osteosarcoma	4	Concordante	4	4	4	4/4
		Discordante	-	-	-	
		No evaluable	-	-	-	
Sarcoma de Ewing	1	Concordante	-	1	1	1/1
		Discordante	1	-	-	
		No evaluable	-	-	-	
Retinoblastoma	1	Concordante	1	1	1	1/1
		Discordante	-	-	-	
		No evaluable	-	-	-	
Meduloblastoma	1	Concordante	1	1	-	1/1
		Discordante	-	-	-	
		No evaluable	-	-	1	
Disgerminoma	1	Concordante	1	1	1	1/1
		Discordante	-	-	-	
		No evaluable	-	-	-	
TOTAL	41	Concordante	30	36	37	40/41
		Discordante	10	5	3	
		No evaluable	1	0	1	

Tabla 13. Resumen del análisis histológico comparativo entre los tumores originales y los PDOX por grupos tumorales.

RESULTADOS

Las discordancias más habituales en algunas de las categorías se debieron principalmente a dos motivos:

- Crecimiento del componente más inmaduro del tumor, sin representatividad de las áreas más maduras.

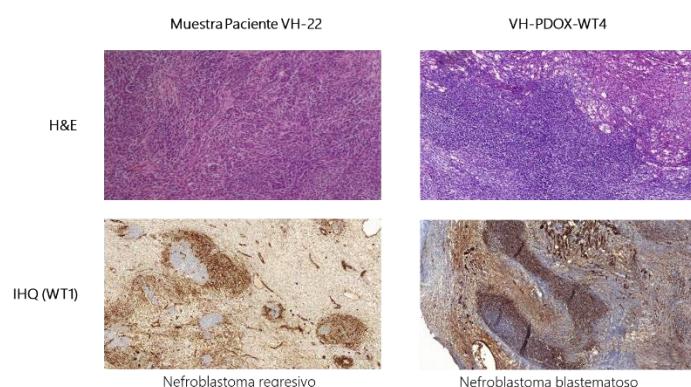


Figura 21. Ejemplo de crecimiento del componente más inmaduro (blastematoso, expresión nuclear difusa) en el PDOX originado de un nefroblastoma regresivo en el paciente.

- Pérdida de algunas características distintivas del tumor original, resultando en el crecimiento tumores indiferenciados, pero manteniendo las características inmunohistoquímicas esenciales del tumor de origen.

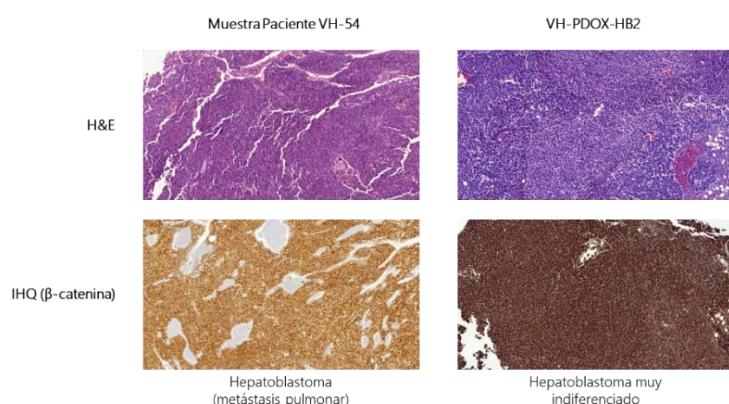


Figura 22. Ejemplo de crecimiento desdiferenciado (hepatoblastoma indiferenciado) en el PDOX originado de una metástasis pulmonar de hepatoblastoma.

Además, observamos que, en general, la densidad celular fue más alta en los modelos PDOX que en los tumores originales, y en algunos casos, cambió el patrón de inmunohistoquímica (de local a difuso, y viceversa). La comparación de la necrosis entre el tumor original y el PDOX fue en general poco valorable, ya que la mayoría de los tumores de los pacientes estaban tratados. Igualmente, la comparación del patrón de crecimiento

RESULTADOS

(infiltrativo frente a expansivo) a veces resultó poco fiable por haberse procesado para su examen en el PDX el tejido sano circundante.

A continuación, se exponen algunas imágenes a modo de ejemplo:

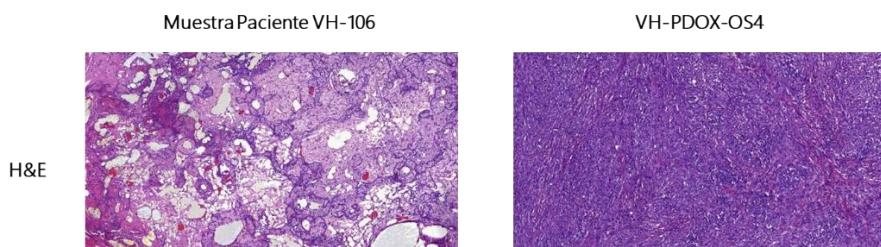


Figura 23. Metástasis pulmonar de osteosarcoma en el paciente, con densidad celular baja, que en el PDOX pasa a tener una densidad alta.

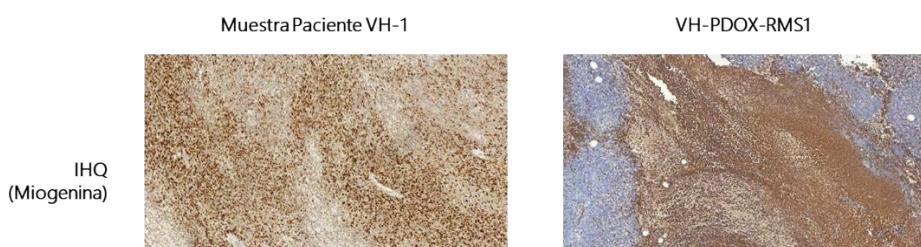


Figura 24. Rabdomiosarcoma embrionario con patrón IHQ difuso para miogenina en el paciente, que en el PDOX pasa a tener un patrón focal.

En los 5 modelos restantes, no fue posible realizar el estudio comparativo: i) en 3 modelos por no disponer de material almacenado del tumor original (el material estaba agotado por remitirse a un ensayo clínico o el material remitido a nuestro centro se había limitado al imprescindible para los estudios de medicina personalizada), ii) en 2 modelos por no disponer de material procedente del PDOX (en un caso se fijó la muestra erróneamente en formol, y en otro, se extrajo el tumor pero sucedió un incidente durante su procesamiento).

En el caso de no disponer material del tumor del paciente, pero sí del PDOX, se realizó una aproximación básica al diagnóstico del PDX mediante examen al microscopio de las tinciones con hematoxilina-eosina (H&E). En todos ellos los resultados fueron compatibles con el diagnóstico original del paciente. Se trata de los siguientes modelos:

- VH-PDOX-RMS2: Rabdomiosarcoma alveolar perianal metastásico (ganglios retroperitoneales, mama). PDOX morfológicamente compatible con un rabdomiosarcoma (célula redonda, pequeña y azul), a falta de estudio IHQ.

RESULTADOS

- VH-PDOX-SO-NOS1: Sarcoma óseo NOS pélvico, múltiples recaídas locales y metastásicas. PDOX morfológicamente compatible con un sarcoma indiferenciado (células fusiformes), a falta de estudio IHQ.
- VH-PDOX-WT9: Nefroblastoma mixto en recaída metastásica múltiple. PDOX morfológicamente compatible con nefroblastoma blastematoso y epitelial, similar al informe externo de anatomía patológica del paciente, con positividad para WT-1 en el tumor del PDOX.

Los dos casos en los que el material del PDOX no estaba disponible para su examen, corresponden a dos sarcomas de Ewing: los modelos VH-PDOX-EWS1 (fijación inadvertida en formol) y VH-PDOX-EWS2 (incidente durante el procesado de la muestra). En ambos casos, pese a no haber podido hacer la caracterización histológica, decidimos dar por válido el éxito del crecimiento del PDOX, al tratarse de masas situadas en la extremidad del animal, fácilmente palpables y en las que era evidente que el tumor se había desarrollado. En ambos casos se conserva material criopreservado.

3.1.4 Caracterización genómica

Desafortunadamente, debido a las limitaciones presupuestarias, únicamente se secuenciaron en COMIK los pacientes que se encontraban en una situación de alto riesgo, recaída, progresión o refractariedad, previa discusión clínica en el Comité Multidisciplinar de Tumores Sólidos. En 33 de las 46 muestras a partir de las que se generaron los modelos, se realizó algún tipo de análisis genómico (71,7%). Los resultados detallados de estos análisis se proporcionan en el apartado “3.2 Análisis por tipo tumoral” y en el Anexo IV de la presente tesis.

Por las mismas cuestiones económicas, solo nos fue posible realizar un análisis genómico comparativo entre el tumor original y el PDOX en un modelo, estando el resto de los modelos aún pendientes de caracterización. El modelo caracterizado es el VH-PDOX-NB5, correspondiente a un neuroblastoma suprarrenal de alto riesgo, y cuyos resultados y metodología de caracterización discutiremos seguidamente y se detallan en el artículo “The

RESULTADOS

oral KIF11 inhibitor 4SC-205 exhibits antitumor activity and potentiates standard and targeted therapies in primary and metastatic neuroblastoma models. Clin Transl Med. 2021 Oct;11(10):e533.", incluido en el material suplementario de esta tesis.

3.1.5 Correlación con la evolución clínica

Analizamos las consecuencias a nivel clínico del éxito o fracaso de la implantación de los modelos. El éxito en la generación de PDX se asoció con el desarrollo de eventos (recaída/progresión/exitus) ($p=0,0048$) (Chi-cuadrado de Pearson con corrección de continuidad de Yates). Este resultado se mantuvo al analizar separadamente la recaída/progresión ($p=0,012$) y el fallecimiento ($p=0,0016$).

Analizamos separadamente estos mismos elementos (recaída/progresión/exitus) para los casos incluidos en los grupos de "riesgo bajo e intermedio/estándar" en el momento de obtención de la muestra, para identificar si el crecimiento del modelo PDOX podía predecir la necesidad de situar al paciente en un grupo de riesgo superior, pero el análisis no resultó significativo (riesgo intermedio $p=0,17$, riesgo bajo e intermedio $p=0,18$).

En el periodo de estudio, 31 de los 112 pacientes cuyas muestras se implantaron en PDOX (27,7%) fallecieron. Se realizaron curvas de supervivencia en base a las muestras obtenidas (135 muestras). Se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier, realizando una curva para las muestras que resultaron en PDOX establecidos y otra para las muestras que resultaron en PDOX no establecidos (Figura 25). La supervivencia mediana global, calculada desde la obtención de la muestra hasta completar el seguimiento o el fallecimiento del paciente, fue de 53,8 meses (IC 95%, 47,68-59,9). La supervivencia de los pacientes cuyo PDX no se estableció fue de 61,55 meses (IC 95%, 54,8-68,3) frente a los 36 meses (IC 95%, 25,86-46,2) de los pacientes cuyo modelo sí se generó. La diferencia resultó significativa tras analizarla mediante prueba de Log Rank (Mantel Cox).

RESULTADOS

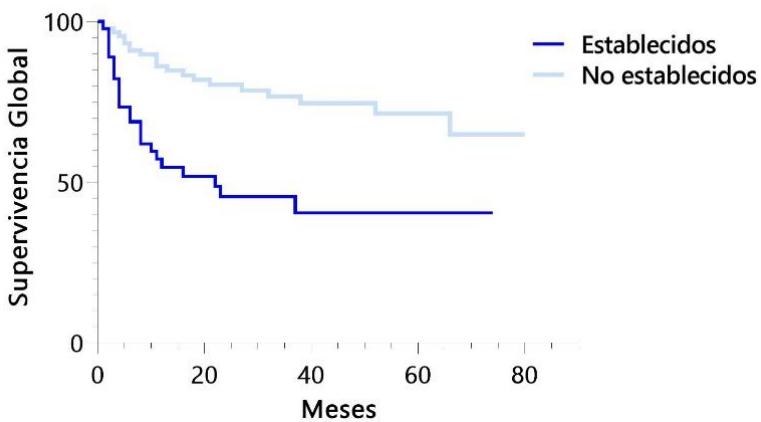


Figura 25. Curvas de supervivencia, Kaplan-Meier.
Comparativa entre pacientes cuyos modelos se han establecido frente a los que no.

Con los datos disponibles, hemos tratado de inferir en cuántos de los pacientes cuyo modelo PDOX se llegó a establecer (en el caso de disponer de los suficientes recursos) podríamos haber logrado realizar una aproximación de medicina personalizada. Es decir, llegar a un tercer pase (P3) en la expansión del modelo establecido (el cual se ha calculado de manera aproximada, multiplicado por 3 el tiempo de crecimiento del primer pase – aunque habitualmente los pasos sucesivos requieren menos tiempo de crecimiento) y realizar los experimentos farmacológicos (que generalmente requieren unos 21 días hasta el sacrificio de los animales), a los que hemos sumado 60 días para que el paciente pudiese llegar a recibir el tratamiento. Este tiempo total se ha comparado con la supervivencia total del paciente, desde el momento de obtención de la muestra hasta completar seguimiento o fallecer.

En el 37% de las muestras ($n = 17$) con PDOX establecido, el paciente no presentó eventos (recaída, progresión o *exitus*), por lo que en esos casos todo el proceso de medicina personalizada en tiempo real hubiera sido factible. En un 56,2% de las ocasiones ($n = 26$), los pacientes recayeron o progresaron tras la obtención de la muestra (Anexo V) y en un 52,1% ($n = 24$), los pacientes fallecieron (Anexo VI). En el 45,6% de las ocasiones ($n = 21$), sucedieron ambos eventos (recaída/progresión y *exitus*). Un 38,5% ($n = 10$) de estos pacientes que recayeron y un 29% ($n = 7$) de los que fallecieron, lo hicieron antes de que su primer PDOX estuviera establecido (P1).

Haciendo el cálculo temporal antes descrito, identificamos que en 8 de los 20 pacientes que fallecieron hubiera sido factible completar el proceso de medicina personalizada en

RESULTADOS

tiempo real. Cabe destacar que en cuatro de los pacientes fallecidos se establecieron 2 modelos PDOX.

Así, de forma global, podemos estimar que en 30 (17 sin eventos, 5 recaídos y no fallecidos, y 8 de los fallecidos) de los 46 modelos de PDOX (65,2%) hubiera sido factible intentar un acercamiento mediante la medicina personalizada en tiempo real.

3.2 Análisis de los modelos por tipo tumoral

A continuación, se presenta un análisis integrativo por cada uno de los tipos tumorales más relevantes, incorporando las diferentes facetas estudiadas y destacando aquellos modelos que, por sus características, pueden ser particularmente relevantes. En el material suplementario (Anexo IV) se resumen todos los modelos PDOX generados, junto con información relevante del paciente y del tumor original del que procede cada uno de ellos.

3.2.1 Nefroblastomas

Hemos establecido 9 modelos PDOX de nefroblastomas (tasa de *engraftment* del 47%). El 84,2% de las muestras implantadas correspondían a tumores post-tratamiento, como es norma habitual en los protocolos SIOP-RTSG y este porcentaje se mantiene entre los modelos crecidos (el 88,8% procedían de tumores tratados).

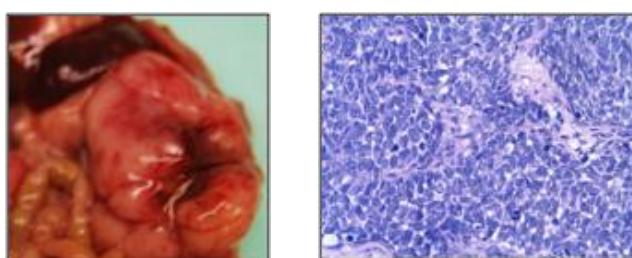


Figura 26. VH-PDOX-WT2: Izda. imagen del PDOX crecido en el riñón,
Dcha. Tinción de H&E compatible con nefroblastoma.

ESTUDIO HISTOLÓGICO:

Ocho de estos modelos se sometieron al estudio comparativo histológico, hallando que 7/8 eran prácticamente idénticos al tumor original.

RESULTADOS

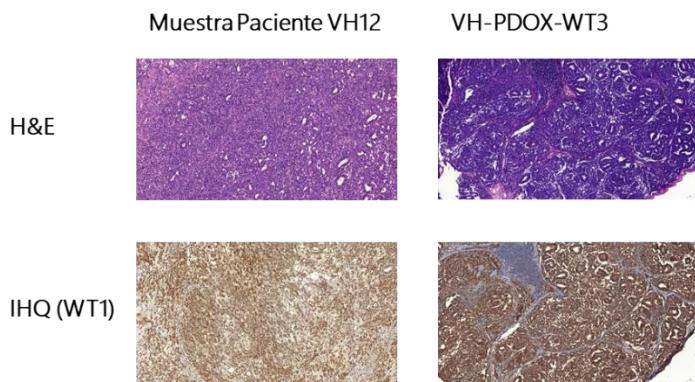


Figura 27. VH-PDOX-WT3: Comparativa entre el tumor del paciente y del PDOX, evidenciando la concordancia entre ambos, tanto en la tinción de Hematoxilina-Eosina como en la Inmunohistoquímica con WT1.

En el VH-PDOX-WT1, sólo se identificó una diferencia, al no evidenciarse en el modelo PDOX tinción positiva para WT1. Se trataba originalmente de un tumor mixto estromal y epitelial, con un pequeño componente de blastema (el componente que marca WT1). En modelo PDOX únicamente crecieron los componentes mayoritarios, justificando así la ausencia de IHQ positiva.

Es llamativo también el modelo VH-PDOX-WT4. En este caso, la muestra procede de un tumor tratado con una respuesta a la quimioterapia superior al 90%, motivo por el que se clasificó como “regresivo”, al no poder identificarse otros elementos representativos. Sin embargo, el modelo PDOX corresponde a un nefroblastoma de tipo blastematoso, lo que sugiere que solo estas células, más inmaduras y agresivas, han permanecido viables tras el tratamiento. Este modelo sería muy interesante para estudiar opciones terapéuticas en el caso de una posible recaída del paciente.

Solo un modelo no se pudo someter a la comparativa. Se trata del modelo VH-PDOX-WT9, un modelo muy valioso por tratarse de la recaída metastásica de un tumor de Wilms de riesgo intermedio, del cual solo se disponía de material suficiente para los estudios de medicina personalizada y generación de PDX. El análisis genómico del tumor original se discute a continuación.

ESTUDIO GENÓMICO:

De los 9 modelos, 3 de ellos provienen de pacientes clasificados como de muy alto riesgo en el momento de obtención e implantación de la muestra ya que estaban en situación de

RESULTADOS

recaída/refractariedad/progresión. Los tres pacientes de los que se originaron los modelos VH-PDOX-WT2, VH-PDOX-WT7 y VH-PDOX-WT9 fueron incluidos en los estudios de secuenciación de COMIK (VH-PDOX-WT2 y VH-PDOX-WT7) o MAPPYACTS (VH-PDOX-WT9), los dos programas de medicina de precisión llevados a cabo en nuestro grupo de investigación en el periodo de estudio. Los tumores primarios del resto de pacientes no fueron caracterizados molecularmente ya que no cumplían criterios de inclusión por ser tumores de riesgo intermedio/estándar.

Se detectó una mutación en el gen *TP53* en dos de los pacientes, uno en la línea germinal (VH-PDOX-WT2, p.C242G) confirmando un síndrome de Li-Fraumeni familiar y otro a nivel somático (WT2, VH-PDOX-WT7, p.R337H). En ambos casos hay una pérdida de función de *TP53* en el tumor de los pacientes. En el caso del paciente origen del VH-PDOX-WT7 se realizó un estudio de medicina personalizada, explicado en el apartado “3.3 Aplicación de los modelos” de esta tesis, ya que los hallazgos moleculares del tumor guiaron a la recomendación de terapias dirigidas. Además de la mutación patogénica en *TP53* (p.R337H), en este tumor se detectaron dos mutaciones probablemente patogénicas, una en el gen supresor de tumores *MLH1* (p.L559Cfs*32 y pérdida de una copia del gen) y la otra en el gen supresor de tumores *ASXL1* (p.G645Vfs*58). En la muestra de tumor del paciente VH-PDOX-WT9 se encontraron mutaciones patogénicas en los genes *DROSHA* (p.E1147K), *SIX1* (p.Q177R), *ZFHX3* (p.K497*) y *CBFB* (p.F32Tfs*55).

3.2.2 Tumores hepáticos

En el caso de los tumores hepáticos se han establecido 7 modelos procedentes de 5 pacientes. Cuatro de los cinco pacientes se secuenciaron dentro del programa COMIK (3 hepatoblastomas y el hepatocarcinoma).

3.2.2.1 Hepatoblastomas

Se han establecido 6 modelos PDOX de hepatoblastoma (tasa de *engraftment* del 55%), que derivan de 4 pacientes. El 90,9 % (10 de 11) de las muestras implantadas procedían de tumores post-tratamiento.

RESULTADOS

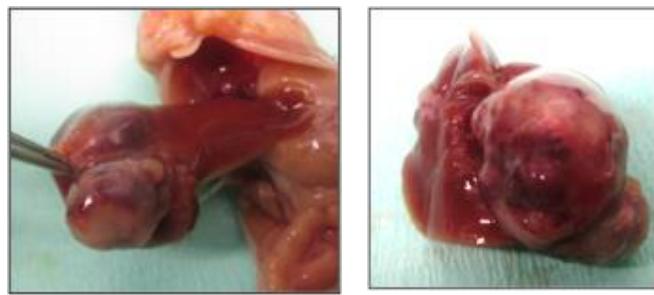


Figura 28. Imágenes de la necropsia del modelo VH-PDOX-HB1

ESTUDIO HISTOLÓGICO:

Todos los PDOX se consideraron concordantes con los tumores originales, con algunas particularidades.

El modelo VH-PDOX-HB1 era originalmente un hepatoblastoma mixto, pero en el PDOX únicamente crece el componente más inmaduro (embrionario), como se aprecia en la siguiente imagen, siendo el resto de los parámetros concordantes.

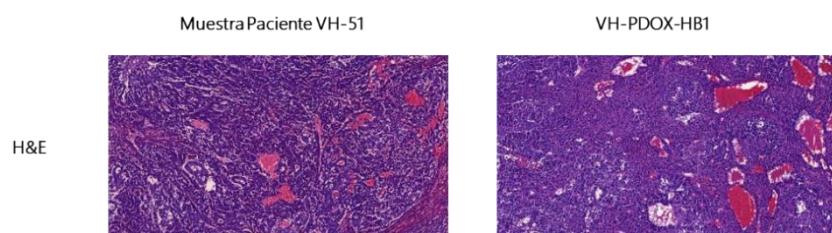


Figura 29. VH-PDOX-HB1. Comparativa de la H&E que muestra una predominancia del componente embrionario en el PDOX frente al tumor original, mixto.

Algo similar sucede en el VH-PDOX-HB2, en el que crece el componente más indiferenciado, pero manteniendo el patrón inmunohistoquímico intensamente positivo para β -catenina, como se puede ver en las imágenes comparativas.

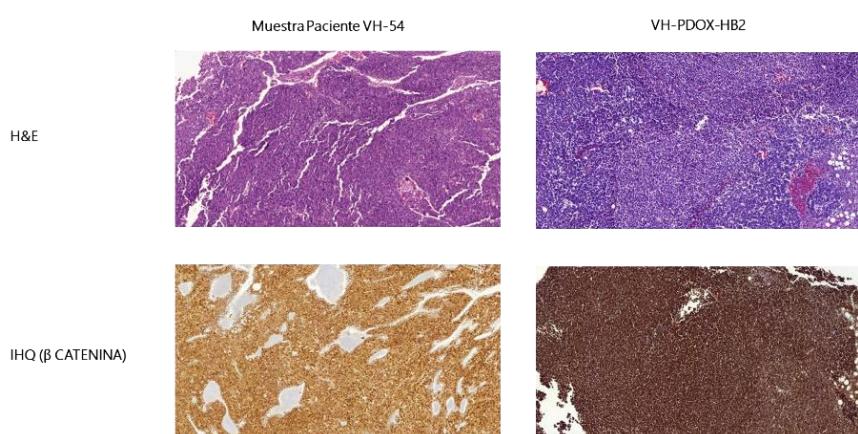


Figura 30. VH-PDOX-HB2. Comparativa histológica que muestra una predominancia del componente indiferenciado en el PDOX, que mantiene el patrón inmunohistoquímico del tumor original.

RESULTADOS

El resto de los modelos fueron concordantes en todos los aspectos relevantes. El modelo VH-PDOX-HB6, presentaba en el tumor original un patrón de Hepatocyte positivo, pero sólo de manera local y moderada, y esta característica se ha perdido en el modelo PDOX; ello sugiere, de nuevo, el crecimiento del tumor menos diferenciado.

ESTUDIO GENÓMICO:

Disponemos de los resultados de la secuenciación de 4 de estos pacientes:

- El primer caso corresponde a un hepatoblastoma muy agresivo, con algunas características histológicas y clínicas que recordaban al comportamiento de los hepatocarcinomas (invasión vascular, mala respuesta a la quimioterapia). El comportamiento del tumor fue muy agresivo, con una recaída precoz en forma de diseminación peritoneal pocos meses después de la cirugía del tumor primario. En la muestra del paciente de la que deriva el modelo VH-PDOX-HB4 (recaída peritoneal) se detectó una mutación patogénica (p.W25_D32del) en el gen *CTNNB1* (β -catenina) y una mutación de origen germinal en el gen *MITF* (p.E318K). La delección *in-frame* detectada en *CTNNB1* se encuentra en el exón 3 y es una mutación de ganancia de función que promueve el crecimiento tumoral. La proteína β -catenina es un activador transcripcional que forma parte de la vía de señalización WNT y es el gen más frecuentemente mutado en los hepatoblastomas. Se ha descrito que el 75% de los hepatoblastomas tienen mutaciones puntuales o delecciones *in-frame* del tercer exón de la *CTNNB1* (92).

La proteína codificada por el gen *MITF* es un factor de transcripción que regula la expresión de genes con papeles esenciales en la diferenciación celular, la proliferación y la supervivencia. La mutación *MITF-p.E318K* es una mutación recurrente de la línea germinal que predispone a padecer melanoma y carcinoma renal pero no se ha descrito hasta la fecha una mayor susceptibilidad para desarrollar hepatoblastomas ni hepatocarcinomas. Curiosamente, se ha descrito una relación entre *MITF* y *CTNNB1* en melanoma y se sabe que β -catenina regula la transcripción de *MITF* y que, a su vez, *MITF* juega un papel en la vía de señalización de Wnt implicada en la regulación negativa de la apoptosis. Además, se ha

RESULTADOS

identificado un complejo formado por *HINT1*, *CTNNB1* y *MITF* en células de melanoma (93).

-Los modelos VH-PDOX-HB5 (biopsia al diagnóstico) y VH-PDOX-HB6 (resección del tumor post-tratamiento) derivan de muestras de la misma paciente en diferentes momentos de la enfermedad. En este caso la paciente ha seguido una evolución clínica satisfactoria y libre de enfermedad. Estudios en la unidad de Genética Clínica revelaron que la paciente tiene el síndrome de Beckwith-Wiedemann. En consecuencia, en la muestra de tumor se detectaron alteraciones en el estado de metilación de la región cromosómica 11p15 sometida a impronta (*imprinting*): hipermetilación de IC1 e hipometilación de IC2, como consecuencia de disomía uniparental (OMIM:130650, ORPHA 116).

- En el caso de los modelos VH-PDOX-HB1 y VH-PDOX-HB3 que provienen del mismo paciente (que sufrió una recaída tumoral local, pero actualmente se encuentra libre de enfermedad) y del modelo VH-PDOX-HB2 (que sufrió una recaída metastásica por la que terminó falleciendo), no se han detectado mutaciones patogénicas mediante la secuenciación del exoma de los tumores.

3.2.2.2 Hepatocarcinomas

Se generó un solo modelo de HCC (tasa de *engraftment* 25%). El 100% de las muestras implantadas fueron post-tratamiento y procedían de dos pacientes diferentes, intervenidos en múltiples ocasiones por recaídas metastásicas (pulmonares y ganglionares).

ESTUDIO HISTOLÓGICO:

El único modelo generado (VH-PDOX-HCC1), procedente de una metástasis pulmonar, correspondiente a un hepatocarcinoma pobremente diferenciado. La comparativa entre la histología del tumor original y la del PDOX fue concordante. Únicamente, debemos destacar que en el tumor original se identificó una tinción IHQ positiva pero solo local (parcheada) para Hepatocyte, que no se trasladó al modelo animal. Es probable que la

RESULTADOS

causa, de nuevo, fuese el crecimiento componente tumoral más indiferenciado, que con frecuencia se describe como Hepatocyte negativo (94).

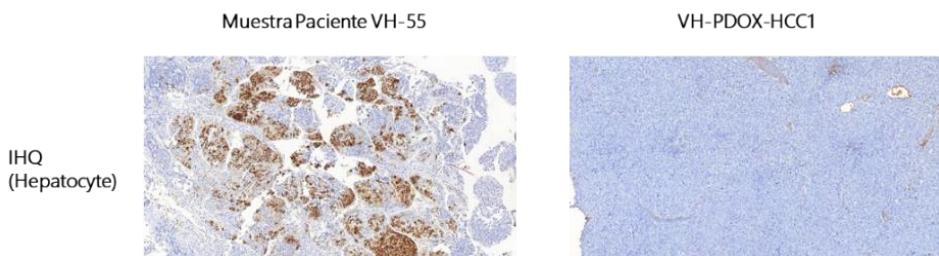


Figura 31. Diferencia entre la IHQ del paciente y del VH-PDOX-HCC1. La pérdida de tinción con Hepatocyte se debe probablemente al crecimiento del tumor más indiferenciado.

ESTUDIO GENÓMICO:

Se identificó una mutación en *TP53* (VH-PDOX-HCC1, p.R248Q) en la línea germinal del paciente con hepatocarcinoma (Síndrome de Li-Fraumeni) y una consecuente pérdida de función de *TP53* en el tumor del que se derivó el modelo. Pese a recibir diversas líneas de tratamiento y múltiples resecciones quirúrgicas, el paciente terminó falleciendo.

3.2.3 Neuroblastomas

Hemos establecido 6 modelos PDOX de neuroblastoma, con muestras procedentes de 5 pacientes. La tasa de *engraftment* global fue del 18,2%, a pesar de que 24 de las 33 muestras eran de tumores de alto o muy alto riesgo.



Figura 32. PDOX con neuroblastoma suprarrenal izdo. Imagen necropsia.

ESTUDIO HISTOLÓGICO:

Todas las muestras crecidas proceden de pacientes en situación de alto (4) o muy alto riesgo (2). Los modelos reflejan diferentes

momentos evolutivos de la enfermedad; se han generado modelos procedentes de pacientes no tratados y tratados, de pacientes en progresión y en recaída tras tratamiento multimodal intensivo. Tres de los cinco pacientes fallecieron durante el periodo de estudio, y dos seguían vivos, pero en recaída metastásica.

RESULTADOS

Los 6 modelos resultaron concordantes con las muestras del tumor original del que se desarrollaron, aunque en algunos modelos hubo pequeñas diferencias (como, por ejemplo, la intensidad de la tinción con sinaptofisina).

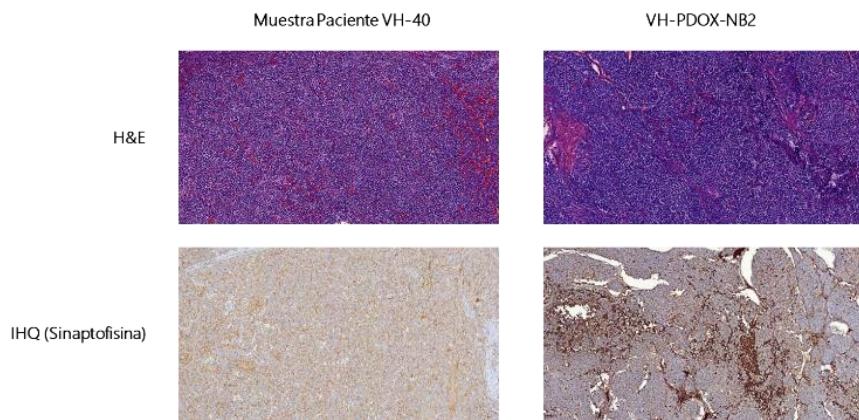


Figura 33. VH-PDOX-NB2. Ejemplo de neuroblastoma totalmente concordante.

Los modelos VH-PDOX-NB1 y VH-PDOX-NB3 proceden de un mismo paciente, -NB1 de la cirugía del tumor primario tras la quimioterapia de inducción (alto riesgo), y -NB3 de su recaída metastásica cerebral (muy alto riesgo). El modelo VH-PDOX-NB4 es enormemente valioso, al originarse de un tumor primario adrenal de alto riesgo no tratado en un niño de 8 años. El neuroblastoma en los pacientes mayores de 5 años tiene características biológicas diferenciales aún poco conocidas y asocia un mal pronóstico casi universal pese a un curso clínico indolente (95).

El modelo VH-PDOX-NB2 también es interesante, al tratarse de una progresión en forma de metástasis hepática única en un paciente tratado y refractario (muy alto riesgo).

El modelo VH-PDOX-NB5 corresponde al debut de un tumor no tratado (alto riesgo) y el VH-PDOX-NB6, a la resección del tumor primario (alto riesgo) tras quimioterapia de inducción.

ESTUDIO GENÓMICO:

Todos los modelos establecidos (VH-PDOX-NB1 - VH-PDOX-NB3, VH-PDOX-NB2, VH-PDOX-NB5 y VH-PDOX-NB6), excepto uno (VH-PDOX-NB4), derivan de neuroblastomas con amplificación del oncogén *MYCN*. La amplificación del gen *MYCN* se observa en el 20% de los neuroblastomas y en un 40% de los neuroblastomas de alto riesgo y es un

RESULTADOS

factor ampliamente reconocido de mal pronóstico (96); todo tumor con amplificación de *MYCN* se considera inmediatamente de alto riesgo (97).

En las muestras con el factor de transcripción *MYCN* amplificado se encontraron, además, mutaciones en *ALK* (VH-PDOX-NB5 y VH-PDOX-NB6) y en *NRAS* (VH-PDOX-NB2 y VH-PDOX-NB3), dos de los genes más frecuentemente mutados en los neuroblastomas de alto riesgo (en torno al 10% en el caso de *ALK* y en torno al 1% para *NRAS*) (98). Los tres genes están involucrados en mecanismos de proliferación, supervivencia o diferenciación celular.

- Las dos mutaciones identificadas en *ALK*, p.G1128A (VH-PDOX-NB5) y p.F1174L (VH-PDOX-NB6), hacen aumentar la actividad quinasa del receptor y son de las más recurrentes en los neuroblastomas (99) (100). Es importante remarcar que las mutaciones en *ALK* se observan frecuentemente en neuroblastomas con *MYCN* amplificado, asociándose con una baja supervivencia de los pacientes (menor al 15% en 3 años) (101). Se ha descrito que los pacientes desarrollan resistencia a muchos de los inhibidores de *ALK* y aún no se han desarrollado terapias efectivas contra la amplificación de *MYCN*.
- En la muestra secuenciada del paciente de la que deriva el modelo VH-PDOX-NB5 se detectó también una amplificación de *ABCB1* (*multidrug resistance protein 1*). Esta proteína transportadora de fármacos es una de las responsables del desarrollo de resistencia a los fármacos contra el cáncer. Aunque las amplificaciones en *ABCB1* no son recurrentes en los neuroblastomas, las amplificaciones de 7q21 (donde está localizado *ABCB1*) son frecuentes, sobre todo en los neuroblastomas de alto riesgo, y se han asociado a resistencia a fármacos (102) (103).
- El modelo VH-PDOX-NB5 además se utilizó para ensayar la eficacia del inhibidor de KIF11, 4SC-205, una línea de investigación del laboratorio de tumores neurales (IP Dr. Miguel Segura) de nuestro grupo de investigación. Se demostró que 4SC-205 es efectivo incluso en un modelo de PDOX tan agresivo y de muy alto riesgo (64), lo que se va a traducir en un ensayo clínico que permita validar esta estrategia terapéutica.

RESULTADOS

Hemos de destacar que, gracias a su inclusión en ese proyecto, VH-PDOX-NB5 es el único modelo PDOX en el cual hemos podido realizar un análisis genómico comparativo entre el tumor original y el PDOX. Se constató que el modelo animal retuvo la mayoría de las características histológicas y moleculares del tumor original, como se muestra en la siguiente figura.

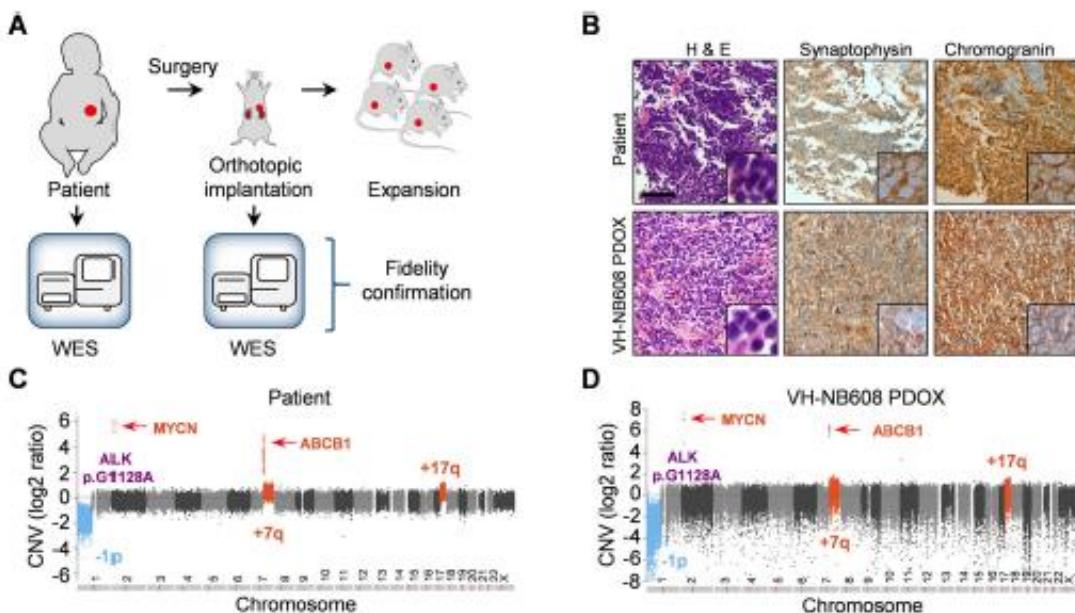


Figura 34. Caracterización comparativa VH-PDOX-NB5 con su muestra de origen VH-64 (Reproducido con permiso). (A) Representación esquemática de la generación y caracterización de PDOX. (B) Inmunohistoquímica de marcadores de neuroblastoma en secciones de tumor FFPE del tumor original (paneles superiores) y después de la implantación en ratones (paneles inferiores). H&E: tinción con hematoxilina y eosina. La barra de escala representa 110 µm. (C y D) Variaciones del número de copias cromosómicas (CNV) del tumor original y después de la implantación en ratones. Se destacan las alteraciones patogénicas moleculares más relevantes encontradas en el tumor original y PDOX.

- En la muestra del paciente del que deriva el modelo VH-PDOX-NB6 se detectó, además de la mutación en *ALK* (p.F1174L) y la amplificación de *MYCN*, una mutación de ganancia de función en el gen *PPM1D* (p.E476*). *PPM1D* actúa como un regulador negativo de varias vías supresoras de tumores clave como ATM, CHK2, p38 MAPK y p53 (104), involucradas en la respuesta al daño al ADN, progresión del ciclo celular, reparación del ADN y apoptosis. *PPM1D* se ha descrito como un oncogén importante en neuroblastoma y se ha sugerido como una nueva diana terapéutica en este tipo de tumores (105).
- Como ya hemos comentado, dos de los modelos de neuroblastoma establecidos, VH-PDOX-NB2 y VH-PDOX-NB3, provenían de muestras de la recaída metastásica

RESULTADOS

en el hígado y en el cerebelo, respectivamente. En ambas muestras se identificó una amplificación de *MYCN* y la mutación de ganancia de función p.Q61K en el gen *NRAS*. Se ha descrito que la mutación p.Q61K provoca una activación constitutiva de la proteína GTPasa *NRAS* y de las vías de señalización MAPK y PI3K (106). Se sabe que, cuando recaen, los neuroblastomas presentan un enriquecimiento en mutaciones somáticas en la vía RAS-MAPK (107).

- Debemos mencionar que los modelos VH-PDOX-NB1 y VH-PDOX-NB3 provienen del mismo paciente en diferentes momentos de su enfermedad (VH-PDOX-NB1 de la muestra de la resección del tumor adrenal tras recibir quimioterapia de primera línea y VH-PDOX-NB3 de la recaída posterior en el sistema nervioso central). La muestra secuenciada en COMIK fue la de la recaída, por lo que desconocemos si la presencia de la mutación *NRAS* estaba ya presente en el tumor al debut; realizaremos este análisis a posteriori. El modelo VH-PDOX-NB3 es muy interesante también para el estudio de las recaídas de neuroblastoma en el sistema nervioso central.
- A pesar de que no se realizaron estudios de secuenciación de nueva generación en la muestra del paciente del que deriva el modelo VH-PDOX-NB4, sí se realizaron estudios moleculares para conocer el estado de *MYCN*, *ALK* y el cariotipo molecular. La muestra, que corresponde a una exéresis del tumor primario sin tratar en un paciente mayor de 5 años de edad, presenta delección de 11q sin amplificación ni mutaciones en *MYCN* ni en *ALK*. Las delecciones en 11q son un factor de mal pronóstico en los neuroblastomas y, a pesar de que la supervivencia es igual de baja en los neuroblastomas con *MYCN* amplificado que en los neuroblastomas con delección en 11q, el tiempo de supervivencia tras el diagnóstico es mayor (108).

3.2.4 Sarcomas

A continuación, pasamos a analizar los modelos de sarcomas generados. En primer lugar, los sarcomas de partes blandas y posteriormente, los sarcomas óseos.

RESULTADOS

3.2.4.1 Rabdomiosarcomas

Hemos establecido 5 modelos PDOX de rabdomiosarcoma, con muestras procedentes de 5 pacientes. La tasa de *engraftment* global fue del 50%. Todos los modelos se generaron a partir de biopsias Trucut, excepto uno. Las muestras que generaron los PDOX procedían de tres pacientes considerados de muy alto riesgo (pacientes originalmente de alto riesgo que, habiendo completado tratamiento, progresaron o recayeron en múltiples localizaciones) y dos de alto riesgo.

Los tumores se implantaron ortotópicamente en el animal en las siguientes localizaciones: vejiga-próstata (VH-PDOX-RMS1 y VH-PDOX-RMS4), tejido mamario (VH-PDOX-RMS2), pata (VH-PDOX-RMS3 y VH-PDOX-RMS5), para tratar de imitar de la forma más precisa posible el microambiente del tumor original de los pacientes.



Figura 35. Imágenes de las necropsias. Izda. VH-PDOX-RMS1 ERMS genitourinario (atópico) metastásico y refractario. Dcha. VH-PDOX-RMS2. Metástasis mamaria de un ARMS.

ESTUDIO HISTOLÓGICO:

Se realizaron estudios comparativos en 4 de los 5 modelos. El modelo VH-PDOX-RMS2 (un rabdomiosarcoma alveolar – ARMS - metastásico) no se pudo estudiar comparativamente al no disponer de tejido de la paciente, pero el estudio del PDOX aislado fue concordante con el diagnóstico de rabdomiosarcoma. El resto, resultaron globalmente concordantes, con algunas pequeñas variaciones que se consideraron poco relevantes (2 cambios en el patrón de IHQ, pasando de difusa a local, 2 cambios en el patrón de crecimiento, pasando de infiltrativo a expansivo). En el modelo VH-PDOX-RMS1 (un rabdomiosarcoma embrionario - ERMS - refractario y metastásico) la morfología celular

RESULTADOS

pasó de redonda a fusiforme y además desarrolló un pleomorfismo que no estaba presente en el tumor original.

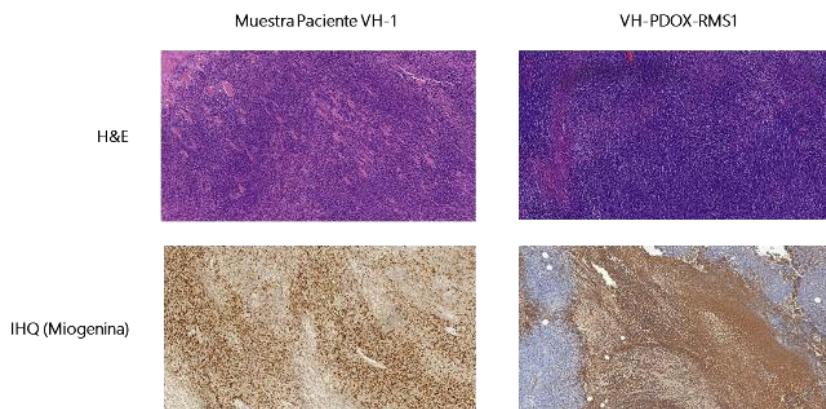


Figura 36. VH-PDOX-RMS1. ERMS. Se aprecian algunas diferencias entre el tumor del paciente y el PDOX. En el PDOX, las células son más fusiformes, existe pleomorfismo y el patrón IHQ es más local. Globalmente, el modelo se consideró concordante.

ESTUDIO GENÓMICO:

De los 5 modelos de PDOX establecidos, 2 correspondieron a rabdomiosarcomas alveolares (VH-PDOX-RMS2 y VH-PDOX-RMS5) y 3 a rabdomiosarcomas embrionarios (VH-PDOX-RMS1, VH-PDOX-RMS3 y VH-PDOX-RMS4). Todos derivaron de muestras de pacientes en el momento de la recaída, excepto la muestra del VH-PDOX-RMS3 que se obtuvo de la biopsia al diagnóstico en un paciente de alto riesgo. Al ser todos pacientes de alto o muy alto riesgo en el momento de obtención de la muestra, todos los tumores se secuenciaron en los programas COMIK o MAPPYACTS, con la excepción de VH-PDOX-RMS1, que se secuenció mediante un panel NGS diseñado en el VHIO (Amplicon-Seq VHIO-Card V3), ya que el programa COMIK de secuenciación todavía no se había iniciado. Los tumores de los pacientes a partir de los que se generaron los dos modelos PDOX de rabdomiosarcomas alveolares (VH-PDOX-RMS2 y VH-PDOX-RMS5), presentaban las translocaciones típicas para el subtipo alveolar, *PAX3-FOXO1* y *PAX7-FOXO1*, respectivamente. Estas fusiones oncogénicas y *driver* en este subtipo de rabdomiosarcomas son un factor de mal pronóstico ampliamente establecido (109). En la muestra del modelo VH-PDOX-RMS2 se identificó una amplificación focal en el cromosoma 12q que incluía los genes *GLI1* y *CDK4*. *CDK4* es un gen frecuentemente amplificado, mayoritariamente en los rabdomiosarcomas alveolares; en cambio, *GLI1* no se

RESULTADOS

ha descrito como un gen mutado de manera habitual en los rabdomiosarcomas (110). Las amplificaciones de *GLI1*, aunque poco recurrentes, han sido descritas en varios tipos de sarcomas (111) pero es difícil saber su papel oncogénico directo, ya que los fragmentos amplificados suelen incluir otros oncogenes potenciales.

La muestra del modelo VH-PDOX-RMS5 presentó, además de la translocación *PAX3-FOXO1*, una mutación de pérdida de función en el gen *TP53* (*p.Q52**) y una mutación probablemente patogénica en el gen *VEGFR2* (*p.S290R*). Las mutaciones en *TP53*, aunque son más frecuentes en los rabdomiosarcomas embrionarios, también se presentan en los alveolares (110). *VEGFR2* es un receptor tirosina quinasa con un papel clave en la angiogénesis.

Los tres modelos embrionarios establecidos (VH-PDOX-RMS1, VH-PDOX-RMS3 y VH-PDOX-RMS4) provienen de muestras con mutaciones en los genes más frecuentemente mutados en este subtipo de rabdomiosarcomas (110). La muestra de la que proviene VH-PDOX-RMS1 presenta una mutación de ganancia de función en el gen *FGFR4* (*G636C*), la de VH-PDOX-RMS3 presenta amplificaciones en *KRAS* y en *PAK1* y una pérdida de función del gen *TP53* (originada en una mutación germinal (*p.R248Q*) en la paciente) y la muestra de la que proviene el modelo VH-PDOX-RMS4 presenta una mutación de ganancia de función en el gen *NRAS* (*p.Q61K*) y una de pérdida de función en el gen *PTEN* (*p.L25F*).

3.2.4.2 Tumor maligno rabdoide teratoide (MRT)

Se establecieron 5 modelos PDOX, con muestras procedentes de 3 pacientes y una tasa de *engraftment* del 100%. Los modelos VH-PDOX-MRT1 y VH-PDOX-MRT2 proceden de una misma paciente, al igual que los modelos VH-PDOX-MRT4 y VH-PDOX-MRT5.

RESULTADOS

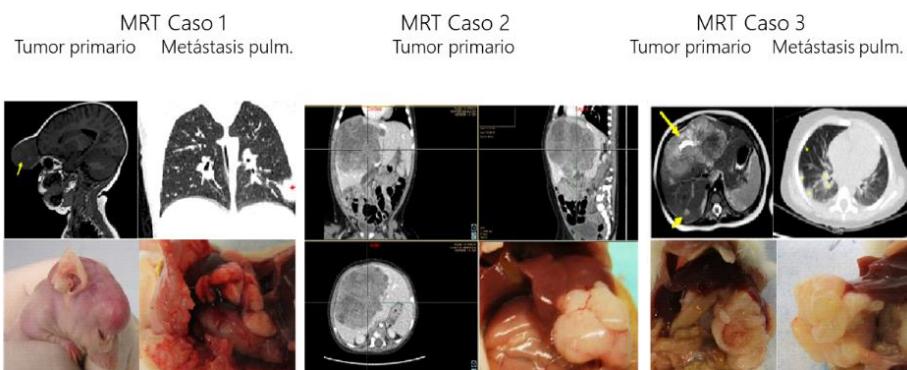


Figura 37. Imágenes radiológicas representativas de los tumores de los 3 pacientes (Caso 1: RMN craneal y TAC torácico, Caso 2: RMN abdominal, Caso 3: RMN hepática y TAC torácico). Se muestran junto a imágenes de las necropsias de los modelos PDOX implantados en el mismo lugar anatómico (Caso 1: Implante frontal y pulmonar, Caso 2: Implante hepático, Caso 3: Implantes hepáticos).

ESTUDIO HISTOLÓGICO:

Los 5 modelos generados se consideraron concordantes con el tumor original. Tres modelos proceden de muestras no tratadas (VH-PDOX-MRT1, VH-PDOX-MRT2 y VH-PDOX-MRT4), uno procede de muestra tratada en primera línea (VH-PDOX-MRT3) y otro, de una recaída metastásica pulmonar (VH-PDOX-MRT4).

Todos los modelos resultaron concordantes con los tumores originales, salvo alguna mínima diferencia, como 2 cambios en el patrón de crecimiento (de infiltrativo a expansivo).

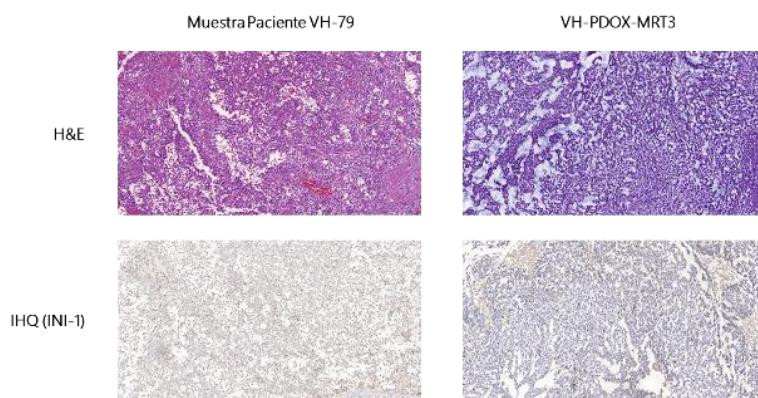


Figura 38. VH-PDOX-MRT3. Comparativa histológica entre la muestra original y el PDOX, completamente concordantes. Se observa en la IHQ la negatividad para INI-1, característica de este tipo tumoral.

ESTUDIO GENÓMICO:

Dado que los tumores rabdoides se consideran de muy alto riesgo desde el momento del diagnóstico, se realizó secuenciación del exoma completo (WES) de las muestras de tumor

RESULTADOS

y sangre de los 3 pacientes dentro de los programas de medicina personalizada COMIK o MAPPYACTS.

En los tres casos se identificó una delección en homocigosis del gen *SMARCB1/INI1* en el tumor de los pacientes, lo que ocasiona una pérdida de función de *SMARCB1* debida a la delección bialélica del gen. *SMARCB1* forma parte del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF que controla la transcripción de genes. En el 97% de los casos de tumores rhabdoides malignos, el gen supresor de tumores *SMARCB1*, localizado en el cromosoma 22q11.23, está inactivado. Por lo tanto, la pérdida de función de *SMARCB1* es la mutación *driver* y oncogénica de este tipo de tumores (112). En consonancia con lo descrito en la bibliografía sobre este tipo de sarcomas, en ninguno de los pacientes se detectó alguna otra mutación relevante mediante la secuenciación WES.

En todos los casos, la inmunohistoquímica de los tumores (falta de expresión nuclear de la proteína INI-1) había identificado la pérdida de expresión somática de *SMARCB1*. Sin embargo, en ninguno de los pacientes se confirmó que las alteraciones en *SMARCB1* fueran germinales, ni tampoco en *SMARCA4*, al ser estudiados por la Unidad de Predisposición al Cáncer. La mutación germinal en *SMARCB1* se ha descrito en aproximadamente un 20-25% de los pacientes con MRT extracraneales (29) y en *SMARCA4* en un porcentaje muy inferior (113).

3.2.4.3 DSRCT

Se estableció un modelo de DSRCT (VH-PDOX-DSRCT1), generado a partir de una biopsia con aguja gruesa obtenida al diagnóstico, lo que supuso una tasa de *engraftment* del 33%. Otras dos muestras procedentes de un segundo paciente (DSRCT de origen hepático) no llegaron a generar modelos.



Figura 39.
VH-PDOX-
DSRCT1.
Necropsia.
Tumor pélvico
de crecimiento
agresivo.

ESTUDIO HISTOLÓGICO:

El modelo resultó concordante, aunque con un patrón más proliferativo que el original, pasando de 2 mitosis por campo a 25, y una mayor densidad celular.

RESULTADOS

ESTUDIO GENÓMICO:

En consonancia con lo descrito en la bibliografía sobre este tipo de sarcomas, no se detectó ninguna mutación relevante mediante la secuenciación WES en el tumor del paciente. Mediante RT-PCR se identificó la translocación patognomónica *EWS-WT1* (t(11;22)(p13;q12)), lo que se traduce en la pérdida de función de la proteína WT1 (*Wilms tumor protein*) como represor transcripcional. Se ha sugerido que WT1 pasaría de ser un represor transcripcional a un oncogén activador de la transcripción de diversos genes diana (*PDGF α , IGF-1, EGFR, IL-2/15R β , c-MYC, n-MYC, PAX2-2, ENT4, and WT-1, e-Syndecan, E-cadherin, y TALLA-1*). Sin embargo, la contribución precisa de estos cambios moleculares y su potencial como dianas terapéuticas sigue sin entenderse (114).

3.2.4.4 Otros NRSTS

Se implantaron un total de 7 muestras procedentes de 7 pacientes afectos de diferentes sarcomas de partes blandas no rhabdomiosarcoma (NRSTS). Las muestras procedentes de un sarcoma sinovial, un sarcoma alveolar, un condrosarcoma, un sarcoma epitelioide y un GIST *wild type* no generaron modelos PDOX (tasa de *engraftment* del 29%). Los dos modelos establecidos son:

3.2.4.4.1 Sarcoma indiferenciado de partes blandas

El modelo PDOX de sarcoma indiferenciado establecido en nuestra cohorte (VH-PDOX-NRSTS1) proviene de una muestra obtenida en situación clínica de tercera recaída y progresión metastásica. En la comparación histológica resultó totalmente concordante con el tumor original.

La secuenciación del tumor en el programa COMIK reveló mutaciones patogénicas en *TP53* (*p.G244C*) y en *PIK3CA* (*p.R38H*) y una delección bialélica de *CDKN2A* y *CDKN2B*. Diversos estudios centrados en sarcomas, que incluyen sarcomas indiferenciados, han revelado que las alteraciones más comunes se dan en genes que controlan el ciclo celular (*CDKN2A* y *CDKN2B*), *TP53* y en receptores tirosina quinasa/PI3K/RAS (*PIK3CA*) (115) (116). Seguramente, esta combinación de alteraciones moleculares en genes que tienen un papel

RESULTADOS

crucial en el control del ciclo celular, la proliferación celular, la supervivencia, la reparación del ADN y la apoptosis, explique el comportamiento agresivo de este tumor.

3.2.4.4.2 MPNST

Se estableció un modelo (VH-PDOX-NRSTS2) de tumor maligno de la vaina del nervio periférico (MPNST), a partir de una biopsia con aguja gruesa obtenida al diagnóstico en enfermedad localizada. Hemos de destacar, como ya comentamos previamente, que es el único modelo que hemos considerado discordante desde el punto de vista histológico. Las imágenes comparativas se han mostrado en el apartado 3.1.3 de la presente tesis, así como en el material suplementario (Anexo III).

En la paciente, se realizaron únicamente estudios por sospecha de síndrome de predisposición hereditaria al cáncer. En estos estudios se identificó una mutación germinal *de novo* en el gen supresor de tumores *NF1* (*R1362**) confirmando un síndrome de neurofibromatosis tipo I (OMIM 162200 ORPHA 636) y una pérdida de función de *NF1* en el tumor de la paciente.

3.2.4.5 Osteosarcoma

Se establecieron 4 modelos PDOX de osteosarcomas, todos ellos derivados de muestras de la recaída metastásica pulmonar de 3 pacientes. La tasa de *engraftment* fue del 44%.



Figura 40. VH-PDOX-OS1. Necropsia. Izda. Gran metástasis pulmonar, imagen in situ. Dcha. Imagen del tumor del PDOX una vez resecado.

ESTUDIO HISTOLÓGICO:

Los cuatro modelos fueron concordantes con sus muestras originales, como se ejemplifica en la siguiente imagen.

RESULTADOS

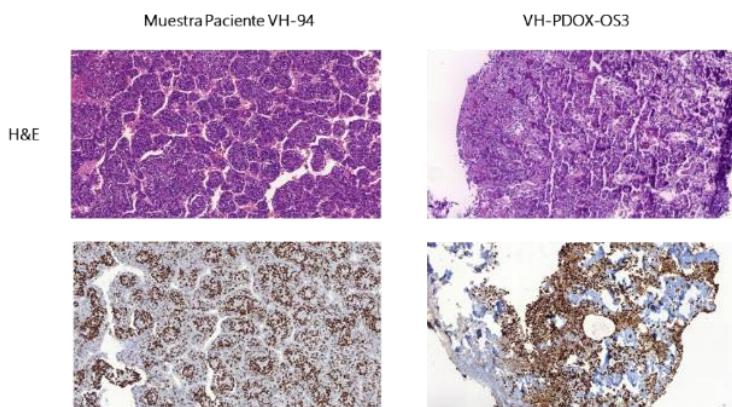


Figura 41. VH-PDOX-OS3. Imágenes de comparativa histológica entre la muestra del paciente y el modelo en ratón, prácticamente superponibles.

La muestra de la que se originó el modelo VH-PDOX-OS4, fue inicialmente informada como de “tumor no viable” en el informe del paciente. Se trataba de un paciente con enfermedad metastásica bipulmonar y pleural de evolución muy larvada y estable. Fue sometido a tratamiento quirúrgico agresivo, resecando más de 80 micronódulos de ambos pulmones. En el modelo PDOX, el tumor mantuvo las características propias de un osteosarcoma, pero pasó de una baja celularidad a una celularidad alta. Se trata del único de los 3 pacientes con osteosarcoma de los que se generó un PDOX que sigue vivo.

ESTUDIO GENÓMICO:

Los modelos VH-PDOX-OS1 y VH-PDOX-OS2 provienen de recaídas metastásicas pulmonares sucesivas en la misma paciente. La muestra de la recaída de la que proviene el modelo VH-PDOX-OS1 se secuenció dentro del programa COMIK, identificándose dos mutaciones patogénicas y de pérdida de función, una en el gen *TP53* (NM_000546.6: c.782+1G>T (variante dadora de *splicing*) y otra en el gen *ATRX* (T1582Nfs*19).

El modelo VH-PDOX-OS3 deriva de una muestra en la que se detectó una amplificación de gen *CCNE1* (Ciclina E1) que forma parte del ciclo celular. Ciclina E1 regula a *Cdk2*, cuya actividad es necesaria para la transición G1/S del ciclo. *CCNE1* es uno de los genes amplificados de manera recurrente en los osteosarcomas (33% de los pacientes) (117). La amplificación de ciclina E1 es común en muchos tipos de cáncer y se asocia con peor pronóstico y resistencia a quimioterapia.

RESULTADOS

La muestra del modelo VH-PDOX-OS4 no pudo ser secuenciada en COMIK ya que no cumplía el criterio de inclusión de tener un mínimo de contenido tumoral viable del 30%.

3.2.4.6 Sarcoma de Ewing

En el transcurso de la tesis se establecieron 3 modelos PDOX de Sarcoma de Ewing, procedentes de 3 pacientes; dos de ellos al diagnóstico, y el tercero, en recaída metastásica pulmonar. En los tres casos se confirmó la presencia de translocaciones *EWR1* en el tumor, que es el evento *driver* que define a este tipo de sarcomas. La tasa de *engraftment* fue del 21%.

ESTUDIO HISTOLÓGICO:

Desafortunadamente, no pudimos disponer de material procedente de los VH-PDOX-EWS1 y VH-PDOX-EWS2 para su caracterización histológica, por haber sucedido dos incidentes durante el procesamiento de las muestras. Estos modelos proceden de una muestra al diagnóstico en un tumor de riesgo intermedio, y de una muestra post-tratamiento de una recaída metastásica pulmonar, respectivamente.

El único modelo disponible para el estudio histológico comparativo fue el VH-PDOX-EWS3, procedente de una biopsia al diagnóstico del tumor primario, en un paciente de alto riesgo (metastásico). El modelo resultó concordante, con la única diferencia de mostrar un patrón expansivo frente al infiltrativo del tumor original, así como un índice mitótico más elevado (3 mitosis en el paciente frente a 23 en el PDOX).

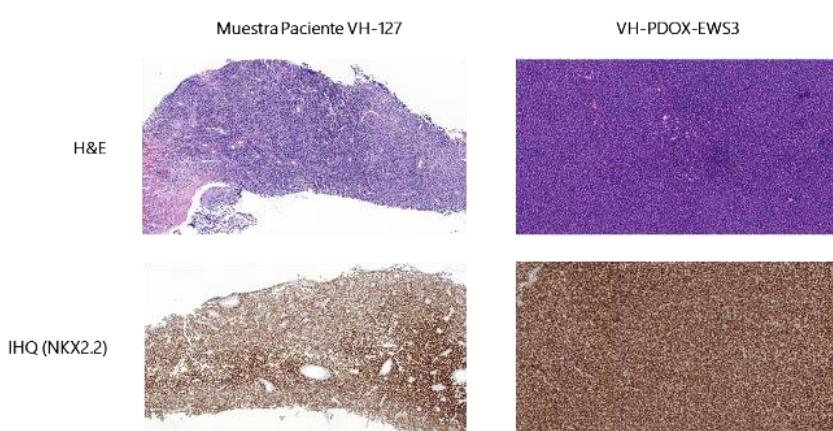


Figura 42. VH-PDOX-EWS3. Imágenes de comparativa histológica entre la muestra del paciente (biopsia con aguja gruesa) y el modelo en ratón. Podemos apreciar un patrón similar morfológico e IHQ.

RESULTADOS

ESTUDIO GENÓMICO:

El modelo de VH-PDOX-EWS2 deriva de una muestra de la recaída metastásica pulmonar de la paciente que se secuenció dentro del programa internacional de Medicina Personalizada MAPPYACTS. Los resultados del WES y el RNAseq revelaron mutaciones patogénicas en *STAG2* (NM_001042749.2: c.819+1G>A, variante dadora de *splicing*) y en *FGFR1* (*p.K656E*), además de la translocación *EWSR/FLI1* (*t(22;11)(q12.2;q24.3)*).

La muestra de la biopsia al debut del paciente de la que deriva el modelo VH-PDOX-EWS3 se secuenció dentro del programa COMIK al ser un paciente con un tumor metastásico y de alto riesgo al diagnóstico. Mediante el WES se identificó una delección en homocigosis de los genes supresores de tumores *CDKN2A* y *CDKN2B*. Ambas proteínas inhiben a las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6, provocando la detención del ciclo celular. Por lo tanto, la pérdida de función de *CDKN2A* y *CDKN2B* causa una desregulación de la progresión del ciclo celular.

La muestra de la que deriva el modelo VH-PDOX-EWS1 (biopsia con aguja gruesa al debut) no se secuenció en el programa COMIK al tratarse de un sarcoma de Ewing localizado de riesgo intermedio/estándar. Sí se estudiaron las translocaciones de *EWSR1* por PCR con retrotranscripción (RT-PCR) y se identificó una translocación de *EWSR1*, aunque los *primers* específicos para *EWS/FLI* (85% de los casos) y *EWS/ERG* (9-14% de los casos) resultaron negativos. Esto indicaría que el tumor podría pertenecer al pequeño porcentaje de tumores (entre el 1 y el 5%) que presentan otras traslocaciones entre *EWSR1* y otros genes relacionados estructuralmente con *FLI* (*EWSR1/ETV1*, *EWSR1/ETV4* y *EWSR1/FEV*).

Como dato relevante del mismo paciente, al observarse una mala respuesta tras 9 ciclos de quimioterapia, sí se decidió secuenciar en COMIK la muestra VH-62, procedente de la cirugía del tumor primario, situado en la cresta ilíaca derecha. En ese momento el tumor pasó a considerarse como tumor refractario y de alto riesgo. El WES de la muestra del paciente VH-62 identificó una delección del gen *ERRFI1* en el tumor del paciente. *ERRFI1* está considerado un gen supresor de tumores que codifica una proteína involucrada en la regulación de los receptores ERBB y cuya pérdida promueve la progresión del cáncer en modelos animales (118) (119). Las delecciones y mutaciones de pérdida de función de *ERRFI1* son frecuentes en algunos tipos de tumores y se ha descrito como un indicador de mal

RESULTADOS

pronóstico (120) (121). En los sarcomas de Ewing, las delecciones de *ERRFI1* no se han descrito como frecuentes, aunque se ha descrito que *ERRFI1* es un sitio de unión de ETS reprimido por la proteína de fusión EWS-FLI1, por lo tanto, la proteína de fusión EWS-FLI1 silenciaría la expresión de este gen (122).

3.2.4.7 Otro sarcoma óseo

Como comentamos con anterioridad, no se pudo estudiar comparativamente la histología del modelo VH-PDOX-SO-NOS1 con la muestra original, pero el examen histológico aislado del tejido del PDOX fue morfológicamente compatible con un sarcoma indiferenciado (células fusiformes).

El modelo establecido VH-PDOX-SO-NOS1 derivó de una muestra procedente de la tercera recaída de una paciente con 19 años con un sarcoma óseo indiferenciado NOS (*not otherwise specified*). La muestra se había secuenciado dentro del programa alemán de medicina personalizada INFORM, donde se realizaron estudios de WES, WGS, RNAseq y metilación del ADN. Estos estudios identificaron varias alteraciones patogénicas en el tumor; delección de *CDKN2A/CDKN2B*, amplificación de *TERT*, delección de *NF1* y la traslocación *TPM3-NTRK1*. Basándose en estos hallazgos, se recomendaron los inhibidores de NTRK como opción terapéutica con prioridad alta y fue derivada a nuestro centro para formar parte del ensayo clínico pediátrico con Larotrectinib en la Unidad de Ensayos Clínicos del Servicio de Oncología y Hematología Pediátricas. La paciente respondió correctamente al tratamiento (respuesta metabólica en la tomografía por emisión de positrones y respuesta parcial del 53% por criterios RECIST- *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*), sin mostrar signos de recaída o progresión durante los 10 meses en los que se siguió en nuestro centro. Posteriormente regresó a su país de origen y se perdió para el seguimiento.

RESULTADOS

3.2.5 Otros tumores

3.2.5.1 Retinoblastoma

Se estableció un modelo de retinoblastoma, VH-PDOX-RB1, procedente de un paciente afecto de un retinoblastoma moderadamente diferenciado que al diagnóstico requirió la enucleación de ese ojo por presentar un estadio local avanzado (pT2a). La tasa de *engraftment* fue del 33%. Los dos modelos que no se establecieron procedían de muestras de pacientes que habían recibido tratamiento quimioterápico previo.

ESTUDIO HISTOLÓGICO:

El modelo resultó concordante, aunque sufrió una cierta desdiferenciación, resultando en un retinoblastoma indiferenciado o moderadamente indiferenciado.

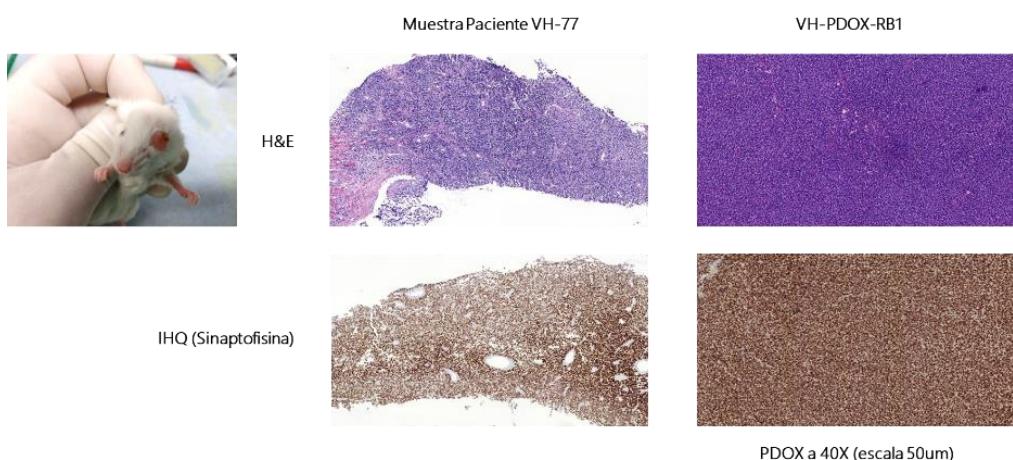


Figura 43. VH-PDOX-RB1. Imagen del ratón en el que se implantó el tumor, apreciando la afectación evidente del ojo izquierdo. Comparativa histológica concordante, pero con cierta desdiferenciación en el PDOX

ESTUDIO GENÓMICO:

La muestra del paciente de la que deriva el modelo de PDOX de retinoblastoma VH-PDOX-RB1 no se secuenció dentro del programa COMIK ya que estaba clasificado en el grupo de riesgo intermedio/estándar.

Se realizó el estudio de la secuenciación completa de *RB1* por sospecha de retinoblastoma hereditario familiar, confirmando una delección de *RB1* en la línea germinal. El 40% de los casos de retinoblastoma son familiares y están asociados a mutaciones germinales en *RB1* que predisponen a la enfermedad con un carácter autosómico dominante (123) (124).

RESULTADOS

3.2.5.2 Tumores SNC

Se estableció un modelo de meduloblastoma, VH-PDOX-CNS1, a partir de una muestra no tratada de meduloblastoma clásico cerebeloso diseminado, categorizado de muy alto riesgo. La tasa de *engraftment* fue del 33%, habiendo fracasado en la generación de PDOX otras dos muestras al diagnóstico (un meduloblastoma y un tumor rabdoide atípico o ATRT).

ESTUDIO HISTOLÓGICO:

El tumor del PDOX se diseminó por las leptomeninges, de manera similar al tumor original. La inmunohistoquímica para sinaptofisina resultó negativa tanto en el modelo animal como en la muestra procedente del paciente disponible para la comparativa. Sin embargo, en el informe anatomo-patológico original parece que esta era positiva de forma difusa. Ante esta discrepancia, atribuida por el equipo de anatomo-patólogas y técnicas de laboratorio a algún tipo de problema con la muestra almacenada o con el anticuerpo, se decidió basar la comparativa únicamente en la hematoxilina-eosina, y esta resultó concordante.

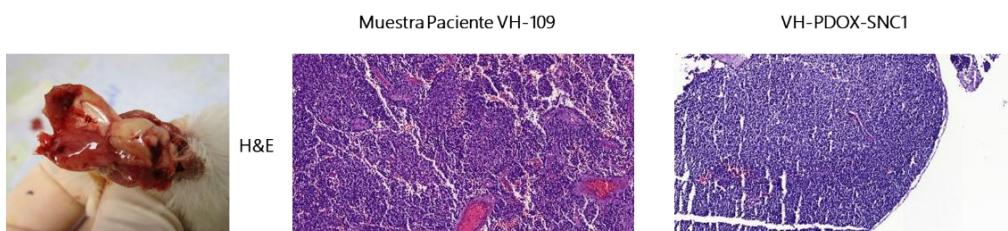


Figura 44. VH-PDOX-SNC1. Necropsia del ratón en el que se implantó el tumor, con craneotomía. Comparativa histológica concordante en la tinción de H&E.

ESTUDIO GENÓMICO:

El tumor del paciente del modelo VH-PDOX-CNS1 se estudió con el panel Oncomine™ Childhood Cancer Research Assay, Termo Fisher Scientific y, además, se realizaron estudios moleculares en el Hospital de Cruces, que caracteriza los meduloblastomas a nivel nacional. En ambos estudios se detectó la amplificación de *MYCN*. Los estudios moleculares revelaron una monosomía del cromosoma 6 y *MYCN* amplificado, clasificándose como Meduloblastoma clásico grado IV (OMS 2016), Grupo 4. No se identificaron otras alteraciones potencialmente relevantes.

RESULTADOS

3.2.5.3 Tumores germinales y/o gonadales

Se estableció un modelo de disgerminoma ovárico, VH-PDOX-GCT1, a partir de una muestra procedente de un tumor no tratado, intervenido al debut, y localmente avanzado (pT2b N1b M0).

La tasa de *engraftment* para los tumores germinales y gonadales fue del 17%, no habiéndose generado modelos de otras 5 muestras (otros dos disgerminomas, un tumor de células de la granulosa juvenil, y dos tumores del saco embrionario – uno testicular y otro ovárico). Todas las muestras procedían de cirugías al debut, excepto en el tumor testicular, que precisó tratamiento quimioterápico previo por una enfermedad metastásica muy avanzada y en uno de los disgerminomas, que se diagnosticó con ascitis e implantes peritoneales.

El estudio comparativo histológico del modelo VH-PDOX-GCT1 fue totalmente concordante con el tumor original de la paciente.

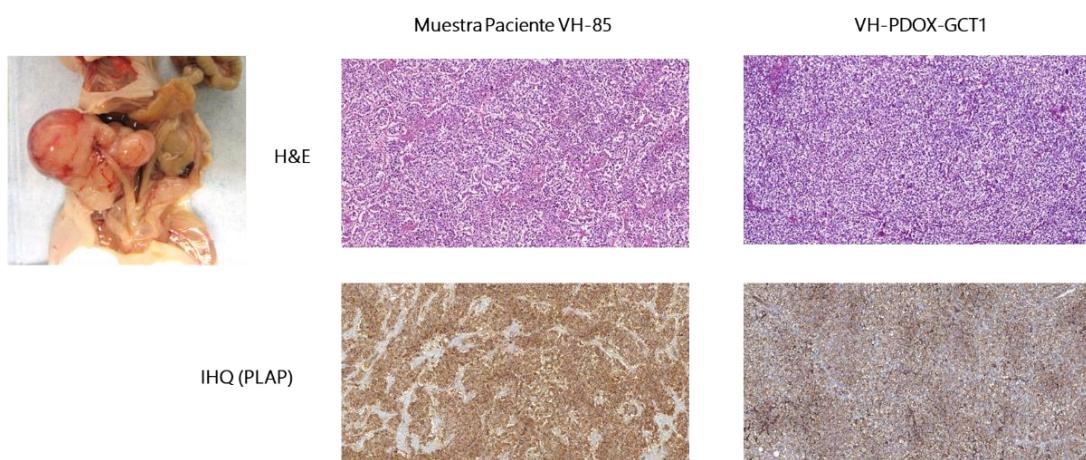


Figura 45. Necropsia de la ratona en la que se implantó el tumor, afectando al ovario derecho. Comparativa histológica totalmente concordante.

La muestra de la paciente de la que deriva el modelo de PDOX de disgerminoma VH-PDOX-GCT1 no se secuenció dentro del programa COMIK ya que estaba clasificado de riesgo intermedio/estándar.

RESULTADOS

3.3 Aplicación de los modelos: Medicina personalizada en tiempo real e investigación sobre modelos preclínicos

A continuación, se pasa a describir las estrategias de medicina de precisión/personalizada en tiempo real realizadas en esta tesis.

Queremos resaltar la complejidad y dificultad que implican llegar a realizar esta aproximación en tiempo real, tanto por las cuestiones técnicas inherentes del proceso, como por las limitaciones temporales impuestas por la evolución de la enfermedad en los niños con tumores de mal pronóstico o refractarios. Es necesario destacar que las limitaciones económicas impuestas tanto por el elevadísimo coste de muchos de los fármacos usados en los experimentos *in vivo* en animales, como de la realización de los estudios de WES y otros en los PDOX/*orthoxenografts*, nos han obligado a ajustar nuestra aproximación.

A pesar de todas estas limitaciones, hemos logrado realizar una aproximación experimental en tres casos de muy mal pronóstico que pasaremos a describir a continuación. Los análisis estadísticos de los experimentos corresponden al test T de Student.

i) Rabdomiosarcoma genitourinario; ii) Tumor rabdoide-teratoide hepático (MRT); y (iii) Tumor de Wilms de alto riesgo resistente a la quimioterapia.

i) Paciente 1: Rabdomiosarcoma genitourinario (VH-PDOX-RMS1).

Descripción del caso clínico: Paciente varón de 6 años, con diagnóstico de rabdomiosarcoma embrionario de uretra prostática. Debut como masa gigante (127 x 80 x 98 mm) con múltiples metástasis pulmonares, en suelta de globos, pleurales y con metástasis óseas en el pubis (IRS IV, T2b N0). El paciente recibe tratamiento según protocolo BERNIE-EpSSG para sarcomas de partes blandas metastásicos, consistente en nueve cursos de quimioterapia de inducción, que comprenden cuatro ciclos de ifosfamida, vincristina, actinomicina-D y doxorrubicina (régimen IVADo) y cinco ciclos de ifosfamida,

RESULTADOS

vincristina y actinomicina-D (IVA). Además, se le administra bevacizumab por vía intravenosa a dosis de 7,5 mg/kg cada 3 semanas el día 1 de cada ciclo. Después del 7^a ciclo de quimioterapia, y tras una ventana de 4 semanas desde la última dosis de bevacizumab, se realiza la primera intervención quirúrgica (resección parcial R2, dado que la resección completa en ese momento suponía una cirugía mutilante), seguida de radioterapia local (41,4 Gy en lecho con *boost* 50,4 Gy en resto tumoral) y bipulmonar (15 Gy) en combinación con los dos últimos ciclos de ifosfamida-vincristina y bevacizumab.

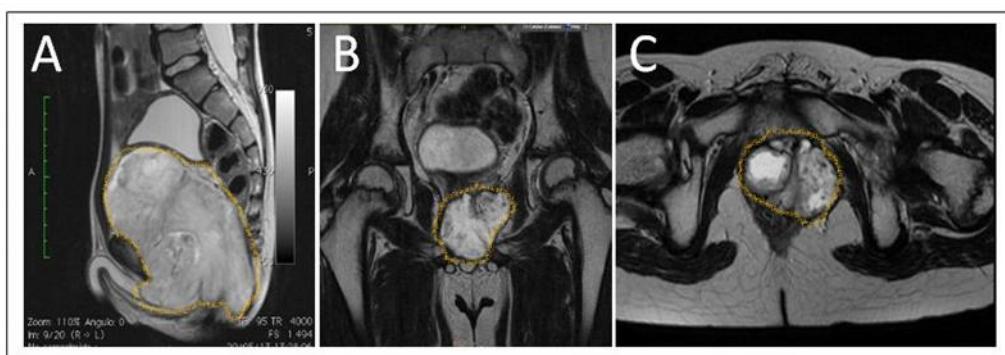


Figura 46. A) RMN pélvica al diagnóstico. B y C) RMN pre-operatorias de la primera recaída tras el tratamiento multimodal. El tumor se ha delineado con lapicero amarillo.

Posteriormente, el paciente recibe quimioterapia de mantenimiento, consistente en 12 ciclos de vinorelbina y ciclofosfamida a dosis bajas (para una duración total planificada del tratamiento de 18 meses), y bevacizumab a dosis de 5,0 mg/kg cada 2 semanas los días 1 y 15 de cada ciclo. Un año después de completado el tratamiento local se constata recaída local de la enfermedad, realizándose una nueva intervención quirúrgica, esta vez con intención radical (prostatectomía radical retropúbica, cistectomía parcial, ampliación vesical y neoconducto cateterizable tipo Mitrofanoff). *Es en esta segunda intervención donde procede la muestra para la generación de PDX y para la secuenciación del tumor.* Después de la intervención se inicia tratamiento de quimioterapia de 2^a línea (Gemcitabina + Docetaxel).

RESULTADOS



Figura 47. A) TAC en la segunda recaída, donde se observa recaída local y progresión metastásica ósea, pulmonar y hepática.

Pasados 7 meses de la cirugía, el paciente presenta falta de respuesta y una segunda recaída locoregional y progresión metastásica pulmonar, hepática y ósea, por lo que se pasa a 3^a línea de tratamiento con vincristina-irinotecan. Posteriormente inicia temozolomida 150 mg/m²/día x 5 cada 28 días. Finalmente, recibió dos dosis de trabectedina (1,5 mg/m²) aprobada para su uso compasivo, pero el paciente fallece, habiendo transcurrido 2 años desde su diagnóstico.

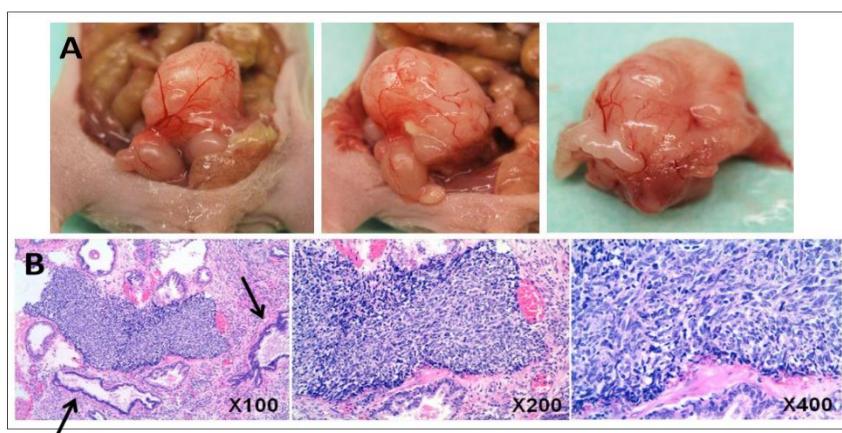


Figura 48. A) Orthoxenograft/PDOX generado implantando un fragmento tumoral sólido en la próstata de un ratón macho, procedente de la cirugía radical realizada tras recaída local. B) H&E: Rabdomiosarcoma embrionario creciendo en la próstata del ratón, observándose las glándulas prostáticas (flechas).

Generación del PDOX/orthoxenograft. El tumor se implantó ortotópicamente en la próstata de dos ratones atípicos y en el tejido subcutáneo en un tercer ratón, creciendo únicamente en los ratones ortotópicos.

Estudio genómico del tumor: Se estudió la presencia de mutaciones relevantes en el paciente en alguno de los 57 genes incluídos en el Panel Amplicon-Seq VHIO-Card V3 del Vall d'Hebron Instituto de Oncología (VHIO). Estos genes/mutaciones se han incluido por su potencial relevancia a la hora de seleccionar terapias dirigidas concretas. Se identificó una mutación de ganancia de función en el gen FGFR4 (G636C).

La mutación FGFR4 (G636C) no ha sido descrita previamente en rabdomiosarcomas embrionarios, en los cuales FGFR4 es uno de los genes más frecuentemente mutados. En la base *Cancer Genome Interpreter* aparece como mutación *driver*, por lo que el cambio de

RESULTADOS

una glicina a una cisteína en el aminoácido 636 podría tener importantes implicaciones al activar de forma constitutiva la vía de señalización. Actualmente, estamos realizando estudios *in vitro* para estudiar este aspecto. En base a estos resultados decidimos incluir en los esquemas de tratamiento el LY2874455, que es un pan-inhibidor de FGFR1, 2, 3 y 4. Este inhibidor, a diferencia de los inhibidores de FRGFR, también inhibe FGFR4 de forma específica y de una forma similar a como lo hace con FGFR1-3.

Evaluación de respuesta farmacológica (Experimento 1) a diferentes tratamientos en el PDOX original. Para realizar los estudios de efectividad de fármacos, uno de los dos tumores que creció se troceó en pequeños fragmentos de 4 x 4 mm³ que se implantaron en la próstata de 35 ratones atípicos macho de 7 semanas. Al crecimiento, los 33 ratones que presentaban un tamaño homogéneo se asignaron (n=3 ratones/grupo) de forma aleatoria a 11 grupos diferentes de tratamiento: i) Vehículo; ii) Everolimus (1.5 mg/kg, oral); iii) Sorafenib (60 mg/kg, oral); iv) Pazopanib (50 mg/kg, oral); v) Crizotinib (40 mg/kg, oral); vi) LY2874455 (3 mg/kg, oral); vii) Nintenadib (100 mg/kg, oral); viii) Trabectedin (0.15 mg/kg, inyección intravenosa); ix) Gemcitabina (5 mg/kg, inyección intraperitoneal) + Docetaxel (25 mg/kg, inyección intravenosa); x) Irinotecan (20 mg/kg, inyección intraperitoneal); y xi) Fármaco X (0.16 mg/kg, inyección intravenosa). Todos los ratones se trataron durante tres semanas (21 días), según las dosis y vía de administración indicadas. Los fármacos se administraron siguiendo la pauta de cinco días seguidos y dos de descanso (fin de semana) por tres ciclos, excepto Trabectedin y Fármaco X (1 vez cada 7 días por tres ciclos), Docetaxel (1 vez cada 4 días por tres ciclos), Irinotecan y Gemcitabina (1 vez cada 4 días por cinco ciclos).

Los resultados se resumen en el siguiente gráfico:

RESULTADOS

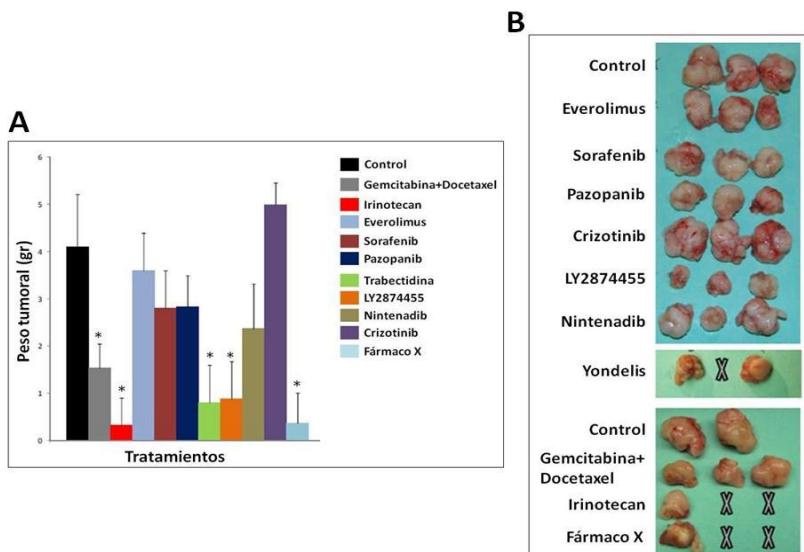


Figura 49. A) Resultados de evaluación de fármacos en el PDOX. Cada tratamiento fue evaluado en 3 ratones. Al finalizar el tratamiento (21 días), los ratones fueron sacrificados, y los tumores extirpados y pesados. Sólo en el caso de detectar respuestas totales (no presencia de masa tumoral a palpación), los ratones se mantuvieron vivos para estudiar el recrecimiento tumoral. B) Imagen macroscópica de las masas residuales. X, Indica que en estos ratones no se observó a palpación la presencia de masas residuales tras tratamiento, por lo que no se sacrificaron. Recrecimiento con masas palpables homogéneas: Trabectidin (Yondelis®) (creció 40 días post-tratamiento); Fármaco X (ambos crecieron entre 30-55 días post-tratamiento); Irinotecan (uno creció 54 días post-tratamiento y el otro no creció). * p-value ≤ 0.05

Evaluación de respuesta farmacológica (Experimento 2) a diferentes tratamientos en el PDOX tratado de forma análoga al paciente. Tras la intervención en la que se obtiene la muestra para la generación del PDOX, el paciente fue tratado en segunda línea con Gemcitabina+Docetaxel. Así, para mimetizar esta situación, el segundo ratón con el PDOX creciendo fue tratado con Gemcitabina+Docetaxel durante 21 días siguiendo el esquema descrito en el apartado anterior. Al finalizar el tratamiento, podía apreciarse a la palpación una pequeña disminución y estabilización del tumor, retrasando su crecimiento. De forma conjunta, los resultados en el ratón sugerían que esta combinación tendría un efecto bastante moderado en el tratamiento del tumor en el niño, como se constató clínicamente.



Figura 50. A) Segundo ratón implantado con el rabdomiosarcoma original tras 21 días de tratamiento con 5 ciclos de Gemcitabina + Docetaxel. Al sacrificio, este tumor post-tratamiento fue implantado en ratones para evaluación de respuesta.

RESULTADOS

En este experimento evaluamos si las terapias identificadas como efectivas a nivel preclínico en el experimento anterior con el tumor original (Irinotecan, Trabectedin y el Pan-FGFR inhibidor LY2874455), lo eran también en el tumor ya tratado con Gemcitabina y Docetaxel. Además de evaluarlas en monoterapia, evaluamos varias potenciales combinaciones con LY2874455. Así, el tumor ya tratado se troceó en fragmentos de 4 x 4 mm³ y se implantó en la próstata de 22 ratones atípicos machos de 7 semanas. Al crecimiento, los 18 ratones que presentaban un tamaño tumoral homogéneo se aleatorizaron y se asignaron ($n=3$ ratones/grupo) a 6 grupos diferentes de tratamiento: i) Control; ii) Irinotecan (20 mg/kg, inyección intraperitoneal); iii) Trabectedin (0.15 mg/kg. inyección intravenosa); iv) LY2874455 (3 mg/kg, oral); v) LY2874455 (3 mg/kg, oral) + Irinotecan (20 mg/kg, inyección intraperitoneal); y vi) LY2874455 (3 mg/kg, oral) + Gemcitabina (5 mg/kg, inyección intraperitoneal). Igual que en el experimento previo, los ratones se trataron durante tres semanas (21 días), según dosis, vía y pauta de administración indicados previamente.

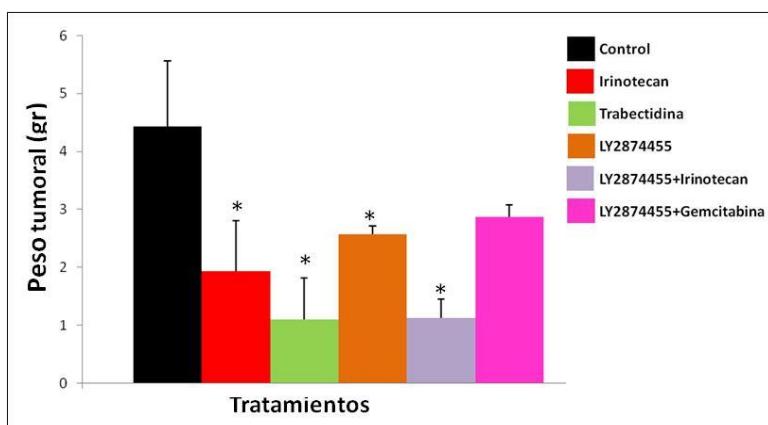


Figura 51. Resultados de evaluación de fármacos en el PDOX previamente tratado con Gemcitabina y Docetaxel. Cada tratamiento fue evaluado en 3 ratones. Al final del tratamiento (21 días) todos los ratones fueron sacrificados, y los tumores extirpados y pesados. * p -value ≤ 0.05

Tras completar estos estudios y al disponer de los resultados de la secuenciación del tumor, que identificaba una mutación que podría ser activante en el receptor FGFR4 (no descrita hasta la fecha), se sugirió que tanto la Trabectedina como el Pan-FGFR inhibidor (LY2874455), en monoterapia o combinados con Irinotecan o Gemcitabina, podían ayudar en el tratamiento del niño. La decisión del equipo clínico fue la de tratar al paciente de forma compasiva con Trabectedina, que había mostrado ser eficaz en el estudio preclínico. Desafortunadamente, el niño solo pudo ser tratado con dos dosis del fármaco, falleciendo

RESULTADOS

días después. El tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra para generar el PDX y el fallecimiento del paciente fue de 8 meses.

ii) Paciente 2: Tumor rabdoide-teratoide hepático (MRT) (VH-PDOX-MRT1 y VH-PDOX-MRT2)

Descripción del caso: Lactante de 11 meses de edad y sexo femenino, diagnosticada de masa hepática multifocal con afectación de todos los sectores hepáticos (estadio local PRETEXT IV), con metástasis pulmonares bilaterales (estadio IV) y derrame neoplásico, y niveles de AFP inferiores a 100ng/mL.

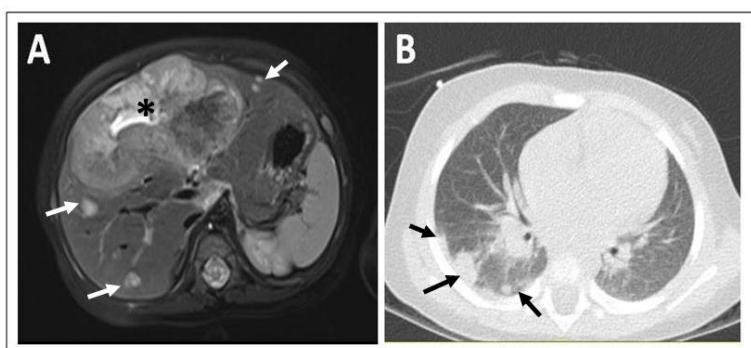


Figura 52. A) RMN abdominal al diagnóstico donde se observa una gran masa en el segmento IV hepático (*) con multifocalidad en el resto de los sectores (flechas). B) TAC torácico en el que se identifican metástasis pulmonares bilaterales (flechas).

Se obtienen muestras al debut mediante Tru-Cut (pre-tratamiento, 7 cilindros), realizando una segunda biopsia incisional + Tru-Cut para ampliación de pruebas histológicas. El diagnóstico anatomo-patológico fue de tumor rabdoide-teratoide extracraneal-extrarrenal hepático (eMRT), con un Ki67 del 60%. *Uno de los cilindros, así como un pequeño fragmento de la biopsia incisional, se utilizaron para la generación del PDOX.*

La paciente recibe tratamiento según recomendaciones del registro EU-RHAB: 1º ciclo con Adriamicina, 2º ciclo con Carboplatino, Etopósido (VP-16) e Ifosfamida, 3er ciclo con Vincristina, Actinomicina, Ciclofosfamida y 4º ciclo con Adriamicina. A partir del 4º ciclo presenta progresión y refractariedad al tratamiento, con progresión del derrame pleural y aparición de implantes pleurales masivos, falleciendo a los 80 días del diagnóstico. El estudio genético en línea germinal resultó negativo para la mutación de *SMARCB1*.

RESULTADOS

Generación del PDOX/orthoxenograft: Las dos muestras tumorales (cilindro y fragmento de biopsia incisional) se implantaron ortotópicamente en un pequeño bolsillo hecho en el hígado del ratón, creciendo en los dos casos y dando lugar a los VH-PDOX-MRT1 y VH-PDOX-MRT2.

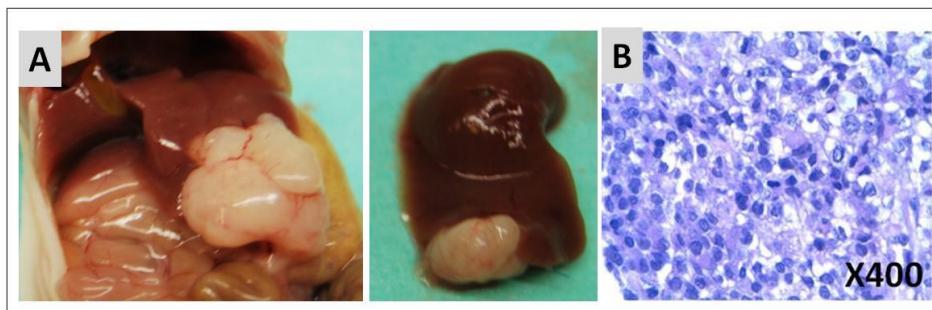


Figura 53. A) Orthoxenograft/PDOX generado tras implantación de una biopsia/cilindro en el hígado del ratón a partir de las muestras diagnósticas tomadas antes de iniciar el tratamiento con quimioterapia. B) La H&E muestra un tumor rabdoide creciendo en el ratón.

Estudio mutacional del tumor: Tanto el tumor primario como la sangre de la paciente (línea germinal) se estudiaron por WES. Se identificó una delección en homocigosis del gen *SMARCB1/INI1* en el tumor, pero no en la línea germinal. La inmunohistoquímica de *SMARCB1/INI1* fue negativa en el tumor primario y en el PDOX. Estudios posteriores realizados por *Western Blot* del PDOX no identificaron la presencia de proteína INI1. Todas estas evidencias nos permiten concluir que *SMARCB1* esté probablemente deletreado en homocigosis en el modelo PDOX. Se ha descrito que las células con mutaciones en *SMARCB1* dependen del componente del complejo represor de Polycom 2 (PRC2), EZH2, lo que llevó a abrir ensayos clínicos con inhibidores de EZH2 en pacientes con tumores con mutaciones en *SMARCB1* (125).

Evaluación de respuesta a diferentes tratamientos en el PDOX: Para realizar los estudios de efectividad, el tumor crecido en el hígado del ratón se troceó en fragmentos de 4 x 4 mm³ y se implantó en el hígado de 20 ratones atípicos hembras de 7 semanas. Al crecimiento, los 19 ratones que presentaban un tamaño homogéneo (se descartó uno) se aleatorizaron y se asignaron ($n=3$ ratones/grupo, excepto en el grupo control y cisplatino que fueron $n=2$) a 8 grupos diferentes de tratamiento: i) Vehículo ($n=2$); ii) Irinotecan (20 mg/kg, inyección intraperitoneal); iii) GSK503 (inhibidor de EZH2 que es la subunidad

RESULTADOS

catalítica del complejo represor de Polycom 2 (PRC2)(50 mg/kg, oral), iv) Temozolamida (40 mg/kg, inyección intraperitoneal); v) Topotecan (1 mg/kg, inyección intraperitoneal); vi) Doxorrubicina (3 mg/kg, inyección intraperitoneal); y vii) Cisplatino (n=2) (4 mg/kg, inyección intraperitoneal). Todos los ratones se trajeron durante tres semanas (21 días), según las dosis y vías de administración indicadas. El GSK503 se administró siguiendo una

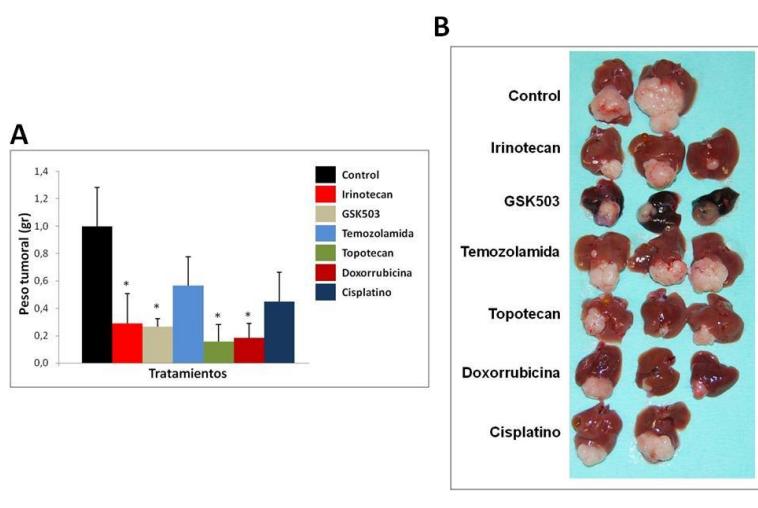


Figura 54. A) Resultados de la evaluación de fármacos en el PDOX. Cada tratamiento fue ensayado en 3 ratones, excepto para el grupo control y el cisplatino, que se hizo en 2 ratones. Al finalizar el tratamiento (21 días), todos los ratones fueron sacrificados, y los tumores extirpados del hígado, pesados y medidos. B) Imagen macroscópica de las masas residuales al sacrificio de los ratones. * $p\text{-value} \leq 0.05$.

pauta de cinco días seguidos y dos de descanso (fin de semana) por tres ciclos, mientras que el Irinotecan (1 vez cada 4 días), el Cisplatino y el Topotecan (1 vez cada 7 días) y la Doxorrubicina (1 dosis cada 10 días).

Desafortunadamente, la paciente falleció 80 días después del diagnóstico, mientras finalizábamos los estudios preclínicos de respuesta a los fármacos seleccionados por el equipo clínico. De nuestro estudio se infiere que los fármacos Topotecan, Doxorrubicina y GSK503 podrían haber sido tratamiento potenciales para estabilizar la enfermedad, reduciendo o frenando el crecimiento del tumor, pero no eliminándolo por completo, dada la aparente viabilidad de las masas residuales. Es importante resaltar que los ratones tratados con GSK503 (inhibidor de la metiltransferasa EZH2) presentaron una toxicidad media-alta, casi en el límite de la tolerabilidad.

RESULTADOS

iii) Paciente 3: Tumor de Wilms de alto riesgo refractario a la quimioterapia (VH-PDOX-WT7)

Descripción del caso: Paciente de 6 años y sexo femenino que se diagnostica en otro centro de una masa de gran tamaño, confinada inicialmente al riñón derecho por pruebas de imagen, y que ocasiona dolor, con requerimiento de mórficos, distensión abdominal, circulación colateral y oliguria progresiva. Se realiza una biopsia percutánea por presentar características atípicas, informada de la presencia de un tumor de Wilms.

Inicia tratamiento conforme a Protocolo UMBRELLA 2016 SIOP-RTSG (Vincristina 1,5 mg/m² x 4 dosis semanales, Actinomicina 45mcg/kg x 2 dosis quincenales). Tras las 4 semanas iniciales de tratamiento, presenta anemización y diseminación metastásica apareciendo dos nódulos pulmonares, derrame pleural y crecimiento tumoral con rotura capsular e invasión diafragmática. En ese momento se decide el traslado de la paciente a nuestro centro desde su comunidad autónoma de origen, en una situación de estado crítico (síndrome compartimental abdominal, insuficiencia respiratoria restrictiva), para valoración de cirugía. Debido a la situación de la paciente y a la refractariedad a la quimioterapia del tumor, se decide realizar la intervención quirúrgica antes de completar la quimioterapia de inducción.

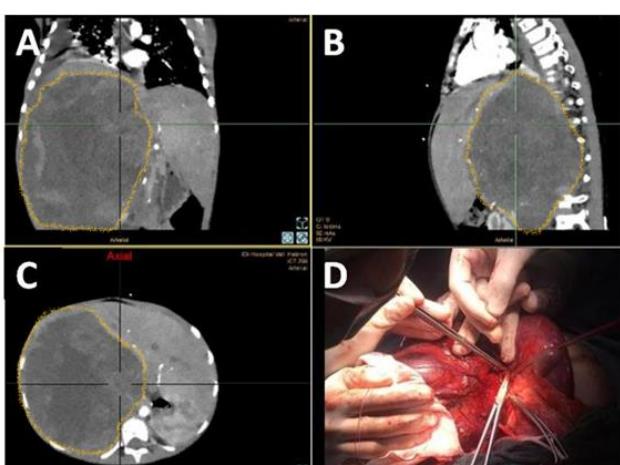


Figura 55. A-C) Imágenes del AngioTAC tóraco-abdominal previo a la cirugía donde se observa una enorme masa originada en el riñón derecho, desplazando las estructuras torácicas y abdominales. El tumor se ha delineado con lapicero amarillo. D) Imagen intraoperatoria del control vascular; el tumor está rechazado con una gasa.

Se realiza con éxito la resección tumoral, que incluye en bloque el riñón derecho, la glándula suprarrenal, una resección atípica hepática y parte del diafragma, y se remiten

RESULTADOS

adenopatías para estudio. *El modelo PDOX se genera a partir de las muestras obtenidas de esta cirugía, así como los análisis genómicos.*

El estadiaje final es un estadio local III N1, y un estadio IV de la enfermedad por la presencia de líquido pleural positivo para células malignas con nódulos pulmonares sospechosos. La histología es informada como nefroblastoma tipo blastematoso con un 10% de anaplasia (alto riesgo), existiendo un 90% de tejido viable y 10% de necrosis.

Tras la cirugía, la paciente recibe el siguiente esquema de tratamiento, consistente en diferentes ciclos de quimioterapia combinados con radioterapia y un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASPE), incluyendo: 1er ciclo: Vincristina 1,5 mg/m² días +1, Irinotecán 50 mg/m² en días +1 y +5. Radioterapia abdominal total 19,5Gy/13 fracciones. 2º ciclo: Ciclofosfamida 1000 mg/m² días +1, +2, +3, Carboplatino 200 mg/m² días +1,+2,+3 Etopósido 100 mg/m² días +1,+2,+3. 3er ciclo: Vincristina 1,5 mg/m². Radioterapia pulmonar 15Gy/10 fracciones. 4º ciclo: Vincristina 1,5 mg/m² +1 y +8, Irinotecan 50 mg/m² día +1 a +5. 5º ciclo: Ciclofosfamida 1200 mg/m² día +1, Doxorrubicina 50 mg/m² día +1, Vincristina 1,5 mg/m² día +1. 6º ciclo: Carboplatino 200 mg/m² día +1, +2, Etopósido 100 mg/m² día +1, +2, Ciclofosfamida 1000 mg/m² día +1, +2. 7º ciclo: Vincristina 1,5 mg/m²- 8º ciclo: ciclofosfamida 1200 mg/m² día +1, Doxorrubicina 50 mg/m² día +1, Vincristina 1,5 mg/m² día +1. 9º ciclo: Carboplatino 200 mg/m² día +1, +2, Etopósido 100 mg/m² día +1, +2, Ciclofosfamida 1000 mg/m² día +1, +2. TASPE.

Generación del PDOX/orthoxenograft: La muestra tumoral se implantó en tres ratones hembra, en uno de forma bilateral y en los otros dos en un riñón, creciendo el tumor en dos ratones y dando lugar al modelo VH-PDOX-WT7.

RESULTADOS

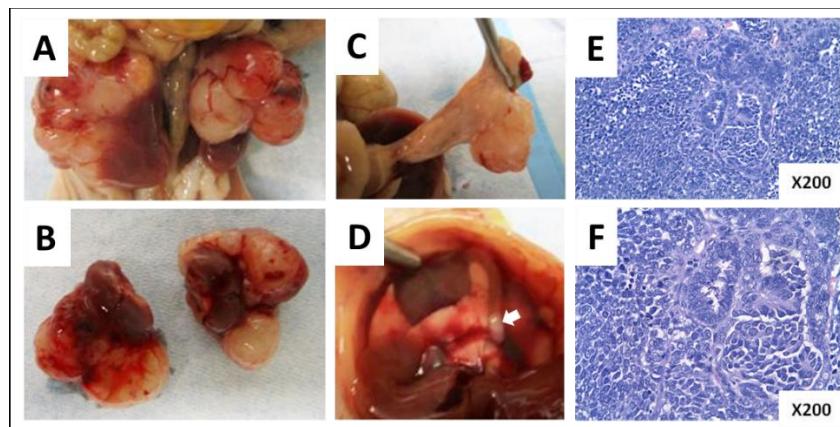


Figura 56. Orthoxenograft/PDOX generado tras implantación de un fragmento tumoral de forma bilateral en los riñones de un ratón atípico hembra. A y B) PDOX implantados y creciendo de forma bilateral en los dos riñones del ratón. C y D) Al sacrificio se identifica la presencia en este ratón de algunas metástasis peritoneales. Imagen C muestra un implante en el páncreas, mientras que la imagen D muestra un pequeño implante en el diafragma (flecha). E y F) La H&E muestra un tumor de Wilms creciendo en el ratón.

Resultados del estudio por WES del tumor primario:

Tipo de alteración	Gen/Alteración/Frecuencia Alélica	Función alterada/Terapias potenciales
Mutaciones puntuales somáticas (SNV)	TP53 (p.R337H-VAF: 89%)	Reparación del ADN y apoptosis/inhibidores de WEE1 (diana indirecta)
Inserciones/deleciones somáticas (Indel)	MLH1 (p.L559Cfs*32-VAF: 50% + una copia del gen perdida) ASXL1 (p.G645Vfs*58-VAF: 44%)	-Reparación del ADN (<i>Mismatch repair (MMR)</i> gene)/ <i>Immune checkpoint inhibitors</i> (inhibidores de PD1/PDL1) -Regulador epigenético/Sin potencial terapia
Alteraciones en el número de copias (CNV)	No detectadas	
Carga mutacional del tumor (TMB)	Baja: 1.25 mutations/Mb	
Inestabilidad de microsatélites (MSI)	Alta	Inestabilidad de microsatélites alta por vía de reparación del ADN (MMR) no funcional/ <i>Immune checkpoint inhibitors</i> (inhibidores de PD1/PDL1)
Variantes germinales (SNV and Indels)	No detectadas	

Tabla 14. Resultados WES Caso 3.

En el estudio genómico, se identificó como variante somática más relevante las mutación en el gen *TP53*. Sin embargo, los fármacos directamente dirigidos a P53 se encuentran en fases preclínicas o muy precoces, y ninguno de ellos está disponible para pacientes pediátricos. Únicamente existe la opción de fármacos que actúan indirectamente sobre P53, como los inhibidores de *WEE1*, para los que sí hay ensayos disponibles en población pediátrica. Las anomalías en el gen *MLH1* la y pérdida de una copia del gen, abrieron la puerta a la posibilidad de tratamiento con inmunoterapia con *checkpoint inhibitors*, existiendo varios ensayos clínicos abiertos para pacientes pediátricos en España.

RESULTADOS

Evaluación de respuesta farmacológica (Experimento 1) a diferentes tratamientos en el PDOX. Para realizar los estudios de efectividad de fármacos, uno de los dos tumores que creció se troceó en fragmentos de 4 x 4 mm³ y se implantó de forma unilateral en el riñón derecho de 17 ratones atípicos hembras de 7 semanas. Al crecimiento, los 17 ratones presentaban un tamaño homogéneo, aleatorizándose y asignándose (n=3 ratones/grupo, excepto grupo control que había n=2) a 5 grupos diferentes de tratamiento: i) Vehículo; ii) Olaparib (50 mg/kg, inyección intraperitoneal); iii) Bevacizumab (2 mg/kg; inyección intraperitoneal); iv) Sorafenib (60 mg/kg, oral); y v) Adavosertiv (40 mg/kg, oral). Todos los ratones se trajeron durante tres semanas (18 días), según las dosis y vías de administración indicadas. Olaparib, Sorafenib y Adavosertib se administraron siguiendo la pauta de cinco días seguidos y dos de descanso (fin de semana), mientras que Bevacizumab se administró una vez cada 5 días.

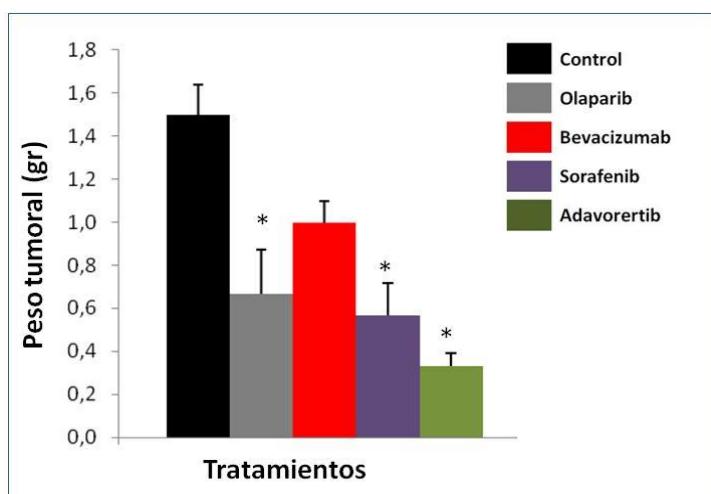


Figura 57. A) Resultados de evaluación de fármacos en el PDOX. Cada tratamiento fue evaluado en 3 ratones, excepto el grupo control que se evaluó en 2 ratones. Al finalizar el tratamiento (18 días), todos los ratones fueron sacrificados, y se pesó el tumor con el riñón. Olaparib es un inhibidor de PARP; Bevacizumab, es un anticuerpo anti-VEGF; Sorafenib, es un inhibidor multicinasa, y Adavosertib, es un inhibidor de Wee1. * p-value ≤ 0,05

Evaluación de respuesta a Atezolizumab (anti-PD-L1) en ratonas NSG humanizadas. Para evaluar la posible efectividad de los tratamientos de inmunoterapia, y concretamente de los ICI (Immune Check-Point Inhibitors) como el Atezolizumab (anticuerpo anti-PD-L1), humanizamos los ratones a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) aislados de la propia paciente. Para ello implantamos el PDOX en el riñón derecho de ratones hembra NSG jóvenes de seis semanas y, en paralelo, procedimos a aislar PBMCs a partir de una pequeña muestra de sangre (2-3 ml) de la paciente, para expandir posteriormente los linfocitos T (CD8) *in vitro*. El primer intento fracasó, ya que la paciente

RESULTADOS

presentaba linfopenia. Sin embargo, una vez que la paciente se hubo recuperado, sí se consiguió aislar y expandir los PBMCs *in vitro*. Para ello, se le adicionó al medio de cultivo IL-2 e IL-15. Este proceso de expansión se alargó lo máximo posible (20-25 días), con el objetivo de obtener el máximo número posible de linfocitos viables. Un mes después, a los ratones implantados (con los tumores en crecimiento y detectables a la palpación), se les inyectaron 7-10 millones de linfocitos por la vena de la cola, previa administración de Busulfán en las 24h anteriores. El proceso de expansión proporcionó suficientes linfocitos para intentar humanizar siete ratonas. Tras la humanización, se obtuvo una pequeña muestra de sangre de los animales a los 5 días, a los 18 y en el momento del sacrificio (25 días) para constatar por citometría de flujo la presencia de linfocitos CD8 humanos.

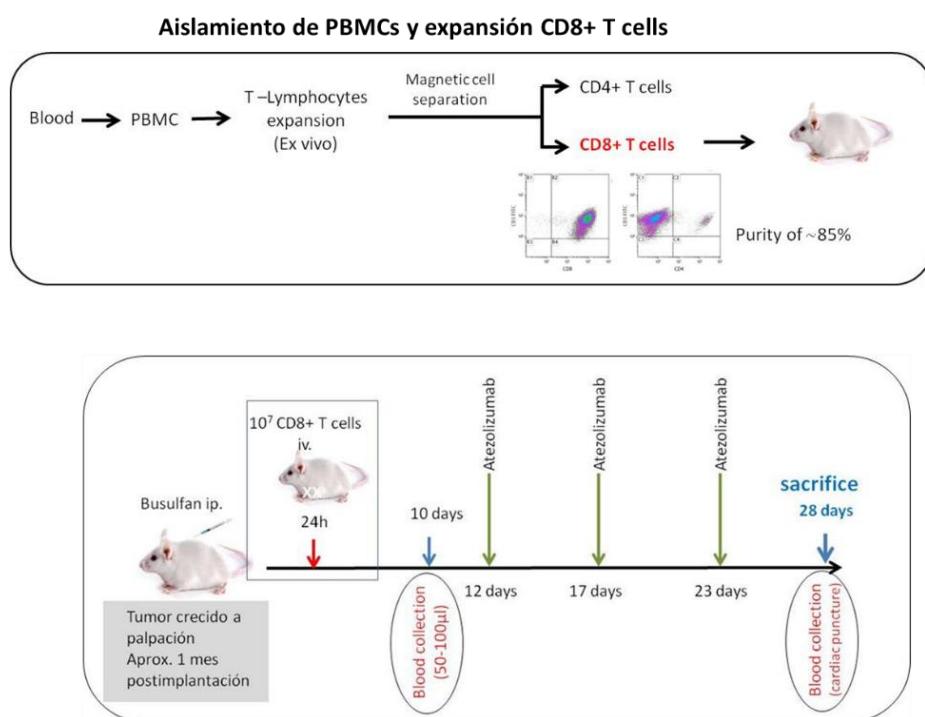


Figura 58. Esquema experimental seguido para realizar la humanización y el tratamiento de los ratones con Atezolizumab (anticuerpo anti-PD-L1). A) Proceso de obtención y expansión de los linfocitos T *in vitro*, usando medio de cultivo suplementado con IL-2 e IL-15. B) Tratamiento con Atezolizumab (5 mg/kg inyección intraperitoneal) los días 7, 14 y 21 post-humanización

RESULTADOS

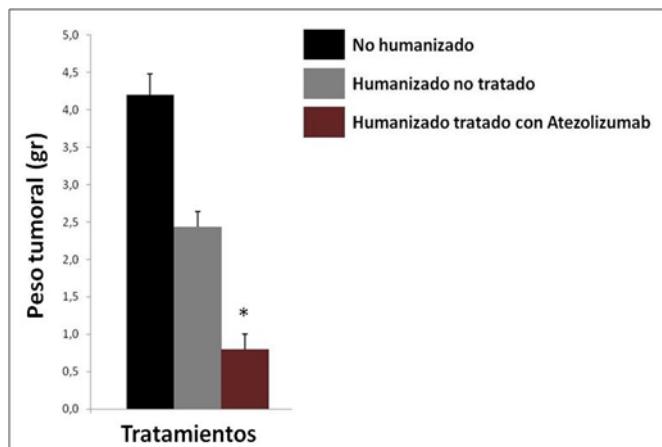


Figura 59. A) Resultados de evaluación de Atezolizumab (anticuerpo anti-PD-L1) en ratonas NSG humanizadas con linfocitos T de la propia paciente expandidos in vitro. Siete ratones fueron humanizados: i) 3 ratonas humanizadas no se trataron con anti-PD-L1, para observar el efecto antitumoral de la propia humanización; ii) 4 ratones humanizados fueron tratados con Atezolizumab (5 mg/kg inyección intraperitoneal), aunque sólo se muestra el resultado de tres ratones ya que uno murió durante el proceso experimental. * $p\text{-value} \leq 0.05$

En el estudio realizado en los modelos PDOX hemos identificado como tratamientos potencialmente efectivos de segunda línea, en caso de recaída de la paciente, el Adavosertib (inhibidor de Wee1), el Olaparib (inhibidor de PARP) y el Sorafenib (inhibidor multicitosina). Además, la presencia de mutaciones de pérdida de función en *MLH1* y la inestabilidad de microsatélites del tumor (MSI), junto con el resultado del tratamiento con Atezolizumab en los ratones humanizados con linfocitos T de la paciente, hacen que la inmunoterapia se presente como una gran alternativa en caso de recaída. Actualmente, existen en España varios ensayos clínicos disponibles tanto para inhibidores de Wee1 como de inmunoterapia con *immune checkpoint inhibitors* (ICIs) para pacientes pediátricos.

Este caso concreto muestra el potencial de esta aproximación, no sólo para identificar opciones terapéuticas en tiempo real, sino como opción potencial a la hora de identificar tratamientos para futuras recaídas.

Actualmente, la paciente está viva y sin signos de recaída local ni a distancia después de 3 años y medio de seguimiento desde la intervención quirúrgica.

4. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La medicina de precisión en oncología, tal y como la entendemos actualmente, trata de dotar a los especialistas de información básica del tumor (esencialmente, alteraciones genéticas) que les permita hacer unas mejores predicciones para prescribir un tratamiento, basándose ya no en resultados globales obtenidos con datos promedios de grupos de pacientes, sino en las características específicas del tumor de un paciente concreto. Además, en el caso de los pacientes con cáncer pediátrico, la medicina de precisión es además una pieza clave para intentar acelerar la aprobación de nuevos tratamientos. Sin embargo, para que estas estrategias sean efectivas, es cada vez más importante el poder establecer una correlación entre el genotipo de un tumor concreto y la respuesta (medida con parámetros de supervivencia) a los tratamientos específicos dirigidos a estas alteraciones. Este aspecto adquiriere en el caso de los pacientes pediátricos una complejidad mayor, ya que los tratamientos han de proporcionar un claro beneficio en el balance de la efectividad del tratamiento y la toxicidad que generan.

En los próximos años, con la llegada de la Inteligencia Artificial y del *Machine Learning*, será aún más importante el valorar cuales de las potenciales predicciones de tratamiento serán realmente efectivas en el paciente. La generación de herramientas que nos permitan evaluar de forma eficiente estas predicciones será cada vez más necesario. Los modelos preclínicos generados en esta tesis podrían contribuir significativamente a conseguir estos objetivos.

La incorporación de nuevos tratamientos al cáncer pediátrico es una urgencia internacional, tanto para ofrecer soluciones a los tumores de mal pronóstico como para reducir las graves secuelas asociadas a los actuales agentes quimioterápicos. Este déficit de nuevos tratamientos se evidencia en el hecho de que en los últimos 40 años (1980-2017) la FDA (*Food and Drug Administration*) de Estados Unidos solamente aprobó 11 nuevos tratamientos contra el cáncer del niño y el adolescente (126).

Parte de este déficit se ha debido al desconocimiento de la etiopatogenia de los tumores pediátricos. En este aspecto, la evolución de las tecnologías de secuenciación genómica y su reducción de costes, han permitido conocer las mutaciones de un tumor concreto, identificando las mutaciones “*driver*” que están detrás de su génesis. Este amplio

DISCUSIÓN

conocimiento de los tumores nos ha introducida en la era de la “*genomización*” de la medicina de precisión. Sin embargo, un tiempo después de aplicarla de forma global en la oncología, y de forma particular en la oncología pediátrica en nuestro centro, surgen algunas cuestiones: ¿Es la información genómica suficiente para prescribir un fármaco para tratar un paciente? ¿Podemos predecir si la presencia de determinadas alteraciones genómicas se traducirá en la respuesta a un fármaco específico?

Las técnicas de WES y RNAseq han permitido identificar dianas terapéuticas y expandir las opciones disponibles para los pacientes, pero estas no son siempre efectivas, del mismo modo que no todas las alteraciones genéticas se traducen en cambios relevantes en la función proteica (127). Además, muchas de estas alteraciones identificadas no son *druggable*, o si lo son, los fármacos no son suficientemente efectivos o son muy tóxicos.

En este contexto, es sumamente importante disponer de sistemas tanto *in vitro* (líneas celulares y tumoroides) como *in vivo* (modelos animales) donde poder evaluar el potencial de estas nuevas aproximaciones terapéuticas que aborden de manera integral la heterogeneidad tumoral. Estos modelos nos han de permitir establecer métodos funcionales con los que investigar los mecanismos de acción de estos fármacos. El conocimiento de estos mecanismos será fundamental para desarrollar estrategias de tratamientos combinados (por ejemplo, terapias dirigidas en combinación con quimioterapia) y para descifrar los mecanismos de resistencia que se generen con su uso.

En los últimos 15-20 años de uso de las terapias dirigidas (*targeted therapies*) en el cáncer del adulto, se ha visto que los tumores se adaptan a los nuevos tratamientos y generan mecanismos de resistencia diferentes a los previamente descritos con los tratamientos de quimioterapia. El conocer estos mecanismos ha sido fundamental para desarrollar en paralelo nuevos fármacos que pudieran minimizarlos. Este es el caso del cáncer de pulmón de adulto de células no pequeñas (NSCLC), en el cual se han desarrollado tres generaciones de fármacos para tratar a los pacientes con adenocarcinomas de pulmón con mutaciones el gen *EGFR* (Gefitinib, Afatinib y Osimertinib) (128). La oncología pediátrica va un paso por detrás en este aspecto, ya que ha tardado más tiempo en incorporar estas nuevas terapias.

DISCUSIÓN

Existen una serie de parámetros característicos de los tumores y de sus tratamientos que creemos que solo se pueden abordar en la actualidad desde una perspectiva *in vivo* como, por ejemplo, la compleja heterogeneidad de un tumor, el entorno o microambiente donde crece y los datos de farmacocinética y farmacodinámica de los tratamientos, así como la toxicidad que producen. Por este motivo, es necesario disponer de recursos suficientes para intentar generar buenos modelos preclínicos. Los modelos *in vivo* han de permitir evaluar tanto la eficacia (de un fármaco concreto en administración aislada, de combinaciones de fármacos, de esquemas o pautas de administración, de las diferentes vías de administración) como las posibles toxicidades. En este sentido hemos de tener en cuenta que en los últimos años muchos fármacos no han sido aprobados por las agencias regulatorias por los perfiles de toxicidad, un aspecto que adquiere especial importancia cuando hablamos de pacientes pediátricos.

En esta tesis hemos intentado hacer este recorrido, y a lo largo de los últimos 7 años hemos trabajado para generar buenos modelos preclínicos ortotópicos PDOX/*Orthoxenografts*, pediátricos en ratones inmunosuprimidos. Unos modelos que han sido complejos de generar, pero que nos parecen imprescindibles para completar la solidez de un programa de Medicina de Precisión como es COMIK. Algunas experiencias recientemente publicadas en pacientes adultos (44), pero también pediátricos, como la del grupo australiano de Lau et al., vienen a reafirmar esta idea (27).

Los modelos que hemos generado mediante la implantación ortotópica de fragmentos sólidos, no disgregados, han sido sometidos a una amplia caracterización morfológica e inmunohistoquímica, demostrando que mantienen las características histopatológicas de los tumores originales. En el único caso en que hemos podido realizar la caracterización genómica comparada del tumor primario vs. PDOX, también hemos demostrado esta correspondencia. Este es un hecho ampliamente demostrado por trabajos publicados por otros grupos durante el periodo de realización de la tesis doctoral. Actualmente, estamos procediendo a caracterizar a nivel genómico los PDOX generados.

DISCUSIÓN

Queremos resaltar dos hechos diferenciales importantes de esta tesis respecto a otros trabajos previos, que ponen en valor el compromiso de nuestro programa COMIK con los pacientes oncológicos pediátricos: 1) Hacer una aproximación ortotópica quirúrgica para 14 tipos tumorales diferentes, la más compleja dentro del campo de la implantación de tumores; y 2) El intento de hacer estrategias de oncología personalizada en tiempo real en tres casos, integrando los datos genómicos de los pacientes con la evaluación de fármacos para identificar alguna opción terapéutica que pudiera ayudar al paciente, aunque fuera ya en la fase final de su tratamiento. Esta estrategia supone una complejidad máxima, ya que al factor limitante tiempo, hay que añadirle la dificultad que conlleva generar el modelo preclínico, expandirlo para ensayar terapias y disponer a tiempo del estudio genómico del tumor, además de que tener en cuenta el entrenamiento del personal para poder aplicarla. En la actualidad es una estrategia al alcance de pocos centros oncológicos pediátricos.

4.1. Análisis de los modelos

Esta tesis doctoral presenta los resultados de nuestro programa de desarrollo de modelos PDX ortotópicos (PDX/orthoxenografts) procedentes de muestras de tumores pediátricos de pacientes tratados en el Hospital Vall d’Hebron. Hemos logrado establecer 46 modelos PDX que representan un total de 14 tipos tumorales, a partir de 135 muestras de 112 pacientes. Estos modelos se han generado en su mayoría a partir de muestras procedentes tanto de pacientes no tratados (*“treatment naive”*), pacientes en primera línea de tratamiento, pero también de pacientes en refractariedad, recaída o progresión. Además, incluyen muestras de tumores de alto/muy alto riesgo, así como de riesgo intermedio/bajo. El hecho de generar modelos con tumores de riesgo intermedio/bajo nos da la posibilidad de poder identificar tratamientos menos tóxicos, y quizás más efectivos, también para los pacientes que pueden curarse con los tratamientos actuales de quimioterapia, pero a costa a veces de importantes secuelas a largo plazo o de por vida.

Dichos modelos se han caracterizado mediante un estudio comparativo histológico e inmunohistoquímico pareado, entre las muestras tumorales originales de los pacientes y sus correspondientes modelos preclínicos. De igual manera nos hubiera gustado el poder

DISCUSIÓN

hacer también un estudio genómico comparativo, pero esto sólo ha sido posible en un caso, por los limitados recursos. En el caso que hemos podido caracterizar hemos demostrado la alta correspondencia que existe a nivel genómico entre el tumor primario y el PDOX generado. De hecho, esta alta correspondencia genómica ya ha sido ampliamente demostrada por otros estudios publicados con PDX de tumores pediátricos en los últimos años (129) (130).

En un 71,7% de los PDOX se dispone de, al menos, alguna caracterización genética de las muestras de las que se originaron los modelos. Los resultados obtenidos de esta caracterización molecular de los tumores primarios ponen de manifiesto lo relevantes que, desde un punto de vista genómico, pueden ser los modelos generados. Estos PDOX se están empezando a caracterizar genómicamente, lo que en los próximos meses nos permitirá disponer de los datos comparativos necesarios.

En los últimos años han surgido diferentes iniciativas (mayoritariamente consorcios internacionales tanto en Europa como en EE. UU.) para unir esfuerzos y conseguir generar modelos preclínicos pediátricos, en un intento de disponer de estas herramientas para poder avanzar en el desarrollo de nuevas terapias desde una perspectiva propia, y no ya como una prolongación de estrategias de los tumores de adultos. Estas iniciativas se han centrado mayoritariamente en la generación de modelos PDX subcutáneos en ratón, aunque cada vez más grupos optan por el desarrollo de modelos ortotópicos, la mayoría, inyectados. En nuestro caso, debemos resaltar que se ha realizado una implantación ortotópica, implantando en el mismo órgano en el ratón los tumores primarios y las metástasis de las distintas localizaciones. Esta aproximación hace más realistas los modelos generados, al crecer en el mismo entorno en que lo hacen en el niño, y por tanto en un microambiente más parecido (57).

El hecho de hacer el proceso mediante implantación de fragmento sólido de tumor, no disgregado, permite teóricamente preservar la arquitectura tumoral, replicando aún más fielmente la enfermedad (57). La implantación de tejido tumoral no disgregado además permite, mantener parte del estroma acompañante (matriz extracelular, células

DISCUSIÓN

inmunitarias). Sin embargo, la relevancia de este último aspecto es difícil de determinar, ya que de acuerdo a la mayoría de los autores, este estroma es sustituido paulatinamente por tejido murino conforme se realizan los pasos (131), aunque parece que este estroma murino puede adoptar un fenotipo similar al humano (132), por lo que tendría implicaciones para ensayar algunos tratamientos.

Una cuestión importante de la mayoría de los estudios en modelos ortotópicos, incluyendo el nuestro, es el hecho de que estos tumores han crecido en un microambiente tisular similar al del paciente, todo y siendo conscientes de las limitaciones que impone el crecer el tumor en un entorno de inmunosupresión parcial (ratones atípicos) o total (ratones NSG). La sustitución progresiva del estroma tumoral humano por estroma murino (fibroblastos, células endoteliales), en los tumores ortotópicos se produce en un microambiente análogo al que se da en el ser humano, lo que es muy importante al valorar diferentes tratamientos ya sea de quimioterapia, terapias dirigidas o inmunoterapia. En este sentido, los modelos ortotópicos, una vez humanizados, pueden ser importantes herramientas para evaluar, por ejemplo, posibles combinaciones de fármacos con inmunoterapia. Por ejemplo, estudios recientes demuestran la importancia del microambiente tumoral y el entorno inmunitario a la hora de determinar el éxito de una nueva molécula terapéutica; esta puede ser una de las causas de que, con frecuencia, nuevos tratamientos que parecen efectivos *in vitro* o incluso en modelos PDX subcutáneos, fallen al ser administrados en los ensayos clínicos. Se ha demostrado que este microambiente induce cambios genotípicos y fenotípicos en las lesiones metastásicas, siendo estas diferentes del tumor original y entre sí (54). El equipo de Kalra et al. generó modelos de xenoinjertos metastásicos a partir de una línea celular de cáncer de mama bien caracterizada (JIMT-mKate), y demostró diferencias en la expresión de marcadores tumorales (Her2/Neu) y marcadores de microambiente tumoral (en este caso, la estructura y densidad vascular (CD31)), el cual influye directamente en el aporte vascular tumoral, la hipoxia y en la distribución de los fármacos (54). De ahí la relevancia e interés por generar no solo modelos de tumor primario, sino de sus metástasis, ya que es posible que los tratamientos que sean efectivos para el primero no lo sean para las segundas y, además,

DISCUSIÓN

dichos modelos permitirían explorar nuevas moléculas y nanopartículas que faciliten la distribución de los fármacos. De hecho, la mayoría de los pacientes incluidos en ensayos clínicos en fases precoces son pacientes metastásicos, que han recibido tratamientos intensivos, por lo que es esperable que dichas metástasis presenten cambios en relación con la generación de resistencias y en relación con el microambiente de su órgano de asentamiento. En nuestra serie, hemos logrado generar 17 modelos procedentes de metástasis (1 de MRT, 2 de rabdomiosarcoma, 4 de osteosarcoma, 1 de sarcoma de Ewing, 1 de sarcoma óseo NOS, 2 de tumor de Wilms, 2 de hepatoblastoma, 1 de hepatocarcinoma y 2 de neuroblastoma) (Anexo IV). Estos modelos poseen un gran valor, ya que la mayoría de la experiencia internacional en PDX pediátricos se limita a tumores primarios (ortotópicos o heterotópicos) y/o metastásicos subcutáneos. Los nuevos modelos PDX ayudarán a comprender mejor la heterogeneidad intratumoral, inter-tumoral e inter-metastásica.

Nuestro trabajo, a diferencia de las publicaciones correspondientes a los consorcios, representa la experiencia de un solo centro de referencia para el tratamiento de los tumores pediátricos, por lo que es un proceso más homogéneo al realizarse la implantación de una forma más sistemática, lo cual reduce la variabilidad experimental, tanto durante la implantación como durante la realización de futuros experimentos. Esto es importante, ya que permite la especialización en los diferentes procesos y un mayor control de las variables. De forma análoga a lo que ocurre con la cirugía o la oncología del paciente pediátrico, sería importante establecer centros especializados en la implantación de modelos PDOX para conseguir mejores resultados en la generación y en la utilización de los modelos (133).

Dentro de la literatura existente, solo algunos grupos de investigación han logrado generar modelos PDX ortotópicos procedentes de tumores sólidos de pacientes pediátricos. Pocos de estos grupos han aportado detalles respecto a los métodos de implantación o las tasas de éxito de implantación tumoral. A continuación, compararemos nuestra experiencia con algunas de las series más relevantes publicadas en la literatura, las cuales se resumen en la Tabla 15 (134) (135) (136) (59) (137) (130), así como con algunos artículos referidos también

DISCUSIÓN

a tumores del adulto. Un hecho importante diferencial de nuestro trabajo respecto a otros previos es que, en nuestro caso, no hemos implantado tumores hematológicos, limitándonos a los tumores sólidos, mientras que muchas de las series pediátricas contienen un elevado número de leucemias y linfomas.

Probablemente, la serie publicada a la que mejor se equipare nuestro trabajo, al establecer modelos ortotópicos procedentes de diferentes tumores sólidos pediátricos en un solo centro hospitalario, es la del Hospital St. Jude en Memphis, EE. UU. (Stewart et al.). En su caso, generaron 67 PDOX inyectados ortotópicamente a partir de 148 muestras, representando 12 tipos tumorales (59). Existen otras series más extensas, por ejemplo, la del consorcio multicéntrico del *Pediatric Preclinical Testing Consortium* o PPTP en EEUU (denominado desde el año 2021 "PIVOT", *Pediatric Preclinical In Vivo Testing Consortium* <https://preclinicalpivot.org/>), que publicó su primera aproximación en 2007 (134) en el año 2019 publicó su serie de 261 modelos PDX de 37 tipos tumorales pediátricos, con una caracterización genética exhaustiva (129). El grupo además demostró que los modelos representaban fielmente la histología tumoral original. El análisis de los modelos ha permitido avanzar en el conocimiento de la enfermedad en recaída y clasificar los tumores según su inactivación de las vías TP53 o NF1. El programa, en la actualidad, ha desarrollado ya más de 370 modelos PDX de tumores de alto riesgo. Sin embargo, este extenso trabajo ofrece pocos datos relativos al tipo de modelos (ortotópico o subcutáneo), la tasa de éxito de implantación o los factores que pueden influir sobre esta, entre otros.

Otras grandes iniciativas son las del ITCC-P4, que ha generado más de 700 modelos PDX de cánceres pediátricos, la *Childhood Solid Network*, que ha desarrollado y caracterizado muchos modelos o la del Greehey Children's Cancer Research Institute (GCCRI), que ha establecido más de 140 modelos, la mitad de ellos tumores sólidos y la otra mitad leucemias (138).

SERIE	AUTOR	AÑO PUBLICACIÓN	TIPO PDX	Nº MODELOS ESTABLECIDOS	TASA DE ENGRAFTMENT ^(@)	TIEMPO CRECIMIENTO	MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN
PPTP	Houghton	2007	Subcutáneos	51	-	-	IHQ, cADN Microarray, Cribado de drogas
Lund Hospital	Braekveldt	2014	Ortotópicos inyectados e implantados	3 (sólo neuroblastomas)	50%	60 – 300 días	Histología, IHQ, expresión genómica, Número de copias
ITCC	Nicolle	2016	Subcutáneos implantados	24 (sólo tumores hepáticos)	47%	32-150 días	Histología, IHQ, detección de AFP, arrays citogenéticos, PCR CTNNB1 y NFE2L2, perfil mutacional, Cribado de drogas
St Jude Hospital	Stewart	2017	Ortotópicos inyectados	67	45%	30-353 días	Histología, IHQ, MET, WGS, WES, SNV, Análisis clonal, RNA-seq, Epigenoma, Cribado de drogas
COG	Brabetz	2018	Ortotópicos inyectados	30 (sólo cerebrales)	30%		Histología, IHQ, expresión genómica, Metilación ADN, Número de copias, perfil mutacional, Cribado de drogas
Indiana University	Pandya	2023	Subcutáneos implantados	8 (sólo sarcomas y tumores de Wilms)	51,4% osteosarcoma 53,8% RMS 80% Wilms	-	WGS, RNA-seq, SNV, Número de copias, Western blot, RPPA analysis
MAPPYACTS	Geoerger	En vías de publicación	Mayoría subcutáneos implantados e inyectados (SNC)	113 (sólo tumores en recaída o refractarios)	49%	12-285 días (mediana 41)	Histología, IHQ, WES, RNaseq, Tipaje HLA-1, Estudio del microambiente tumoral
Hospital Vall d'Hebron	Villanueva / Soriano / Guillén	Tesis doctoral	Ortotópicos implantados	46	34%	40-320 días (mediana 40)	Histología, IHQ, WES*, Cribado de drogas*

Tabla 15. Principales publicaciones con series de tumores PDX pediátricos e información relativa a su proceso de establecimiento. Datos referidos a tumores sólidos. Tasa de engraftment: En algunas series (@) se incluyen neoplasias hematológicas, sin detallar tiempo de crecimiento separadamente. SNC: Sistema nervioso central. IHQ: Inmunohistoquímica, MET: Microscopio electrónico de transmisión, WGS: Whole genome sequencing, WES: Whole exome sequencing, SNV: Single nucleotide variants, RNA-seq: secuenciación de RNA, AFP: alfa-fetoproteína, PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. RPPA: Protein Pathway Activation Mapping via Reverse Phase Protein Array Analysis, * Sólo en algunos modelos

En la literatura, está ampliamente reconocido que es muy difícil lograr generar modelos PDX a partir de determinadas muestras de paciente o de determinados tumores (139). Este parece ser el caso de los tumores pediátricos; mientras en adultos, las tasas generales de éxito en el primer implante se describen en torno al 75% para muchos tipos tumorales (56), las series pediátricas describen porcentajes de éxito mucho más bajos (St. Jude 45% (59), MAPPYACTS 49% - resultados no publicados -), en línea con los resultados de nuestra serie (34%). El hecho de que nuestras cifras sean discretamente más bajas que las de los grandes consorcios, lo atribuimos a causas multifactoriales. Por un lado, nuestra serie incluye un 68,9% de muestras obtenidas al diagnóstico o en primera línea de tratamiento (MAPPYACTS, por ejemplo, solo incluye pacientes en recaída o progresión), además un 30,3% de muestras proceden de pacientes en situación de riesgo bajo o intermedio, e incluye un elevado porcentaje de muestras de neuroblastoma (24,4%), que es un tumor con malas tasas de *engraftment* en PDOX (por ejemplo, en la serie de St. Jude, tuvo la tasa más baja de la serie, solo del 24%) (59); todos estos factores han demostrado estar negativamente asociados al éxito en el establecimiento de los modelos en diversos análisis, que discutiremos a continuación. Por otro lado, la limitación de recursos humanos y materiales quizás también pueda haber afectado a los resultados (por ejemplo, por muertes no planificadas de algunos de los posibles modelos).

Como se observa en la Tabla 15, el tiempo de crecimiento del primer implante de nuestros modelos ha sido equiparable al de las otras series. En todas ellas existe un amplio rango de duración, que en algunos modelos puede llegar a casi un año.

4.2. Factores asociados al éxito de implantación

Pese a que los PDX pediátricos presentan más dificultades para su establecimiento que los tumores del adulto y pese a que existen varias series en la literatura que describen el establecimiento de bancos de PDX pediátricos (principalmente enfocadas en su caracterización genómica y en los experimentos farmacológicos realizados en ellos), pocas de esas publicaciones analizan los posibles factores que pueden influir en el éxito de la

DISCUSIÓN

generación de un modelo PDX pediátrico. Nuestro trabajo ofrece una primera aproximación a las posibles razones.

Aunque no hemos realizado un análisis estadístico por tipo de tumor, por el limitado número de muestras en cada uno de los grupos de tumores, sí que debemos mencionar que el tipo tumoral parece predeterminar un mayor o menor éxito en la generación de los modelos. Por ejemplo, ninguno de los carcinomas del adulto implantados (carcinoma adrenal, carcinoma tímico, carcinoma papilar renal y carcinomas papilares de tiroides) resultó en un modelo PDOX; curiosamente, estos resultados se observan también en la serie de St. Jude (59). Tampoco generamos ningún modelo de tumor neuroendocrino, pese a implantar un tumor carcinoide bronquial atípico y un paraganglioma maligno. Algunos trabajos en adultos han logrado identificar genes presentes en los tumores primarios que se relacionan con una mayor tasa de éxito en el implante (140), que podrían estar detrás de estos resultados.

Entre los factores que no se correlacionaron con el éxito de la implantación, identificamos: la categoría de riesgo del paciente en el diagnóstico, la edad del paciente (agrupada en 3 categorías; menores de 3 años, niños y adolescentes, y pacientes mayores de 16 años/AYA), la implantación de tumores tratados o no tratados, la cepa de ratón utilizada (atímico *nude* frente a NSG), el tamaño de la muestra implantada (biopsia Tru-Cut® frente a biopsia quirúrgica), y el tiempo hasta la implantación de la biopsia (en el mismo día o al día siguiente). El porcentaje de necrosis tumoral en la muestra de origen sorprendentemente no pareció influir en el éxito de implantación. Sin embargo, hemos de decir que, en el análisis, no se hizo una distinción entre la necrosis post-tratamiento, y la necrosis propia del tumor. El grupo de St. Jude sugiere que los cambios post-tratamiento pueden ser el motivo de las bajas tasas de *engraftment* de algunos tumores (por ejemplo, los neuroblastomas). Probablemente sean necesarias series más extensas para poder confirmar este supuesto.

Aunque al analizar globalmente el éxito del *engraftment*, el hecho de que los tumores estuvieran previamente tratados (59,3%) o no tratados (40,7%) pareció no influir en el

DISCUSIÓN

resultado, en algunas series en pacientes adultos esta cuestión sí que ha resultado significativa (141). Esto podría haber alterado las tasas de *engraftment* de algunos tipos tumorales incluidos en nuestra serie, que incluyen porcentajes de tumores tratados muy superiores al resto de los grupos (muestras postratamiento: Wilms 84,2%, Hepatoblastoma 90% y hepatocarcinoma 100%) y justificar las diferentes tasas de éxito al compararlas con otras series publicadas, que discutiremos en el análisis por tipo tumoral.

Sí que se asociaron de manera positiva con el éxito en la generación de los PDOX ($p<0,05$) la categorización del paciente como de alto riesgo en el momento de obtener la biopsia, la implantación procedente de muestras en la recaída/progresión o refractariedad frente a las muestras al diagnóstico o en primera línea de tratamiento y la implantación muestras procedentes de metástasis frente a las del tumor primario. Debemos destacar que la implantación ortotópica se asoció a un mayor éxito que la subcutánea. Las muestras que lograron generar un modelo PDOX presentaban una mediana del índice proliferativo Ki67 más elevado que las que no lo lograron (diferencia estadísticamente significativa), lo que también se ha visto en series de pacientes adultos (142) (141).

La serie de St. Jude coincidió en identificar la implantación de muestras procedentes de la recurrencia frente al diagnóstico como un factor asociado al éxito del implante, y tampoco halló diferencias estadísticas en el éxito entre las muestras previamente tratadas frente a las no tratadas, de manera concordante con nuestros hallazgos. Sin embargo, a diferencia de nuestro análisis, no hallaron diferencias entre las muestras originadas en el tumor primario o en las metástasis. Nuestra conclusión, sin embargo, es más concordante con la literatura procedente del cáncer del adulto (139), en la que las metástasis parecen tener más facilidad para generar modelos PDX.

La ausencia de diferencias en el éxito de implantación en función de las cepas de ratón utilizadas merece una discusión aparte, por sus implicaciones prácticas. Como breve resumen, las siguientes cepas de ratones son de particular relevancia para el desarrollo de los modelos de xenoinjerto tumoral en ratones:

DISCUSIÓN

- El gen *Foxn1* codifica un factor de transcripción imprescindible para el desarrollo del timo (donde se diferencian y maduras las células T CD4+ y CD8+) y de los folículos capilares. Los ratones desnudos son homocigotos para el gen *Foxn1^{nu}*, también llamado gen "nude", lo que ocasiona que los animales sean inmunodeficientes y carentes de pelo. Son buenos modelos para implantar líneas celulares tumorales de rápido crecimiento, y su ausencia de pelo facilita la palpación y la visualización mediante fluorescencia de los tumores. Por el contrario, al mantener su inmunidad B y NK intacta sería, en principio, modelos poco aptos para generar y expandir neoplasias hematológicas y para tumores de crecimiento lento.
- El gen *Prkdc* (*protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide*) codifica la subunidad catalítica de la proteína cinasa ADN-dependiente necesaria para la reparación del ADN y para reparar las roturas que se producen en la doble cadena del ADN durante la recombinación somática del receptor de células T (TCR) y los genes de las inmunoglobulinas (Ig). Los ratones "scid" son homocigotos para la mutación *Prkdc^{scid}*, lo cual resulta en animales con una apariencia externa normal pero deficientes tanto en células T como B (inmunodeficiencia combinada severa). El papel de *Prkdc* en la reparación del DNA hace que estos no sean modelos adecuados para recibir radioterapia.
A la hora de generar xenoinjertos, se suelen emplean animales NOD (*non-obese diabetic*), que presentan una deficiente función de las células NK (*natural killer*), a los cuales se les ha transferido la mutación *scid* (NOD *scid*), que confiere a estos modelos una mayor tasa de éxito de injerto. Por contra, los NOD *scid* sufren de una elevada incidencia de linfomas tímicos, lo que limita su esperanza de vida a unas 30 semanas. Esto se ha de tener en consideración cuando se trabaja con tumores de baja tasa de crecimiento. Los ratones *scid* tiene la posibilidad ser humanizados (*scid-hu*) al reconstituir su sistema inmunitario con células humanas CD4, CD8 e inmunoglobulinas IgG.
- Las proteínas funcionales Rag1 y Rag2 son también necesarias para recombinación somática del TCR y los genes de las Ig, y la ausencia de cualquiera de los dos resulta

DISCUSIÓN

en una inmunodeficiencia T y B, lo cual sucede en los ratones portadores de las mutaciones *Rag1^{tm1Mom}* y *Rag2^{tm1Cgn}*.

Tanto los modelos *scid* (cuyo uso está ampliamente extendido) como los deficientes en *Rag* se describen como mejores alternativas para generar PDX que los *nude*.

- Al incorporar nuevas mutaciones a los animales *Prkdc^{scid}* o a los deficientes en *Rag*, se obtienen modelos aún más avanzados de animal inmunodeprimido, tales como la cepa NSG (*NOD scid gamma*), o la cepa NRG (*NOD-Rag2-IL2rg^{Tm1/Rj}*). Son modelos con inmunodeficiencia T, B y NK, que además presentan una deficiencia en el sistema del complemento, en la función macrofágica y en la dendrítica. Actualmente son considerados los modelos idóneos para generar xenoinjertos tumorales.
- Existen además modelos humanizados, con un sistema inmune reconstituido a partir de células humanas (células mononucleares periféricas), aunque presentan como contrapartida frecuentes reacciones de injerto contra huésped. Algunos laboratorios han desarrollado modelos avanzados que evitan esta complicación, pero están más allá del objetivo de esta tesis.

Nuestro equipo optó por emplear mayoritariamente ratones *nude*, fundamentándose en dos motivos principales. Por un lado, su coste, muy inferior en comparación con los NSG. Por otro lado, la experiencia personal del principal experto del grupo en el desarrollo de modelos PDX (Dr. Alberto Villanueva), adquirida a lo largo de los 10 últimos años con tumores del adulto, sin haber identificado una mejor tasa de implantación en modelos NSG (incluso, observando peores resultados en algunos tipos tumorales). Esta hipótesis se confirmó en el análisis estadístico, no hallando diferencias entre el uso de un modelo u otro. Además, en la experiencia del Dr. Villanueva, los modelos NSG parecen representar más fielmente la diseminación tumoral, pero por su inmunodeficiencia, desarrollaron con mayor frecuencia linfomas mediastínicos y esplénicos y resultaron más proclives al desarrollo de infecciones (como, por ejemplo, por *C. bovis*) al criarse de manera interna en los estabularios.

DISCUSIÓN

Habitualmente, en la literatura internacional, un modelo se considera establecido una vez que se han desarrollado de 3 a 4 pasos. Sin embargo, esto no ha sido posible en nuestra experiencia, por las ya citadas restricciones presupuestarias y estructurales. No obstante, de nuevo la experiencia del Dr. Villanueva en más de 700 modelos de cáncer del adulto es que, una vez establecido el primer implante, este se perpetúa en más del 95% de los casos.

4.3 Caracterización histológica

El diagnóstico histológico de muchos de los tumores pediátricos es difícil. En particular, muchos de ellos se engloban en la categoría de "tumores de célula redonda pequeña y azul", correspondiendo a tumores muy agresivos, indiferenciados y de morfología similar (células con escaso citoplasma y núcleo redondo e hiperchromático). En estos tumores, los estudios inmunohistoquímicos son esenciales para identificar los tipos tumorales más frecuentes (143). Aunque la genómica es esencial para diferenciar algunos subtipos tumorales (como, por ejemplo, los NRSTS), el examen de la morfología y la inmunohistoquímica por parte de expertos en anatomía patológica pediátrica suele ser suficiente en la mayoría de las ocasiones para obtener una primera aproximación diagnóstica fiable.

En nuestro trabajo hemos considerado clave el realizar una caracterización histopatológica comparativa del tumor primario frente al generado en el PDOX para validar los modelos para futuros estudios. Esta caracterización debe ser realizada por los mismos especialistas que realizan el diagnóstico de los tumores en pacientes pediátricos. Así, el papel de las Patólogas Pediátricas del Hospital Vall d'Hebron ha sido fundamental en el desarrollo de este proyecto.

La caracterización histopatológica, además, nos aporta información muy valiosa de la heterogeneidad tumoral observada, del estroma de soporte del tumor y de su grado de diferenciación. En los estudios comparativos ha sido difícil y poco valorable el estudio del patrón de crecimiento del tumor en el ratón (expansivo/infiltrativo), ya que en muchas ocasiones la recogida de la muestra no se ha realizado teniendo en cuenta la necesidad

DISCUSIÓN

de incorporar parte del tejido sano que rodea al tumor. El motivo es que, cuando se sacrifica el animal y se extrae el tumor, la muestra obtenida del PDOX se prioriza en este orden: tejido para perpetuar el tumor (implantar en otro animal), tejido para criopreservar (generar banco de tumores vivos para poder volver a implantarlos en un futuro), fragmento fijado en formol para estudios confirmativos histopatológicos, y fragmento congelado para estudios moleculares.

Además, nuestro trabajo también presenta la limitación de que el número de estudios de IHQ realizados por cada muestra ha sido bastante limitado, y centrado básicamente en los marcadores que las patólogas han considerado más representativos en cada caso. Esta aproximación se ha demostrado limitada, especialmente para abordar los posibles cambios de patrón de crecimiento. Para ello, serían deseables estudios de IHQ más amplios, para valorar correctamente la desdiferenciación tumoral o la selección de los componentes más inmaduros del tumor que a veces suceden en el PDOX.

A pesar de reconocer estas limitaciones, la caracterización básica que hemos realizado pone de manifiesto el enorme potencial para estudios futuros de los modelos generados. La concordancia ha sido muy elevada (solo uno de los 44 modelos con estudio histológico resultó discordante). No obstante, del mismo modo que lo observado en la serie del Hospital St. Jude (59), hemos apreciado algunos cambios histológicos en los modelos (menos necrosis, más proliferación celular y pérdida de los componentes más diferenciados en algunas ocasiones). Pensamos que el origen puede ser multifactorial, desde la propia muestra implantada, que puede ser representativa de sólo una parte del tumor, hasta la selección celular de los subclones más agresivos o proliferativos, y obviamente, el hecho de que los tumores de los ratones no están recibiendo tratamiento.

La relevancia de estos cambios en la capacidad de trasladar los hallazgos del PDOX al paciente es difícil de predecir. Por un lado, el estudio genómico exhaustivo de los modelos nos permitiría confirmar que estos retienen las características del tumor original, a pesar de los cambios morfológicos, que es lo que describen la mayoría de los autores. Por otro lado, pensamos que, si existe una selección celular en favor de los clones más agresivos o

DISCUSIÓN

indiferenciados, probablemente estos van a ser los causantes de que la enfermedad sea resistente al tratamiento o recaiga, por lo que seguirían siendo muy representativos.

Los resultados que hemos obtenido desde un punto de vista histopatológico están en concordancia con otros estudios publicados donde se demuestran hechos muy similares a los observados en este trabajo, y que claramente confirman y validan la homogeneidad tumor primario/PDOX. En este sentido, los estudios realizados en amplias series de PDX de tumores de adulto (144) confirman la correspondencia, del mismo modo que lo hacen estudios más recientes con tumores pediátricos (145). El grupo de Rokita demostró, mediante el análisis genómico multiplataforma de 261 modelos de PDX pediátricos, que dichos modelos reflejan correctamente los tumores de alto riesgo y quimio resistentes, lo que confirma su papel fundamental a la hora de priorizar el desarrollo de nuevos tratamientos (129). Más recientemente, otros autores han demostrado que, aunque existan algunas divergencias entre el tumor original y el PDX, en la gran mayoría de las ocasiones estas no tuvieron relevancia funcional y además, la vía oncogénica de activación original se mantuvo a lo largo de los sucesivos pasos (130).

En este punto nos gustaría resaltar que en muchas de estas publicaciones (en su mayoría de consorcios multicéntricos) se prioriza la correspondencia genómica entre primario/PDOX sobre la histológica. Los estudios histológicos de concordancia hubieran sido relevantes por dos motivos esenciales. Primero, porque los modelos se han generado en centros diferentes, con toda la variabilidad del proceso que esto implica. Segundo, porque muchos de los modelos se han hecho mediante implantación en tejido subcutáneo, con las implicaciones que hemos descrito (microambiente, etc.). Y tercero, porque los modelos a menudo se han establecido en cepas NSG de cría interna en los animalarios, lo que hace que la homogeneidad de las cepas, como mínimo, sea cuestionable.

DISCUSIÓN

4.4 Correlación con la evolución clínica

El establecimiento de los modelos PDX se relacionó de forma estadísticamente significativa con la posibilidad de sufrir un evento (recaída/progresión/exitus), tanto en el análisis conjunto como separado, y las curvas de supervivencia de los pacientes mostraron grandes diferencias, con una mediana de supervivencia 61,55 meses en el grupo de los no crecidos (IC 95%, 54,8-68,3) frente a los 36 meses (IC 95%, 25,86-46,2) del grupo que sí desarrolló un PDOX. La capacidad de los modelos PDX para predecir una posible recaída tumoral, con la ventaja de disponer de un “xenopaciente” en el cual anticipar los posibles tratamientos, ha sido planteada ya en tumores del adulto, como por ejemplo en el cáncer de pulmón NSCLC (146), y en algunos artículos referidos a pacientes pediátricos con tumores hepáticos (136) y sarcomas (este último, con números muy limitados) (147) se ha llegado a una conclusión similar.

En el análisis, tratamos de dilucidar si el crecimiento de los modelos en pacientes considerados inicialmente como de riesgo intermedio podría ayudarnos a identificar aquellos casos que en realidad podrían corresponder a un alto o muy alto riesgo, pero no hallamos significancia. Esto quizás pueda atribuirse al limitado número de pacientes.

Uno de los hallazgos más significativos, contra la opinión habitual de que las opciones de medicina personalizada en tiempo real son poco realistas en los pacientes pediátricos, es que estimamos que en 30 de los modelos (65,2%) hubiese sido factible, de haber dispuesto de los recursos, realizar alguna estrategia de medicina personalizada con opción de trasladarse al paciente. Pese a que los cálculos se han realizado de una manera aproximativa, pensamos que es un hecho que este abordaje en tiempo real podría beneficiar a muchos más pacientes de los que lo está haciendo actualmente, y que será capaz de identificar más opciones de tratamiento, que se sumarían a los identificados mediante las técnicas de secuenciación.

DISCUSIÓN

4.5. Análisis de los modelos por tipo tumoral

Los modelos generados en esta tesis son herramientas preclínicas de primer nivel, muy valiosas para realizar estudios de investigación básica y traslacional. A lo largo de esta tesis hemos tenido la oportunidad de demostrar su utilidad, como queda reflejado en las publicaciones adjuntas (Anexo II). Los modelos dentro de cada subgrupo tumoral tienen el potencial de poder profundizar en la relevancia de las diferentes alteraciones genéticas identificadas e identificar potenciales nuevas estrategias terapéuticas. Por último, en unos pocos casos, hemos tenido la oportunidad de establecer una prueba de concepto para identificar en tiempo real posibles tratamientos para un paciente.

Aunque cada vez hay más modelos pediátricos bien caracterizados, el número de tumores raros está pobemente representado, y hemos de destacar que nuestra serie incluye varios tumores extremadamente infrecuentes.

A continuación, discutiremos las posibles vías de investigación que nos ofrecen los distintos modelos, en función de los hallazgos genómicos de los tumores originales (Anexo IV). El orden de discusión de los grupos tumorales corresponde al número de modelos generados.

SARCOMAS:

- Los rabdomiosarcomas son los sarcomas de partes blandas más frecuentes en la infancia (aproximadamente un 50% de los casos). En niños, hay dos subtipos principales: el RMS embrionario o ERMS (aproximadamente un 70% de los RMS) y el alveolar o ARMS (un 30%, y caracterizado por la presencia de las fusiones en el gen *FOXO1*). La presencia de la fusión sitúa actualmente a los pacientes en los grupos de alto y muy alto riesgo, igual que la enfermedad metastásica, entre otros factores (148). El pronóstico de los pacientes de alto y muy alto riesgo (14% a los 5 años) (149), así como de los pacientes en recaída, continúa siendo muy pobre pese al tratamiento multimodal.

Nuestra tasa de *engraftment* ha sido del 50%, equiparable a la de la mayoría de las series (59) (130) (150). Comentaremos primero las opciones que nos ofrecen los dos modelos de

DISCUSIÓN

rabdomiosarcoma alveolar con fusión *PAX3-PAX7/FOXO1*, en base a sus hallazgos moleculares. El modelo VH-PDOX-RMS2 podría ser interesante para explorar el papel de las amplificaciones de *GLI1* en los rabdomiosarcomas, en los que la vía Hedgehog está siendo estudiada, y para el desarrollo farmacológico de inhibidores de *GLI1* que se encuentran todavía en estadios muy precoces de desarrollo (151). Paradójicamente, a pesar de que *CDK4* suele hallarse amplificado en los rabdomiosarcomas alveolares, estudios *in vitro* e *in vivo* parecen indicar que los inhibidores de *CDK4* son más efectivos en los rabdomiosarcomas fusión negativa (152). El modelo VH-PDOX-RMS5 sería ideal para estudiar la eficacia de inhibidores directos de *VEGFR2*, inhibidores del ligando *VEGF-A* o inhibidores indirectos de *MEK*. Ambos modelos podrían ser muy valiosos para explorar las nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la translocación *PAX3-FOXO1* o *PAX7-FOXO1* que incorporan mutaciones concomitantes y recurrentes en el subtipo alveolar (153).

En cuanto a los tres modelos de rabdomiosarcoma embrionario, VH-PDOX-RMS1, VH-PDOX-RMS3 y VH-PDOX-RMS4, podrían suponer una gran oportunidad para comparar la eficacia de inhibidores específicos de *FGFR4* frente a inhibidores que van dirigidos a varios receptores tirosina quinasa a la vez, o inhibidores indirectos de *PTEN* (*PI3K/AKT/mTOR*), o para el desarrollo de nuevos fármacos (153).

- Los tumores malignos rhabdoides-teratoides extracraneales, como ya hemos descrito con anterioridad, constituyen uno de los subtipos tumorales más letales. La tasa de *engraftment* ha sido la más alta de la serie (100%). En la literatura, hemos encontrado muy pocos ejemplos de PDOX pediátricos, la mayoría dentro de los grandes consorcios ya citados (59) (136). Los cinco modelos generados son modelos muy relevantes, tanto para el estudio de los mecanismos epigenéticos provocados por la pérdida de función de *SMARCB1*, como para el estudio de nuevas estrategias terapéuticas (154). Destacaremos que los modelos son representativos tanto de la enfermedad no tratada (VH-PDOX-MRT1, VH-PDOX-MRT2, VH-PDOX-MRT4), como de la enfermedad tratada en primera línea (VH-PDOX-MRT3), como de la recaída metastásica (VH-PDOX-MRT5). Las escasas opciones terapéuticas curativas de los tumores rhabdoides malignos, hoy en día, son extremadamente

DISCUSIÓN

limitadas y asociadas a una gran carga de toxicidad a corto y largo plazo; en el caso de los tumores metastásicos, estas opciones curativas son prácticamente nulas.

Cabe señalar que los genes reguladores epigenéticos son el grupo de genes más frecuentemente alterados en los tumores pediátricos (8), por lo que actualmente existe un gran interés en el campo de la oncología pediátrica por descubrir nuevas estrategias terapéuticas de letalidad sintética, como son, por ejemplo, las basadas en atacar la vulnerabilidad de los cánceres deficientes en el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF (155). Así, los modelos PDOX de tumores rhabdoides malignos generados en la tesis podrían ser muy útiles en el ensayo de estos nuevos tratamientos.

- El tumor desmoplásico de célula redonda pequeña (DSRCT) es un sarcoma de partes blandas de enorme agresividad, considerado un tumor ultra raro. Se caracteriza por la translocación cromosómica recurrente t(11;22) (p13; q12), que conduce al gen de fusión EWSR1::WT1 y a la proteína químérica patognomónica EWSR1-WT1, un activador transcripcional aberrante que se cree que es el impulsor clave del proceso oncogénico (156). Su localización mayoritaria es intraabdominal, y la mayoría de los pacientes presenta implantes peritoneales al diagnóstico, así como metástasis a distancia (hepáticas, óseas). A pesar de los tratamientos combinados multimodales, incluyendo la quimioterapia hipertérmica intraperitoneal, la mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) se mantiene entre 4-21 meses y la de supervivencia global (SG), en 17-60 meses (157).

Su condición de tumores ultra raros limita tanto los recursos disponibles para su investigación como la posibilidad de desarrollar ensayos clínicos, lo que hace que los modelos preclínicos en animal sean de máximo interés. Como pasa con otros sarcomas, como los rhabdomiosarcomas alveolares (PAX3/7-FOXO1), los sarcomas de Ewing (EWS-FLI1/ERG) o los tumores rhabdoides malignos (deleciones y mutaciones en SMARCB1), la translocación *driver* que los define es la alteración molecular clave en su desarrollo.

Nuestra tasa de *engraftment* ha sido del 33%, similar a las pocas experiencias detalladas en la literatura (158) (59).

El modelo VH-PDOX-DSRCT1 puede ayudarnos a entender las características moleculares de los DSRCT y a explorar nuevas oportunidades de tratamiento para este tipo de cáncer

DISCUSIÓN

tan extremadamente raro y agresivo (159). En la actualidad existen pocos modelos preclínicos en ratón de DSRCT, y en su mayoría se originan de líneas celulares establecidas (160) y/o son subcutáneos y (161), lo que podría influir negativamente en su capacidad de recapitular la biología y farmacocinética de los tumores humanos, impidiendo así poder identificar nuevas estrategias terapéuticas efectivas.

- Los sarcomas indiferenciados de partes blandas son tumores poco frecuentes en pediatría, y se definen como un tumor mesenquimal que no puede incluirse en ninguna de las categorías existentes (diagnóstico de exclusión histológico y molecular) (162). Asocian, en general, un mal pronóstico. A falta de protocolos específicos, los protocolos del grupo europeo EpSSG sugieren que se traten conforme a los regímenes terapéuticos del rabdomiosarcoma.

El modelo PDOX de sarcoma indiferenciado VH-PDOX-NRSTS1 podría ser relevante en los ensayos preclínicos para el desarrollo de nuevos fármacos. Por ejemplo, se podría estudiar si la delección en homocigosis de *CDKN2A/B* es un buen biomarcador de respuesta para el tratamiento con inhibidores *CDK4/6* o para estudiar la eficacia de nuevos inhibidores de *PIK3/AKT/mTOR* (116). La importancia principal de estos modelos es que abren la puerta al estudio de nuevas combinaciones de fármacos que puedan dirigirse a más de una diana a la vez (combinación de fármacos dirigidos o fármacos dirigidos junto a quimioterapia) en lugar del planteamiento habitual de administrar fármacos dirigidos en monoterapia.

- Los tumores malignos de la vaina neural (MPNST), aun siendo tumores raros, son relativamente frecuentes entre los NRSTS pediátricos. Son tumores más propios del paciente adulto, y solo un 10-20% se diagnostican en menores de 20 años. En un porcentaje variable de los casos (20-70%, según las series) se diagnostican en el contexto de una neurofibromatosis tipo 1, y estos casos presentan una respuesta muy pobre al tratamiento (163). Se trata de tumores en los que no suelen identificarse dianas terapéuticas accionables, por lo que el desarrollo de modelos preclínicos es aún más necesario (163). Al ser el único modelo discordante de la serie, no planteamos su uso en estudios preclínicos sin una validación genómica del mismo.

DISCUSIÓN

- El osteosarcoma es el sarcoma óseo más frecuente en niños y adolescentes. La supervivencia con tratamiento multimodal está estancada en el 65-70% a 5 años desde los años 80, alcanzando el 90% en los pacientes con buena respuesta a la quimioterapia (necrosis superior al 90%) pero cae al 50-60% si la necrosis es inferior al 90% (164). Más allá de las pruebas de extensión al diagnóstico, no se han validado otros marcadores biológicos que ayuden a asignar a los pacientes a diferentes grupos de riesgo. La cirugía juega un papel clave, tanto la resección del tumor primario como la resección de las metástasis pulmonares. Actualmente, el tratamiento quirúrgico se considera el único potencialmente curativo en la recaída metastásica, sin existir una pauta de tratamiento efectiva para estos pacientes, cuya supervivencia es del 30% a los 5 años (165). Disponer de modelos preclínicos que puedan guiar el desarrollo de fármacos y reflejar la heterogeneidad intertumoral de este tipo de sarcomas óseos es muy importante. Los osteosarcomas se caracterizan por tener muchas variantes estructurales y alteraciones en el número de copias, sin embargo, suelen tener pocas variantes de un solo nucleótido y pequeñas inserciones y delecciones (*indels*), a excepción de los genes *TP53*, *RB1*, *ATRX*, *PTEN* o *NF1*. Además, carecen de una translocación canónica, a diferencia de otros sarcomas (166).

Nuestra tasa de *engraftment* ha sido del 44%, casi idéntica a la descrita por St. Jude (59). Los modelos VH-PDOX-OS1 y VH-PDOX-OS2 son modelos que nos permitirían estudiar posibles terapias dirigidas frente a *TP53* (reparación del ADN y apoptosis) y *ATRX* (regulador epigenético), dos de los genes más frecuentemente alterados en los osteosarcomas, con un número muy limitado de recomendaciones terapéuticas que puedan guiar al acceso a ensayos clínicos en fase precoz. El desarrollo de nuevas terapias dirigidas de manera directa o indirecta a estos dos genes es crucial.

El modelo VH-PDOX-OS3 permitiría explorar el tratamiento con los inhibidores de *CDK2*, que se han propuesto como terapia dirigida para los tumores con amplificación de Ciclina E1 (167); en un estudio reciente se ha ensayado el efecto del inhibidor de *CDKs* (dinaciclib) en PDX de osteosarcomas con amplificación de ciclina E1, y se ha observado una inhibición significativa del crecimiento de los tumores (167). Este trabajo de Sayles et al., publicado

DISCUSIÓN

en *Cancer Discovery*, pone de manifiesto la gran utilidad de los modelos animales de PDX en el desarrollo de nuevos fármacos para los osteosarcomas.

- El sarcoma de Ewing es el segundo sarcoma óseo en frecuencia en niños y adolescentes. Se caracteriza por la presencia de una traslocación balanceada entre el gen *EWSR1* del cromosoma 22 y un gen de la familia del factor de transcripción ETS (*FLI1* en un 90% de los casos). Al igual que sucede con la mayoría de los tumores pediátricos, se trata de un tumor con una carga mutacional baja (0,15/megabase) (149). Del mismo modo que en el osteosarcoma, su clasificación de riesgo actual se basa únicamente en características clínicas (tamaño del tumor y presencia de metástasis), aunque están en curso varias iniciativas que tratan de validar marcadores moleculares.

Nuestra tasa de *engraftment* para los sarcomas de Ewing ha sido baja, de un 21%, equiparable al 29% del equipo de St. Jude (59).

STAG2 codifica para un componente del complejo cohesina, clave en el correcto funcionamiento del proceso de meiosis y mitosis. *STAG2* es el gen más frecuentemente mutado en los sarcomas de Ewing (20% de los casos) y su pérdida de función se asocia con enfermedad metastásica y mal pronóstico (168) (169). Mondal G. et al. mostraron que la inactivación de *STAG2* causa inestabilidad en la horquilla de replicación del ADN creando una letalidad sintética que parece hacerlos sensibles a inhibidores de PARP (170). *FGFR1* es un receptor tirosina quinasa frecuentemente alterado en varios tipos de tumores. Las mutaciones activadoras en *FGFR1* no se consideraban recurrentes en los sarcomas de Ewing hasta hace muy poco. En un trabajo muy reciente se ha descrito que el 3% de los pacientes con sarcoma de Ewing presentan mutaciones en *FGFR1*, pasando a ser la primera alteración accionable y recurrente de una quinasa en este tipo de sarcomas (171). De esta manera el modelo VH-PDOX-EWS2 podría ser un modelo de sarcoma de Ewing ideal para estudiar si los inhibidores de *FGFR* pueden ser eficaces en este tipo de sarcomas, y para explorar combinaciones con inhibidores de PARP u otras combinaciones o estrategias terapéuticas que se desarrollen para este tipo de tumores con supervivencias todavía muy bajas.

DISCUSIÓN

Las delecciones del gen *CDKN2A* son frecuentes en los sarcomas de Ewing (12%-28% de los casos) (168) (169). Así, el modelo VH-PDOX-EWS3 podría ser un modelo representativo de este tipo de tumores con translocación de *EWR1* y delección de *CDKN2A* y *CDKN2B* y podría ser de ayuda en el estudio de los inhibidores CDK4/6 u otras nuevas estrategias.

Por desgracia, la muestra VH-62 no logró generar un modelo PDOX, pero de mantenerse las características genómicas desde el diagnóstico, el modelo VH-PDOX-EWS1 sería muy interesante para explorar el posible papel de la delección de *ERRFI1* en el sarcoma de Ewing. Los tres modelos de PDOX de sarcoma de Ewing generados serían idóneos para estudiar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para las proteínas de fusión, que se sabe que tienen un papel crucial en la regulación epigenética de la expresión génica y que son el evento *driver* y oncogénico en este tipo de tumores (172). Además, los modelos representan un buen abanico de las alteraciones secundarias recurrentes en los sarcomas de Ewing.

- El sarcoma óseo indiferenciado NOS presentaba una fusión en *NTRK1*. Las fusiones de *NTRK1* (receptor tirosina quinasa) se deben a traslocaciones cromosómicas que generalmente fusionan la porción N-terminal de un *partner* con la porción N-terminal de *NTRK1*. Esta, incluye el dominio quinasa, generando una proteína de fusión oncogénica activadora de vías de señalización como MAPK, PI3K y PLC-γ (173). Se han detectado fusiones de *NTRK* en muchos tipos de tumores, entre ellos sarcomas, tanto pediátricos como del adulto (116). En estos últimos años, varios inhibidores dirigidos a las proteínas tropomiosina receptor quinasa (TRK) han sido muy efectivos en el tratamiento de tumores con fusiones *NTRK*, independientemente de la histología y del tipo de fusión (lo que se conoce como "tratamiento tumor-agnóstico"). Por ese motivo, actualmente se recomienda realizar sistemáticamente alguna técnica molecular (NGS, FISH, IHQ) que pueda identificar la presencia de estas fusiones tanto en tumores conocidos por su frecuente presencia de fusiones de *NTRK* como en tumores metastásicos y con mal pronóstico, en los que las fusiones son poco prevalentes (174).

Todas las alteraciones detectadas en el tumor de la paciente son frecuentes en sarcomas pediátricos y de adultos, el modelo VH-PDOX-SO-NOS1 es una oportunidad única para

DISCUSIÓN

entender el papel de alteraciones como la amplificación de *TERT* (mantenimiento de la longitud de los telómeros) o la delección de *NF1*, en este tipo de sarcomas. También es importante para estudiar la biología del tumor y las sinergias en vías de señalización como consecuencia de presentar estas alteraciones a la vez en el tumor y, por supuesto, para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos y de nuevas combinaciones (116).

NEFROBLASTOMAS:

- El nefroblastoma o tumor de Wilms es el tumor renal maligno más frecuente de la infancia, y el segundo tumor sólido extracraneal más frecuente en niños menores de 6 años. En general, se trata de tumores con buen pronóstico en primera línea de tratamiento, lo que hace que existan pocos modelos preclínicos (175). Para los tumores en recaída, así como para algunos subtipos particularmente agresivos (tumores blastematosos post-quimioterapia, tumores anaplásicos), las tasas de curación disminuyen radicalmente, a pesar de regímenes terapéuticos muy agresivos (176). La necesidad de modelos que permitan desarrollar nuevas terapias es más perentoria para este grupo de pacientes.

Nuestra tasa de *engraftment* ha sido del 47%, claramente inferior al 78% de St. Jude (59) o la Universidad de Indiana (130). Una hipótesis posible es que, en estos centros, ambos estadounidenses, se aplican protocolos que indican realizar la nefrectomía de entrada, a diferencia de nuestros protocolos europeos, que recomiendan administrar tratamiento neoadyuvante previo.

Si se confirman las mismas alteraciones genómica en las muestras de los PDOX de nefroblastomas establecidos, estos modelos pueden ser muy útiles en los estudios de los mecanismos moleculares que contribuyen a la oncogénesis de los tumores de Wilms y en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, ya que para la mayoría de las mutaciones detectadas no hay recomendaciones terapéuticas disponibles.

Este es el caso de *DROSHA*, un gen clave en las fases iniciales de la biogénesis de los microRNAs que se encuentra mutado en una proporción muy pequeña de tumores incluyendo los tumores de Wilms (177). Tener modelos PDOX con estas mutaciones nos puede permitir entender mejor las consecuencias de la desregulación de la expresión génica por la inhibición de la biogénesis de los microRNAs (178). Además, con el modelo

DISCUSIÓN

PDOX establecido se pueden ensayar nuevas estrategias terapéuticas ya que *DROSHA* está mutado en el 12% de los nefroblastomas y la mutación *DROSHA-p.E1147K* se detecta en el 81% de los tumores con *DROSHA* mutado (177) (179).

SIX1 codifica una proteína *homebox* que es un factor de transcripción que juega un papel importante en la regulación de la proliferación, apoptosis y en el desarrollo de órganos como el riñón. Las mutaciones en los genes *SIX1/2* son frecuentes en los nefroblastomas (7%), siendo la mutación *SIX1/2-p.Q177R* una de las más recurrentes (180) (178). Se ha descrito que la histología blastema, que es la más indiferenciada, es la que predomina en los tumores de Wilms con mutaciones en *SIX1/2* y *DROSHA*. Cabe destacar que la muestra de la paciente tiene componente blastematoso y epitelial. La combinación de la mutación *SIX1* (p.Q177R) y mutaciones en *DROSHA* en el exón 29 (p.E1147K) en el mismo tumor se asocian con la activación de *RAS* y mayores tasas de recaída y *exitus* (180). El modelo VH-PDOX-WT9 sería un modelo ideal para estudiar inhibidores de *RAS* en tumores con mutaciones en *SIX1/2* y *DROSHA*, entre otras estrategias de tratamiento. Estos modelos de PDOX también pueden ser relevantes para estudiar el papel de las mutaciones de pérdida de función detectadas en los genes supresores de tumores *ZFHX3* y *CBFB* en la oncogénesis de los nefroblastomas, así como del gen regulador epigenético *ASXL1*, un gen mutado de manera recurrente en los tumores de Wilms (181) y para el que no hay fármacos disponibles.

TUMORES HEPÁTICOS:

- El hepatoblastoma es el tumor hepático primario maligno más frecuente en niños. Puede aparecer aislado o en el contexto de algunos síndromes genéticos (Beckwith-Wiedemann, Poliposis Colónica Familiar, etc.) o de enfermedades subyacentes. La cirugía es una pieza clave en su tratamiento, siendo la resección completa la única opción curativa. En los casos con enfermedad confinada al hígado, las actuales tasas de curación son superiores al 80% (182). Este porcentaje disminuye en los tumores metastásicos y, sobre todo, en las recaídas, para las que actualmente no existe una estrategia curativa efectiva.

DISCUSIÓN

El modelo VH-PDOX-HB4 presenta tanto la mutación oncogénica detectada a nivel somático en el gen *CTNNB1* como la detectada en *MITF* a nivel germinal, las cuales podrían estar jugando un papel esencial en la tumorigénesis del tumor del paciente. Este modelo nos ofrecería una oportunidad única para estudiar esta hipótesis, la relación entre *MITF* y *CTNNB1* en los hepatoblastomas, así como para ensayar inhibidores de la β-catenina.

Hemos tenido una tasa de *engraftment* del 55%, equivalente al 47% obtenido por Nicolle et al. (136). Los modelos VH-PDOX-HB5 y VH-PDOX-HB6 podrían utilizarse en estudios sobre los mecanismos moleculares de los hepatoblastomas asociados al síndrome de Beckwith-Wiedemann.

En tres de los modelos no se identificaron alteraciones a nivel genómico. Es importante remarcar que las mutaciones somáticas en regiones exónicas son muy poco frecuentes en los hepatoblastomas (0.52/Mb) (183), siendo uno de los tumores humanos con menos alteraciones genómicas que se conocen (184). Por ello, es cada vez más evidente que su caracterización genómica debe complementarse con la caracterización epigenómica y transcriptómica, para lograr una adecuada estratificación de los pacientes por grupos de riesgo y para poder aplicar nuevas estrategias de medicina de precisión (66) (185).

- El hepatocarcinoma (HCC) es un tumor poco frecuente en pediatría y, aun así, es el segundo tumor hepático primario maligno en frecuencia. La posibilidad de alcanzar la resección completa al diagnóstico (bien sea mediante hepatectomía o trasplante) es el punto crítico en la curación. Sus tasas de supervivencia son peores que las del hepatoblastoma (en los estudios SIOPEL-2 y 3, la supervivencia de los pacientes no resecables al diagnóstico se situó en el 22% (186)), y por ello se considera un tumor de alto riesgo en todos los protocolos internacionales. Actualmente, no existen terapias efectivas dirigidas a *TP53* disponibles y aceptadas para su uso clínico. Como información adicional, en este caso el tumor presentaba una carga mutacional baja, por lo que tampoco planteamos como posibilidad la utilización de inmunoterapia anti-PD1.

Nuestra tasa de *engraftment* ha sido del 25%. En modelos de HCC del adulto, con series que alcanzan el 39.4% de éxito de implantación, está descrito que el fenotipo molecular

DISCUSIÓN

del tumor influye en las tasas de éxito, con mayor facilidad para generar modelos en las muestras procedentes de tumores indiferenciados y con elevado índice proliferativo (187).

NEUROBLASTOMAS:

- El neuroblastoma, como ya hemos comentado, es el tumor sólido extracraneal más frecuente en niños, y el tratamiento de los tumores de alto riesgo sigue estancado en unas tasas de supervivencia inferiores al 50% (26). Por ello, se mantiene como una de las principales causas de fallecimiento por cáncer en la infancia.

En línea con lo descrito por el grupo de St. Jude (59), las tasas de *engraftment* fueron de las más bajas de la serie (18%), aunque el origen de este hecho no está bien filiado.

El abanico de modelos de neuroblastomas desarrollados podría ser una gran oportunidad para el desarrollo de nuevos fármacos en formas agresivas de neuroblastoma en las que urge desarrollar nuevas oportunidades terapéuticas

Los dos modelos establecidos de “alto riesgo”, VH-PDOX-NB5 y VH-PDOX-NB6, serían modelos muy valiosos para descubrir tratamientos que inhiban el efecto oncogénico de la amplificación de *MYCN*, para identificar nuevos inhibidores efectivos de ALK en los neuroblastomas o para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para estos pacientes (188).

El modelo VH-PDOX-NB5 nos ofrecería también una oportunidad de estudiar el papel de *ABCB1* en la resistencia a la quimioterapia. Recordemos, además, que es el único modelo de la tesis genéticamente caracterizado.

El modelo VH-PDOX-NB6 podría ayudar en el desarrollo preclínico de nuevo inhibidores *PPM1D* ya que actualmente no disponemos de base suficiente como para proporcionar recomendaciones terapéuticas con fármacos dirigidos directamente a *PPM1D* (189).

Los modelos VH-PDOX-NB2 y VH-PDOX-NB3 podrían ser muy útiles en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en pacientes en recaída metastásica, que es la principal causa de fallecimiento en los pacientes con neuroblastoma. El modelo VH-PDOX-NB3 añade el interés de tratarse de una recaída en el sistema nervioso central, una localización de recaída asociada a una supervivencia muy pobre (8% de supervivencia global a los tres

DISCUSIÓN

años) con el añadido de la dificultad de la administración adecuada de terapias sistémicas (190).

El interés del modelo VH-PDOX-NB4 reside en su delección 11q y en la edad del paciente. Los neuroblastomas con delección en 11q están reconocidos como un subgrupo de neuroblastomas con mal pronóstico y con características diferentes a los MYCN amplificados, susceptibles de estrategias terapéuticas diferenciadas que es necesario estudiar en profundidad en modelos como el que hemos generado.

OTROS TIPOS TUMORALES:

- El retinoblastoma es el tumor oftálmico maligno primario más frecuente en niños. Aproximadamente un 40% de los pacientes presentan mutaciones germinales en el gen supresor de tumores *RB1*, al igual que nuestro paciente. Los pacientes portadores de estas mutaciones sufren además de la predisposición para desarrollar otros tumores a lo largo de la vida (sarcomas de partes blandas o melanomas, entre otros). La supervivencia actual del retinoblastoma es excelente, llegando al 97,9% en Europa (24), por lo que la investigación se centra en reducir las secuelas a largo plazo, las cuales pueden incluir la pérdida de uno o los dos ojos, dado que la enucleación es la estrategia más efectiva para minimizar el riesgo de metástasis cuando la enfermedad es localmente avanzada, o el desarrollo de segundos tumores en relación al tratamiento radioterápico.

Existe por tanto el interés de desarrollar modelos preclínicos que permitan desarrollar terapias menos agresivas y diseñar nuevas vías de administración farmacológica. Estos modelos, idealmente ortotópicos, permitirían ensayar nuevas estrategias terapéuticas que, en el caso del retinoblastoma, están altamente condicionadas por la propia anatomía ocular y la farmacocinética, ya que la difusión de los quimioterápicos al humor vítreo o al fluido subretinal es muy limitada.

Hemos logrado un 33% de éxito de *engraftment*, que pensamos que es mejorable dado que la técnica de implantación estaba en la curva de aprendizaje. Nuestro modelo VH-PDOX-RB1, vendría a sumarse a los modelos actualmente existentes (desarrollados en ratones transgénicos con retinoblastoma espontáneo y en diferentes tipos de PDX, la mayoría procedentes de líneas celulares) (191) (192), con la particularidad de ser, junto a los

DISCUSIÓN

desarrollados por el Instituto Curie, uno de los pocos modelos derivados de paciente y ortotópico existentes (192).

- El meduloblastoma el tumor cerebral maligno más frecuente en niños, suponiendo un 8-10% del total de los tumores cerebrales pediátricos. Fue uno de los primeros tumores pediátricos en beneficiarse de una aproximación molecular. Ésta, permitió establecer cuatro categorías bien diferenciadas (*Wingless* o WNT-activado, *Sonic Hedgehog* o SHH-activado (que a su vez se divide en tumores con TP53 mutado o TP53 *wild type*), y los tumores no-WNT/no-SHH, denominados Grupo 3 y Grupo 4) (193). Estos cuatro grupos se correlacionan con el pronóstico, y han permitido empezar a estratificar el manejo terapéutico en los nuevos ensayos clínicos. Sin embargo, la secuenciación genómica exhaustiva por el momento solo ha permitido establecer una clasificación molecular, al haberse identificado muy pocas dianas accionables que además, por la inestabilidad de la propia enfermedad, rápidamente genera resistencia a los tratamientos (194). Los modelos PDX ortotópicos son, de nuevo, los más adecuados para su estudio al reproducir la barrera hematoencefálica intacta, uno de los principales factores en la farmacocinética del tratamiento de los tumores del sistema nervioso central.

Logramos un éxito de *engraftment* del 33%, que igual que en el caso de los retinobastomas, pensamos que está condicionado por la implementación de la técnica. El tumor del que se origina nuestro modelo, VH-PDOX-SNC1, corresponde a un meduloblastoma clásico diseminado, perteneciente al Grupo 4. Tras analizarlo con el panel *Oncomine Childhood*, se identificó que el tumor presentaba una amplificación de *MYCN*, sin alteraciones en *TP53* ni *CTNNB1*.

La mayoría de los modelos murinos existentes corresponden a los llamados GEMM (modelos en ratón diseñados genéticamente), pero estos no recapitulan la heterogeneidad de los tumores humanos. Por ello, algunos grupos (los más destacados, St Jude, el German Cancer Research Center y el Fred Hutchinson Cancer Research Center), han desarrollado modelos PDX ortotópicos (195). El Grupo 4, al que pertenece nuestro modelo, es uno de los menos representados, y estudios recientes sugieren que estos tumores podrían ser susceptibles a los inhibidores de las tirosina quinasas, al presentar una señalización

DISCUSIÓN

aberrante de ERBB4-SRC (196). Sin embargo, aún no se conocen con certeza las mutaciones *driver* que se asocian al Grupo 4. El modelo VH-PDOX-SNC1 podría emplearse en estudios enfocados a estudiar de qué célula se origina este grupo y sus mutaciones oncogénicas potenciales.

De nuevo, los modelos preclínicos como VH-PDOX-SNC1 cobran una gran relevancia a la hora de identificar mecanismos epigenéticos accionables y ensayar nuevas terapias (195) (197).

- El disgerminoma es un tumor germinal maligno poco frecuente; en pacientes adultas es el tumor germinal maligno ovárico más frecuente, pero en pacientes pediátricas es raro. En un 12% de los casos se produce en pacientes con trastornos de la diferenciación sexual y con gónadas disgenésicas. Su pronóstico (siempre que se realice un adecuado estadiaje y tratamiento quirúrgico, y a veces, quimioterápico) es en general excelente, con una supervivencia global en torno al 90% (198). Existen pocos modelos de tumores germinales malignos pediátricos (199), probablemente por el buen pronóstico que presentan. El tratamiento se basa en la combinación de quimioterapia con cirugía y, en ocasiones, radioterapia. Para algunos tumores metastásicos o en recaída, el pronóstico puede ser muy pobre. En recaída, se describen distintas combinaciones terapéuticas en la literatura, sin un consenso sobre cuál es superior, y que requieren acompañarse de tratamientos locales agresivos (principalmente quirúrgicos y potencialmente mutilantes - salpingooforectomía bilateral, histerectomía o colpectomía - a edades muy tempranas). Por tanto, es interesante desarrollar modelos como el VH-PDOX-GCT1 que permitan, por un lado, ensayar nuevos tratamientos que permitan evitar las secuelas asociadas con la primera línea de quimioterapia (fibrosis pulmonar, sordera, insuficiencia renal o segundos tumores, entre otras), y por otro, identificar tratamientos efectivos para las pacientes con enfermedad metastásica refractaria o en recaída. En la literatura se describen algunos modelos PDX subcutáneos (200) (201) de disgerminoma de la mujer adulta y al menos un modelo de tumor del seno endodérmico ovárico pediátrico (199), pero no hemos identificado ningún modelo de disgerminoma ovárico pediátrico, ni subcutáneo ni

DISCUSIÓN

ortotópico. Esto convierte al modelo VH-PDOX-GCT1, hasta donde sabemos, en el primero de su categoría.

La tasa de engraftment de los tumores germinales y gonadales implantados ha sido del 17%, la más pobre de la serie.

4.6 Aplicación experimental de los modelos

Durante el periodo de realización de la tesis se realizaron tres aproximaciones de oncología personalizada en tiempo real como pruebas de concepto, en un intento de valorar la relevancia de los PDOX generados como herramientas preclínicas para identificar tratamientos potencialmente efectivos en un paciente específico en tiempo real.

Esta aproximación conlleva una enorme complejidad. La variable tiempo siempre juega en contra, ya que este tipo de estudios se hace para pacientes pediátricos con pocas opciones terapéuticas y poca esperanza de vida, con tumores avanzados y de muy mal pronóstico. Se trata de una aproximación bastante análoga a lo que ocurre en un ensayo clínico para evaluar un nuevo tratamiento. Para que el lector de esta tesis pueda hacerse una idea de la complejidad del proceso, queremos resaltar varios puntos que son fundamentales y que deben estar optimizados para poder llegar a ofrecer a un paciente una opción terapéutica:

- i) Tener perfectamente definidos tanto los circuitos de recogida de la muestra como de implantación;
- ii) Tener un alto grado de especialización en la implantación ortotópica de los tumores, tanto con fragmentos de tumores como con biopsias muy pequeñas, y en diferentes localizaciones anatómicas;
- iii) Llegar a tener unas tasas aceptables de implantación/crecimiento de los tumores en los ratones, algo como ya hemos visto, muchas veces difícil de conseguir para los tumores pediátricos;
- iv) Reducir al mínimo posible los tiempos de estudio histopatológico del tumor;
- v) Reducir al mínimo posible los tiempos para el estudio genómico (WES/panel de genes) del tumor;
- vi) Conseguir la expansión homogénea (reduciendo al máximo la dispersión) del tumor en los PDOX;
- vii) Consensuar con los equipos clínicos los tratamientos que se deben evaluar en los ratones;
- viii) Conseguir los fármacos (algunos con costes prohibitivos para estudios *in vivo* en

DISCUSIÓN

ratones); ix) Llegar a alcanzar un grado de especialización en los procesos de tratamientos de ratones que nos permita obtener resultados representativos con un número pequeño de animales por cada grupo de tratamiento ($n=3-4$). En todo este proceso hay bastantes cuellos de botella técnicos, además del principal escollo, que es el coste de estos fármacos para tratar a los ratones durante un mínimo de dos semanas.

Teniendo en cuenta todos estos factores, los tres casos de medicina de precisión que presentamos en esta tesis tienen un enorme valor. Actualmente, hay pocos centros en el ámbito de la pediatría oncológica que puedan llegar a hacer unas aproximaciones como las presentadas aquí. Estas estrategias nos han enseñado a mejorar el funcionamiento de todo el proceso y esperamos que en un futuro podamos ofrecérselo a más pacientes. Aun siendo imposible ofrecer estas opciones a todos los niños con tumores de mal pronóstico, indirectamente muchos niños podrán beneficiarse del resultado si somos capaces de ejecutarlas para tumores de diferentes tipos. El acceso a suficientes recursos materiales y humanos será el determinante para poder realizar más aproximaciones en tiempo real. En este sentido nos gustaría resaltar que buena parte de estos estudios se han podido realizar gracias a la cofinanciación por parte de la empresa Xenopat S.L. (www.xenopat.com), una spin-off del ICO/IDIBELL, como una decisión admirable de realizar su Acción Social Corporativa en el campo de la oncología pediátrica.

Los tres casos para los que hemos realizado los estudios de medicina de precisión fueron seleccionados por el equipo clínico basándose en la agresividad del tumor, la complejidad y la dificultad de encontrar un tratamiento efectivo para tratar a estos pacientes. Debemos plantear aquí el concepto de equidad terapéutica. Para ello, es esencial que la decisión recaiga en el equipo clínico en su conjunto (Comité Multidisciplinar de Tumores y Comité de Medicina Personalizada), valorando qué casos pueden beneficiarse de esta aproximación. En dos de los casos (Paciente 1 Y Paciente 2), nuestra estrategia consistió en encontrar algún resultado relevante, con fármacos concretos que se pudieran usar en el ámbito de la oncología pediátrica, que justificara la solicitud de autorización como tratamiento de uso compasivo o la inclusión en algún ensayo clínico, en pacientes que estaban agotando sus opciones terapéuticas. En el caso del Paciente 3, se aprecia cómo

DISCUSIÓN

estas estrategias pueden ser también muy relevantes en los pacientes que sí responden al tratamiento, al orientarnos en las opciones terapéuticas ante una hipotética recaída.

En los tres casos mostrados, se intentó priorizar la evaluación en el PDOX de aquellos fármacos o combinaciones (quimioterapia, terapias dirigidas o inmunoterapia) que, de ser efectivas, pudiesen trasladarse al paciente, aunque fuese por la vía de autorizaciones basadas en la evidencia experimental. Además, estos estudios son herramientas muy importantes para definir potenciales nuevas estrategias que sean útiles a otros pacientes con tumores similares al estudiado. Para ello, será muy importante combinar los estudios ya realizados de respuesta tumoral (evaluada como disminución del tamaño/peso del tumor) con los de respuesta histológica, evaluada por las patólogas.

El planteamiento del programa COMIK, ya desde su inicio, contemplaba la realización de algunas estrategias de medicina de precisión en tiempo real, con el objetivo de ir más allá de la identificación de alteraciones moleculares para plantear un potencial tratamiento o incluir al paciente en un ensayo clínico. Este es un hecho diferencial y un paso adelante respecto a la mayoría de los programas de medicina de precisión pediátricos de nuestro entorno.

Nuestra estrategia de medicina de precisión vertebrada entorno al binomio PDOX-Mutaciones ha de ser dinámica y nos ha de permitir anticiparnos a la aparición de mecanismos de resistencia a los diferentes tratamientos. Las estrategias en tiempo real nos pueden ayudar no solo a identificar potenciales tratamientos, sino también nuevas aproximaciones para anticiparnos a las recaídas de los tumores.

4.7 Los retos pendientes de los modelos PDX

Pese a las indiscutibles ventajas que los modelos PDX (especialmente los PDOX) presentan frente a otros modelos preclínicos, existen aún retos a resolver. Probablemente el más limitante sea la gran cantidad de recursos humanos y materiales que se requieren para su desarrollo, en comparación con las cada vez más accesibles técnicas de secuenciación. En

DISCUSIÓN

este sentido, la centralización en laboratorios especializados en los que aglutinar los recursos puede suponer un gran avance.

En lo correspondiente a los propios modelos, estos no dejan de ser animales inmunodeprimidos que no reflejan la influencia del ambiente inmunitario y, aunque el microambiente sea similar, contiene diferencias respecto al humano (202). Además, es muy difícil obtener modelos metastásicos por evolución natural (verdadero modelo metastásico) de la enfermedad dado que los animales fallecen antes de llegar a desarrollar las metástasis.

Como hemos visto, en algunas ocasiones, el modelo puede ser parcialmente diferente al tumor original. Una de las principales razones es la propia heterogeneidad tumoral (203), que puede ocasionar que la muestra implantada no contenga todos los elementos representativos. Con todo, los modelos PDX siguen siendo los modelos preclínicos que más fielmente reflejan esta heterogeneidad.

Los roedores presentan una mayor tolerancia que los humanos a la quimioterapia, por lo que las dosis efectivas pueden no ser trasladables a los pacientes (41). En la experiencia del PPTP, los modelos que sólo presentan respuestas a las dosis máximas toleradas por los ratones no son extrapolables al paciente (138).

Los estudios preclínicos han de lograr abarcar la diversidad genética y epigenética de cada tumor. Por ejemplo, ante una misma mutación *driver*, la respuesta a un tratamiento dirigido puede ser dependiente del contexto y tipo tumoral. Por tanto, es imprescindible probar el fármaco en múltiples modelos que representen la misma variante genética. Frente a los estudios tradicionales, que emplean varios animales para los grupos control y tratamiento, surgen nuevos diseños. Entre ellos, destacan las pruebas en un solo ratón (en inglés, *single mouse testing*, SMT), basadas en un análisis retrospectivo del PPTP que incluye 2134 estudios farmacológicos (204). Este método permite reducir el número de animales necesario (en consonancia con las 3R) así como los recursos dedicados, y ha demostrado tener una gran concordancia con los estudios tradicionales. El uso del SMT puede incorporar potencialmente más de 20 veces los modelos que se evalúan para un agente,

DISCUSIÓN

así como abarcar diferentes enfermedades o la diversidad genética de una enfermedad concreta. Y dado que habitualmente, cada modelo tumoral se vincula a secuenciación WES y RNAseq, sus resultados podrían ayudar a identificar biomarcadores que se asocien a la sensibilidad o resistencia farmacológica.

En cuanto a los criterios de respuesta a un tratamiento, estos son claramente más laxos en los modelos animales (a menudo limitados a la medida y peso del tumor) que, en los humanos, que incluyen criterios clínicos y radiológicos. La aplicación de los criterios de consenso elaborados en 2021 por el ITCC en colaboración con el PPTC (205), traerá una armonización en la comunicación de los resultados que los hará más comparables.

4.8 Debilidades y fortalezas de la tesis.

Las limitaciones presupuestarias y de recursos humanos han supuesto algunas de las mayores dificultades a lo largo de la realización del proyecto de tesis. Por un lado, no se han podido establecer todos los modelos que hubiéramos deseado, ni los modelos establecidos se han podido expandir sistemáticamente. Por otro lado, esta restricción ha supuesto limitarnos a realizar una caracterización histológica e inmunohistoquímica, sin poder caracterizar genómicamente los modelos, ni poder hacer en ellos pueblas de drogas de alto rendimiento. Sin embargo, pese a no haber podido realizar esta caracterización, la confirmación de correlación histológica en la práctica totalidad de los modelos y la literatura existente, nos permite anticipar que muy probablemente estos modelos van a recapitular las características genómicas de los tumores originales.

Las conclusiones extraídas mediante los análisis estadísticos, obviamente se encuentran limitadas por el pequeño número de pacientes incluidos y de modelos desarrollados, así como por la gran variedad de patologías analizadas. Es evidente que son necesarios tamaños muestrales más grandes, que incluyan mayor número de tumores en cada grupo diagnóstico, para alcanzar unas conclusiones más fiables. No obstante, el análisis realizado, nos permite extraer algunas conclusiones relevantes.

DISCUSIÓN

Por otro lado, únicamente disponemos de la secuenciación WES de una parte de los tumores originales a partir de los que se ha desarrollado un PDX. También en algunos tumores, se realizaron estudios con paneles de genes más limitados. De nuevo, la razón está en las restricciones presupuestarias que nos llevaron a restringir la realización de estudios genómicos a algunos pacientes en situación de alto riesgo, recaída, progresión o refractariedad. Actualmente, la realización sistemática del panel Oncomine™ Childhood Cancer Research Assay, Termo Fisher Scientific, incorporado por el CatSalut en el año 2021 como parte del programa catalán de medicina de precisión, nos permitirá al menos disponer de una caracterización básica de los tumores de todos los pacientes, independientemente de su grupo de riesgo o situación clínica. Este panel incluye las 203 alteraciones genéticas más representativas en el cáncer del niño y el adolescente.

Sin embargo, pesar de contar con unos recursos muy limitados, hemos logrado establecer 46 modelos PDOX de tumores pediátricos y del adolescente, representando una enorme variabilidad tumoral y generando algunos modelos de particular interés por su escasa representatividad en las series internacionales, y previsiblemente (una vez caracterizados) incluyendo algunas alteraciones genómicas de enorme interés para desarrollar nuevas dianas terapéuticas, evaluar la efectividad de algunas ya disponibles y estudiar mecanismos oncogénicos poco conocidos en el cáncer infantil. Además, estos modelos se han logrado utilizar con éxito en varios estudios experimentales publicados (Anexo II), así como en tres casos de medicina personalizada en tiempo real.

La combinación de una aproximación desde la biología con la información procedente del seguimiento clínico de los pacientes, ha sido de enorme ayuda para poner en contexto la relevancia de los modelos y de los hallazgos genómicos en las muestras tumorales. Se trata de una perspectiva que no está presente, en general, en las grandes series internacionales que caracterizan genómicamente los modelos PDX. Esta simbiosis entre investigadores básicos y clínicos (entre los que incluimos a los especialistas quirúrgicos) es, desde nuestro punto de vista, el modelo idóneo que debería impulsar la investigación biomédica traslacional en el SXXI.

5. CONCLUSIONES

5.1 Conclusiones específicas

Primera: Hemos logrado desarrollar un banco de 46 modelos PDOX con representación de 14 tipos tumorales, algunos de ellos considerados raros y ultrarraros, a partir de 135 muestras de pacientes pediátricos y adolescentes en diferente situación clínica. Estos modelos preclínicos constituyen una fuente de material biológico renovable, una vez criopreservados y, además, una vez hayan sido caracterizados genómicamente, plantean gran número de posibilidades de investigación. Este banco de PDOX se acompaña de una base de datos clínica de enorme relevancia.

Segunda: La tasa de éxito de implantación (*engraftment*) ha sido del 34%, muy satisfactoria considerando que se han implantado un gran número de muestras obtenidas al diagnóstico o en primera línea, así como procedentes de tumores de riesgo intermedio o bajo.

Tercera: La caracterización histológica de los modelos ha sido concordante con el tumor original en el 97,8% de los 44 modelos de los que se dispuso de tejido del PDOX para su análisis (40 comprobados comparativamente con muestras pareadas de paciente y 3 mediante examen morfológico por parte de una patóloga experta en cáncer pediátrico).

Cuarta: Se han analizado diversos factores que pueden influir positivamente en el éxito de implantación, como, por ejemplo, que la muestra procediese de tumores de muy alto riesgo, de tumores en recaída o en progresión, o de metástasis. Además, la implantación ortotópica fue más efectiva que la subcutánea. Será preciso validar estos hallazgos en series más extensas, para poder optimizar las posibilidades de establecer los modelos.

Quinta: El tamaño de la muestra a implantar no supuso un impedimento para generar los modelos PDOX, por lo que esta opción debería plantearse incluso en los casos en los que la muestra disponible es muy limitada, como es el caso de los cilindros obtenidos con aguja gruesa Tru-Cut®. Es un elemento muy relevante, ya que evita la necesidad de someter al paciente a abordajes más invasivos.

Sexta: El éxito en el establecimiento de los modelos PDOX se correlacionó con el pronóstico de los pacientes, en términos de recaída/progresión y de fallecimiento.

Séptima: En un 65,2% de las muestras hubiera sido factible realizar una expansión de los modelos que permitiese ensayar diversos fármacos, acercando al paciente la posibilidad de identificar nuevos tratamientos mediante medicina personalizada en tiempo real.

Octava: La participación del equipo de Cirugía Oncológica Pediátrica dentro de un equipo multidisciplinar experto, de investigadores básicos y clínicos, ha sido fundamental para establecer un programa de medicina personalizada con una plataforma de modelos PDX pediátricos, lo que pone de relieve los beneficios de implicar a los especialistas quirúrgicos en los programas de investigación básica y translacional.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. More surgeons must start doing basic science. *Nature*. 2017 Apr 21;544(7651):393–4.
2. Harris CJ, Waters AM, Tracy ET, Christison-Lagay E, Baertshiger RM, Ehrlich P, et al. Precision oncology: A primer for pediatric surgeons from the APSA cancer committee. *J Pediatr Surg*. 2020 Sep;55(9):1706–13.
3. Dasgupta R. An Introduction to Pediatric Surgical Oncology. *Surg Oncol Clin N Am*. 2021 Apr;30(2):xv–xvi.
4. Jones DTW, Banito A, Grünewald TGP, Haber M, Jäger N, Kool M, et al. Molecular characteristics and therapeutic vulnerabilities across paediatric solid tumours. *Nat Rev Cancer*. 2019 Aug;19(8):420–38.
5. Filbin M, Monje M. Developmental origins and emerging therapeutic opportunities for childhood cancer. *Nat Med*. 2019 Mar;25(3):367–76.
6. Chen X, Pappo A, Dyer MA. Pediatric solid tumor genomics and developmental pliancy. *Oncogene*. 2015 Oct 8;34(41):5207–15.
7. Kentsis A. Why do young people get cancer? *Pediatr Blood Cancer*. 2020 Jul;67(7):e28335.
8. Gröbner SN, Worst BC, Weischenfeldt J, Buchhalter I, Kleinheinz K, Rudneva VA, et al. The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature*. 2018 Mar 15;555(7696):321–7.
9. Miller KD, Fidler-Benaoudia M, Keegan TH, Hipp HS, Jemal A, Siegel RL. Cancer statistics for adolescents and young adults, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 Nov;70(6):443–59.
10. Vassal G, Schrappe M, Pritchard-Jones K, Arnold F, Basset L, Biondi A, et al. The SIOPE strategic plan: A European cancer plan for children and adolescents. *J Cancer Policy*. 2016 Jun;8:17–32.
11. Steliarova-Foucher E, Stiller C, Lacour B, Kaatsch P. International Classification of Childhood Cancer, third edition. *Cancer*. 2005 Apr 1;103(7):1457–67.
12. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, Moreno F, Dolya A, Bray F, et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *Lancet Oncol*. 2017 Jun;18(6):719–31.
13. Stiller C. Epidemiology of Pediatric Cancer. In: Pediatric Surgical Oncology. First Edition. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2022. p. 3–9.
14. Segura MF, Soriano A, Roma J, Piskareva O, Jiménez C, Boloix A, et al. Methodological advances in the discovery of novel neuroblastoma therapeutics. *Expert Opin Drug Discov*. 2021 Nov 22;1–13.
15. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021 Jan;71(1):7–33.
16. von Allmen D. Pediatric surgical oncology: A brief overview of where we have been and the challenges we face. *Semin Pediatr Surg*. 2019 Dec;28(6):150864.

17. Nakayama DK, Bonasso PC. The History of Multimodal Treatment of Wilms' Tumor. *Am Surg.* 2016 Jun;82(6):487–92.
18. The widening knowledge base required for pediatric surgeons treating solid tumors. *Semin Pediatr Surg.* 2019 Dec;28(6):150866.
19. Alvarez E, Spunt SL, Malogolowkin M, Li Q, Wun T, Brunson A, et al. Treatment at Specialized Cancer Centers Is Associated with Improved Survival in Adolescent and Young Adults with Soft Tissue Sarcoma. *J Adolesc Young Adult Oncol.* 2021 Dec 15;
20. Gabra HO, Irtan S, Cross K, Lobos P, Froeba-Pohl A, Pio L, et al. Minimally invasive surgery for neuroblastic tumours: A SIOPEN multicentre study: Proposal for guidelines. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol.* 2022 Jan;48(1):283–91.
21. UMBRELLA PROTOCOL SIOP-RTSG 2016. EudraCT number: 2016-004180-39. 2017.
22. Towbin AJ, Meyers RL, Woodley H, Miyazaki O, Weldon CB, Morland B, et al. 2017 PRETEXT: radiologic staging system for primary hepatic malignancies of childhood revised for the Paediatric Hepatic International Tumour Trial (PHITT). *Pediatr Radiol.* 2018 Apr;48(4):536–54.
23. Otte JB, Pritchard J, Aronson DC, Brown J, Czauderna P, Maibach R, et al. Liver transplantation for hepatoblastoma: results from the International Society of Pediatric Oncology (SIOP) study SIOPEL-1 and review of the world experience. *Pediatr Blood Cancer.* 2004 Jan;42(1):74–83.
24. Gatta G, Botta L, Rossi S, Aareleid T, Bielska-Lasota M, Clavel J, et al. Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: results of EUROCARE-5--a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014 Jan;15(1):35–47.
25. Carceller F, Bautista FJ, Jiménez I, Hladun-Álvaro R, Giraud C, Bergamaschi L, et al. Prognostic factors of overall survival in children and adolescents enrolled in dose-finding trials in Europe: An Innovative Therapies for Children with Cancer study. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2016 Nov;67:130–40.
26. Garaventa A, Poetschger U, Valteau-Couanet D, Luksch R, Castel V, Elliott M, et al. Randomized Trial of Two Induction Therapy Regimens for High-Risk Neuroblastoma: HR-NBL1.5 International Society of Pediatric Oncology European Neuroblastoma Group Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2021 Aug 10;39(23):2552–63.
27. Lau LMS, Mayoh C, Xie J, Barahona P, MacKenzie KL, Wong M, et al. In vitro and in vivo drug screens of tumor cells identify novel therapies for high-risk child cancer. *EMBO Mol Med.* 2022 Apr 7;14(4):e14608.
28. Moreno L, Pearson ADJ, Paoletti X, Jimenez I, Geoerger B, Kearns PR, et al. Early phase clinical trials of anticancer agents in children and adolescents - an ITCC perspective. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017 Aug;14(8):497–507.
29. Enault M, Minard-Colin V, Corradini N, Leverger G, Thebaud E, Rome A, et al. Extracranial rhabdoid tumours: Results of a SFCE series of patients treated with a dose compression strategy according to European Paediatric Soft tissue sarcoma Study Group recommendations. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2022 Jan;161:64–78.

30. Botta L, Gatta G, Capocaccia R, Stiller C, Cañete A, Dal Maso L, et al. Long-term survival and cure fraction estimates for childhood cancer in Europe (EUROCARE-6): results from a population-based study. *Lancet Oncol.* 2022 Dec;23(12):1525–36.
31. Vassal G, de Rojas T, Pearson ADJ. Impact of the EU Paediatric Medicine Regulation on new anti-cancer medicines for the treatment of children and adolescents. *Lancet Child Adolesc Health.* 2023 Jan 19;S2352-4642(22)00344-3.
32. Mak IW, Evaniew N, Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res.* 2014;6(2):114–8.
33. X M, Y L, Lb A, Mn E, C G, X Z, et al. Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours. *Nature* [Internet]. 2018 Mar 15 [cited 2023 Feb 22];555(7696). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29489755/>
34. Langenberg KPS, Looze EJ, Molenaar JJ. The Landscape of Pediatric Precision Oncology: Program Design, Actionable Alterations, and Clinical Trial Development. *Cancers.* 2021 Aug 27;13(17):4324.
35. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med.* 2018 Feb 22;378(8):731–9.
36. Hargrave DR, Bouffet E, Tabori U, Broniscer A, Cohen KJ, Hansford JR, et al. Efficacy and Safety of Dabrafenib in Pediatric Patients with BRAF V600 Mutation-Positive Relapsed or Refractory Low-Grade Glioma: Results from a Phase I/Ia Study. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2019 Dec 15;25(24):7303–11.
37. Mossé YP, Lim MS, Voss SD, Wilner K, Ruffner K, Laliberte J, et al. Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. *Lancet Oncol.* 2013 May;14(6):472–80.
38. Ibarrola-Villava M, Cervantes A, Bardelli A. Preclinical models for precision oncology. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2018 Dec;1870(2):239–46.
39. Fazio M, Zon LI. Fishing for answers in precision cancer medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Sep 26;114(39):10306–8.
40. Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2003 Sep 15;9(11):4227–39.
41. Peterson JK, Houghton PJ. Integrating pharmacology and in vivo cancer models in preclinical and clinical drug development. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2004 Apr;40(6):837–44.
42. Townsend EC, Murakami MA, Christodoulou A, Christie AL, Köster J, DeSouza TA, et al. The Public Repository of Xenografts Enables Discovery and Randomized Phase II-like Trials in Mice. *Cancer Cell.* 2016 Apr 11;29(4):574–86.

43. Abaan OD, Polley EC, Davis SR, Zhu YJ, Bilke S, Walker RL, et al. The exomes of the NCI-60 panel: a genomic resource for cancer biology and systems pharmacology. *Cancer Res.* 2013 Jul 15;73(14):4372–82.
44. Pauli C, Hopkins BD, Prandi D, Shaw R, Fedrizzi T, Sboner A, et al. Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discov.* 2017 May;7(5):462–77.
45. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, Van Es JH, Van den Brink S, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology.* 2011 Nov;141(5):1762–72.
46. Bleijs M, van de Wetering M, Clevers H, Drost J. Xenograft and organoid model systems in cancer research. *EMBO J.* 2019 Aug 1;38(15):e101654.
47. Nolan JC, Frawley T, Tighe J, Soh H, Curtin C, Piskareva O. Preclinical models for neuroblastoma: Advances and challenges. *Cancer Lett.* 2020 Apr 1;474:53–62.
48. Fujii E, Kato A, Suzuki M. Patient-derived xenograft (PDX) models: characteristics and points to consider for the process of establishment. *J Toxicol Pathol.* 2020 Jul;33(3):153–60.
49. Toolan HW. Growth of human tumors in cortisone-treated laboratory animals: the possibility of obtaining permanently transplantable human tumors. *Cancer Res.* 1953 May;13(4–5):389–94.
50. Völkel P, Dupret B, Le Bourhis X, Angrand PO. [The zebrafish model in oncology]. *Med Sci MS.* 2018 Apr;34(4):345–53.
51. Fior R, Póvoa V, Mendes RV, Carvalho T, Gomes A, Figueiredo N, et al. Single-cell functional and chemosensitive profiling of combinatorial colorectal therapy in zebrafish xenografts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Sep 26;114(39):E8234–43.
52. Ali Z, Vildevall M, Rodriguez GV, Tandiono D, Vamvakaris I, Evangelou G, et al. Zebrafish patient-derived xenograft models predict lymph node involvement and treatment outcome in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2022 Feb 9;41(1):58.
53. McNerney KO, Teachey DT. Xenograft models for pediatric cancer therapies. *Fac Rev.* 2021;10:11.
54. Kalra J, Baker J, Song J, Kyle A, Minchinton A, Bally M. Inter-Metastatic Heterogeneity of Tumor Marker Expression and Microenvironment Architecture in a Preclinical Cancer Model. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 13;22(12):6336.
55. Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. *Nat Rev Cancer.* 2015 May;15(5):311–6.
56. Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012 Apr 17;9(6):338–50.

57. Byrne AT, Alférez DG, Amant F, Annibali D, Arribas J, Biankin AV, et al. Interrogating open issues in cancer precision medicine with patient-derived xenografts. *Nat Rev Cancer*. 2017 Apr;17(4):254–68.
58. Ambrogio C, Carmona FJ, Vidal A, Falcone M, Nieto P, Romero OA, et al. Modeling lung cancer evolution and preclinical response by orthotopic mouse allografts. *Cancer Res*. 2014 Nov 1;74(21):5978–88.
59. Stewart E, Federico SM, Chen X, Shelat AA, Bradley C, Gordon B, et al. Orthotopic patient-derived xenografts of paediatric solid tumours. *Nature*. 2017 Sep 7;549(7670):96–100.
60. Kearns PR, Vassal G, Ladenstein R, Schrappe M, Biondi A, Blanc P, et al. A European paediatric cancer mission: aspiration or reality? *Lancet Oncol*. 2019 Sep;20(9):1200–2.
61. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform*. 2009 Apr;42(2):377–81.
62. Harris PA, Taylor R, Minor BL, Elliott V, Fernandez M, O’Neal L, et al. The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners. *J Biomed Inform*. 2019 Jul;95:103208.
63. Vidal A, Muñoz C, Guillén MJ, Moretó J, Puertas S, Martínez-Iniesta M, et al. Lurbinectedin (PM01183), a new DNA minor groove binder, inhibits growth of orthotopic primary graft of cisplatin-resistant epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 Oct 1;18(19):5399–411.
64. Masanas M, Masiá N, Suárez-Cabrera L, Olivan M, Soriano A, Majem B, et al. The oral KIF11 inhibitor 4SC-205 exhibits antitumor activity and potentiates standard and targeted therapies in primary and metastatic neuroblastoma models. *Clin Transl Med*. 2021 Oct;11(10):e533.
65. Reyes G, Villanueva A, García C, Sancho FJ, Piulats J, Lluís F, et al. Orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas acquire genetic aberrations during dissemination in nude mice. *Cancer Res*. 1996 Dec 15;56(24):5713–9.
66. Carrillo-Reixach J, Torrens L, Simon-Coma M, Royo L, Domingo-Sàbat M, Abril-Fornaguera J, et al. Epigenetic footprint enables molecular risk stratification of hepatoblastoma with clinical implications. *J Hepatol*. 2020 Aug;73(2):328–41.
67. Alcon C, Martín F, Prada E, Mora J, Soriano A, Guillén G, et al. MEK and MCL-1 sequential inhibition synergize to enhance rhabdomyosarcoma treatment. *Cell Death Discov*. 2022 Apr 7;8(1):172.
68. Castellsagué J, Gel B, Fernández-Rodríguez J, Llatjós R, Blanco I, Benavente Y, et al. Comprehensive establishment and characterization of orthoxenograft mouse models of malignant peripheral nerve sheath tumors for personalized medicine. *EMBO Mol Med*. 2015 May;7(5):608–27.
69. Martinez-Martí A, Felip E, Matito J, Mereu E, Navarro A, Cedrés S, et al. Dual MET and ERBB inhibition overcomes intratumor plasticity in osimertinib-resistant-advanced non-

- small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017 Oct 1;28(10):2451–7.
70. Slater K, Hoo PS, Buckley AM, Piulats JM, Villanueva A, Portela A, et al. Evaluation of oncogenic cysteinyl leukotriene receptor 2 as a therapeutic target for uveal melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2018 Sep;37(2–3):335–45.
 71. Ruiz de Garibay G, Mateo F, Stradella A, Valdés-Mas R, Palomero L, Serra-Musach J, et al. Tumor xenograft modeling identifies an association between TCF4 loss and breast cancer chemoresistance. *Dis Model Mech*. 2018 May 18;11(5):dmm032292.
 72. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma Oxf Engl*. 2009 Jul 15;25(14):1754–60.
 73. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinforma Oxf Engl*. 2010 Mar 1;26(5):589–95.
 74. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinforma*. 2013;43(1110):11.10.1-11.10.33.
 75. Kim S, Scheffler K, Halpern AL, Bekritsky MA, Noh E, Källberg M, et al. Strelka2: fast and accurate calling of germline and somatic variants. *Nat Methods*. 2018 Aug;15(8):591–4.
 76. Lai Z, Markovets A, Ahdesmaki M, Chapman B, Hofmann O, McEwen R, et al. VarDict: a novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jun 20;44(11):e108.
 77. Benjamin D, Sato T, Cibulskis K, Getz G, Stewart C, Lichtenstein L. Calling Somatic SNVs and Indels with Mutect2 [Internet]. bioRxiv; 2019 [cited 2023 Mar 18]. p. 861054. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/861054v1>
 78. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res*. 2012 Mar;22(3):568–76.
 79. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012;6(2):80–92.
 80. Landrum MJ, Chitipiralla S, Brown GR, Chen C, Gu B, Hart J, et al. ClinVar: improvements to accessing data. *Nucleic Acids Res*. 2020 Jan 8;48(D1):D835–44.
 81. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D941–7.
 82. Boeva V, Popova T, Bleakley K, Chiche P, Cappo J, Schleiermacher G, et al. Control-FREEC: a tool for assessing copy number and allelic content using next-generation sequencing data. *Bioinforma Oxf Engl*. 2012 Feb 1;28(3):423–5.

83. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med.* 2017 Apr 19;9(1):34.
84. Tamborero D, Rubio-Perez C, Deu-Pons J, Schroeder MP, Vivancos A, Rovira A, et al. Cancer Genome Interpreter annotates the biological and clinical relevance of tumor alterations. *Genome Med.* 2018 Mar 28;10(1):25.
85. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinforma Oxf Engl.* 2019 Jun 1;35(11):1978–80.
86. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn JMD.* 2017 Jan;19(1):4–23.
87. Kluin RJC, Kemper K, Kuilman T, de Ruiter JR, Iyer V, Forment JV, et al. XenofiltreR: computational deconvolution of mouse and human reads in tumor xenograft sequence data. *BMC Bioinformatics.* 2018 Oct 4;19(1):366.
88. R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
89. Yates F. Contingency Tables Involving Small Numbers and the χ^2 Test. *Suppl J R Stat Soc.* 1934;1(2):217–35.
90. Hope ACA. A Simplified Monte Carlo Significance Test Procedure. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* 1968;30(3):582–98.
91. Taiyun Wei and Viliam Simko (2021). R package ‘corrplot’: Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.92). Available from <https://github.com/taiyun/corrplot>.
92. Jia D, Dong R, Jing Y, Xu D, Wang Q, Chen L, et al. Exome sequencing of hepatoblastoma reveals novel mutations and cancer genes in the Wnt pathway and ubiquitin ligase complex. *Hepatol Baltim Md.* 2014 Nov;60(5):1686–96.
93. Genovese G, Ghosh P, Li H, Rettino A, Sioletic S, Cittadini A, et al. The tumor suppressor HINT1 regulates MITF and β -catenin transcriptional activity in melanoma cells. *Cell Cycle Georget Tex.* 2012 Jun 1;11(11):2206–15.
94. Takahashi Y, Dungubat E, Kusano H, Ganbat D, Tomita Y, Odgerel S, et al. Application of Immunohistochemistry in the Pathological Diagnosis of Liver Tumors. *Int J Mol Sci.* 2021 May 28;22(11):5780.
95. Mossé YP, Deyell RJ, Berthold F, Nagakawara A, Ambros PF, Monclair T, et al. Neuroblastoma in older children, adolescents and young adults: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *Pediatr Blood Cancer.* 2014 Apr;61(4):627–35.

96. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med.* 1985 Oct 31;313(18):1111–6.
97. Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009 Jan 10;27(2):289–97.
98. Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet.* 2013 Mar;45(3):279–84.
99. Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature.* 2008 Oct 16;455(7215):930–5.
100. Bresler SC, Weiser DA, Huwe PJ, Park JH, Krytska K, Ryles H, et al. ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer Cell.* 2014 Nov 10;26(5):682–94.
101. Liu Z, Thiele CJ. ALK and MYCN: when two oncogenes are better than one. *Cancer Cell.* 2012 Mar 20;21(3):325–6.
102. Flahaut M, Mühlethaler-Mottet A, Martinet D, Fattet S, Bourloud KB, Auderset K, et al. Molecular cytogenetic characterization of doxorubicin-resistant neuroblastoma cell lines: Evidence that acquired multidrug resistance results from a unique large amplification of the 7q21 region. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006;45(5):495–508.
103. Genovese I, Ilari A, Assaraf YG, Fazi F, Colotti G. Not only P-glycoprotein: Amplification of the ABCB1-containing chromosome region 7q21 confers multidrug resistance upon cancer cells by coordinated overexpression of an assortment of resistance-related proteins. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother.* 2017 May;32:23–46.
104. Le Guezennec X, Bulavin DV. WIP1 phosphatase at the crossroads of cancer and aging. *Trends Biochem Sci.* 2010 Feb;35(2):109–14.
105. Milosevic J, Fransson S, Gulyas M, Gallo-Oller G, Olsen TK, Treis D, et al. PPM1D is a neuroblastoma oncogene and therapeutic target in childhood neural tumors [Internet]. bioRxiv; 2020 [cited 2023 Mar 14]. p. 2020.09.04.283648. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.09.04.283648v1>
106. Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F, et al. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science.* 1997 Jul 18;277(5324):333–8.
107. Eleveld TF, Oldridge DA, Bernard V, Koster J, Colmet Daage L, Diskin SJ, et al. Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations. *Nat Genet.* 2015 Aug;47(8):864–71.
108. Mlakar V, Jurkovic Mlakar S, Lopez G, Maris JM, Ansari M, Gumi-Pause F. 11q deletion in neuroblastoma: a review of biological and clinical implications. *Mol Cancer.* 2017 Jun 29;16(1):114.

109. E M, D W, J C, P W, G P, F P, et al. PAX3/FOXO1 fusion gene status is the key prognostic molecular marker in rhabdomyosarcoma and significantly improves current risk stratification. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol [Internet]*. 2012 Oct 5 [cited 2023 Mar 18];30(14). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22454413/>
110. Seki M, Nishimura R, Yoshida K, Shimamura T, Shiraishi Y, Sato Y, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nat Commun*. 2015 Jul 3;6:7557.
111. Roberts WM, Douglass EC, Peiper SC, Houghton PJ, Look AT. Amplification of the gli gene in childhood sarcomas. *Cancer Res*. 1989 Oct 1;49(19):5407–13.
112. Eaton KW, Tooke LS, Wainwright LM, Judkins AR, Biegel JA. Spectrum of SMARCB1/INI1 mutations in familial and sporadic rhabdoid tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Jan;56(1):7–15.
113. Mardinian K, Adashek JJ, Botta GP, Kato S, Kurzrock R. SMARCA4: Implications of an altered chromatin-remodeling gene for cancer development and therapy. *Mol Cancer Ther*. 2021 Oct 12;10.1158/1535-7163.MCT-21-0433.
114. Bulbul A, Fahy BN, Xiu J, Rashad S, Mustafa A, Husain H, et al. Desmoplastic Small Round Blue Cell Tumor: A Review of Treatment and Potential Therapeutic Genomic Alterations. *Sarcoma*. 2017;2017:1278268.
115. Laetsch TW, Roy A, Xu L, Black JO, Coffin CM, Chi YY, et al. Undifferentiated Sarcomas in Children Harbor Clinically Relevant Oncogenic Fusions and Gene Copy-Number Alterations: A Report from the Children's Oncology Group. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2018 Aug 15;24(16):3888–97.
116. Nacev BA, Sanchez-Vega F, Smith SA, Antonescu CR, Rosenbaum E, Shi H, et al. Clinical sequencing of soft tissue and bone sarcomas delineates diverse genomic landscapes and potential therapeutic targets. *Nat Commun*. 2022 Jun 15;13(1):3405.
117. Lockwood WW, Stack D, Morris T, Grehan D, O'Keane C, Stewart GL, et al. Cyclin E1 is amplified and overexpressed in osteosarcoma. *J Mol Diagn JMD*. 2011 May;13(3):289–96.
118. Carén H, Fransson S, Ejeskär K, Kogner P, Martinsson T. Genetic and epigenetic changes in the common 1p36 deletion in neuroblastoma tumours. *Br J Cancer*. 2007 Nov 19;97(10):1416–24.
119. Liu J, Cho SN, Wu SP, Jin N, Moghaddam SJ, Gilbert JL, et al. Mig-6 deficiency cooperates with oncogenic Kras to promote mouse lung tumorigenesis. *Lung Cancer Amst Neth*. 2017 Oct;112:47–56.
120. Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Gagliardi G, Swanson PE, Birnbaum EH, Fleshman JW, et al. Prognostic value of chromosome 1p allelic loss in colon cancer. *Gastroenterology*. 1997 Sep;113(3):761–6.
121. Zhang YW, Staal B, Su Y, Swiatek P, Zhao P, Cao B, et al. Evidence that MIG-6 is a tumor-suppressor gene. *Oncogene*. 2007 Jan 11;26(2):269–76.

122. Boulay G, Sandoval GJ, Riggi N, Iyer S, Buisson R, Naigles B, et al. Cancer-Specific Retargeting of BAF Complexes by a Prion-like Domain. *Cell*. 2017 Sep 21;171(1):163-178.e19.
123. Sachdeva UM, O'Brien JM. Understanding pRb: toward the necessary development of targeted treatments for retinoblastoma. *J Clin Invest*. 2012 Feb;122(2):425–34.
124. Cruz-Gálvez CC, Ordaz-Favila JC, Villar-Calvo VM, Cancino-Marentes ME, Bosch-Canto V. Retinoblastoma: Review and new insights. *Front Oncol*. 2022;12:963780.
125. Knutson SK, Warholic NM, Wigle TJ, Klaus CR, Allain CJ, Raimondi A, et al. Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 7;110(19):7922–7.
126. Kattner P, Strobel H, Khoshnevis N, Grunert M, Bartholomae S, Pruss M, et al. Compare and contrast: pediatric cancer versus adult malignancies. *Cancer Metastasis Rev*. 2019 Dec;38(4):673–82.
127. Fordham AM, Ekert PG, Fleuren EDG. Precision medicine and phosphoproteomics for the identification of novel targeted therapeutic avenues in sarcomas. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021 Dec;1876(2):188613.
128. He Q, Qu M, Bao H, Xu Y, Shen T, Tan D, et al. Multiple post-translational modifications ensure EGFR functionality: Potential therapeutic targets to overcome its drug-resistance mutations. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2023 Mar 15;S1359-6101(23)00013-8.
129. Rokita JL, Rathi KS, Cardenas MF, Upton KA, Jayaseelan J, Cross KL, et al. Genomic Profiling of Childhood Tumor Patient-Derived Xenograft Models to Enable Rational Clinical Trial Design. *Cell Rep*. 2019 Nov;29(6):1675-1689.e9.
130. Pandya PH, Jannu AJ, Bijangi-Vishehsaraei K, Dobrota E, Bailey BJ, Barghi F, et al. Integrative Multi-OMICs Identifies Therapeutic Response Biomarkers and Confirms Fidelity of Clinically Annotated, Serially Passaged Patient-Derived Xenografts Established from Primary and Metastatic Pediatric and AYA Solid Tumors. *Cancers*. 2022 Dec 30;15(1):259.
131. Yoshida GJ. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2020 Jan 7;13(1):4.
132. Blomme A, Van Simaeys G, Doumont G, Costanza B, Bellier J, Otaka Y, et al. Murine stroma adopts a human-like metabolic phenotype in the PDX model of colorectal cancer and liver metastases. *Oncogene*. 2018 Mar;37(9):1237–50.
133. Clohessy JG, Pandolfi PP. The Mouse Hospital and Its Integration in Ultra-Precision Approaches to Cancer Care. *Front Oncol*. 2018;8:340.
134. Houghton PJ, Morton CL, Tucker C, Payne D, Favours E, Cole C, et al. The pediatric preclinical testing program: description of models and early testing results. *Pediatr Blood Cancer*. 2007 Dec;49(7):928–40.

135. Braekeveldt N, Wigerup C, Gisselsson D, Mohlin S, Merselius M, Beckman S, et al. Neuroblastoma patient-derived orthotopic xenografts retain metastatic patterns and geno- and phenotypes of patient tumours. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E252-261.
136. Nicolle D, Fabre M, Simon-Coma M, Gorse A, Kappler R, Nonell L, et al. Patient-derived mouse xenografts from pediatric liver cancer predict tumor recurrence and advise clinical management: *Hepatology*, Vol. XX, No. X, 2016 Nicolle et al. *Hepatology*. 2016 Oct;64(4):1121–35.
137. Brabetz S, Leary SES, Gröbner SN, Nakamoto MW, Şeker-Cin H, Girard EJ, et al. A biobank of patient-derived pediatric brain tumor models. *Nat Med*. 2018 Nov;24(11):1752–61.
138. Ghilu S, Kurmasheva RT, Houghton PJ. Developing New Agents for Treatment of Childhood Cancer: Challenges and Opportunities for Preclinical Testing. *J Clin Med*. 2021 Apr 4;10(7):1504.
139. Cho SY. Patient-derived xenografts as compatible models for precision oncology. *Lab Anim Res*. 2020;36:14.
140. Moon HG, Oh K, Lee J, Lee M, Kim JY, Yoo TK, et al. Prognostic and functional importance of the engraftment-associated genes in the patient-derived xenograft models of triple-negative breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Nov;154(1):13–22.
141. Chen J, Jin Y, Li S, Qiao C, Peng X, Li Y, et al. Patient-Derived Xenografts Are a Reliable Preclinical Model for the Personalized Treatment of Epithelial Ovarian Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:744256.
142. Echeverria GV, Cai S, Tu Y, Shao J, Powell E, Redwood AB, et al. Predictors of success in establishing orthotopic patient-derived xenograft models of triple negative breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2023 Jan 10;9(1):2.
143. Magro G, Longo FR, Angelico G, Spadola S, Amore FF, Salvatorelli L. Immunohistochemistry as potential diagnostic pitfall in the most common solid tumors of children and adolescents. *Acta Histochem*. 2015 Jun;117(4–5):397–414.
144. Dudová Z, Conte N, Mason J, Stuchlík D, Peša R, Halmagyi C, et al. The EurOPDX Data Portal: an open platform for patient-derived cancer xenograft data sharing and visualization. *BMC Genomics*. 2022 Feb 22;23(1):156.
145. Nanni P, Landuzzi L, Manara MC, Righi A, Nicoletti G, Cristalli C, et al. Bone sarcoma patient-derived xenografts are faithful and stable preclinical models for molecular and therapeutic investigations. *Sci Rep*. 2019 Aug 21;9(1):12174.
146. John T, Kohler D, Pintilie M, Yanagawa N, Pham NA, Li M, et al. The ability to form primary tumor xenografts is predictive of increased risk of disease recurrence in early-stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011 Jan 1;17(1):134–41.
147. Castillo-Ecija H, Pascual-Pasto G, Perez-Jaume S, Resa-Pares C, Vila-Ubach M, Monterrubio C, et al. Prognostic value of patient-derived xenograft engraftment in pediatric sarcomas. *J Pathol Clin Res*. 2021 Jul;7(4):338–49.

148. NCT04625907. FaR-RMS: an Overarching Study for Children and Adults With Frontline and Relapsed RhabdoMyoSarcoma. <https://clinicaltrials.gov/show/NCT04625907> [Internet]. 2020 Nov 30 [cited 2023 Mar 14]; Available from: <https://www.cochranelibrary.com/es/central/doi/10.1002/central/CN-02197471/full>
149. Pappo AS, Dirksen U. Rhabdomyosarcoma, Ewing Sarcoma, and Other Round Cell Sarcomas. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2018 Jan 10;36(2):168–79.
150. Gasparini P, Casanova M, Centonze G, Borzi C, Bergamaschi L, Collini P, et al. Establishment of 6 pediatric rhabdomyosarcoma patient's derived xenograft models closely recapitulating patients' tumor characteristics. *Tumori.* 2022 Sep 16;3008916221110266.
151. Zarzosa P, Garcia-Gilabert L, Hladun R, Guillén G, Gallo-Oller G, Pons G, et al. Targeting the Hedgehog Pathway in Rhabdomyosarcoma. *Cancers.* 2023 Jan 24;15(3):727.
152. Olanich ME, Sun W, Hewitt SM, Abdullaev Z, Pack SD, Barr FG. CDK4 Amplification Reduces Sensitivity to CDK4/6 Inhibition in Fusion-Positive Rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2015 Nov 1;21(21):4947–59.
153. Hettmer S, Linardic CM, Kelsey A, Rudzinski ER, Vokuhl C, Selfe J, et al. Molecular testing of rhabdomyosarcoma in clinical trials to improve risk stratification and outcome: A consensus view from European paediatric Soft tissue sarcoma Study Group, Children's Oncology Group and Cooperative Weichteilsarkom-Studiengruppe. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2022 Sep;172:367–86.
154. Nemes K, Johann PD, Tüchert S, Melchior P, Vokuhl C, Siebert R, et al. Current and Emerging Therapeutic Approaches for Extracranial Malignant Rhabdoid Tumors. *Cancer Manag Res.* 2022;14:479–98.
155. Sasaki M, Ogiwara H. Synthetic lethal therapy based on targeting the vulnerability of SWI/SNF chromatin remodeling complex-deficient cancers. *Cancer Sci.* 2020 Mar;111(3):774–82.
156. Philippe-Chomette P, Kabbara N, Andre N, Pierron G, Coulomb A, Laurence V, et al. Desmoplastic small round cell tumors with EWS-WT1 fusion transcript in children and young adults. *Pediatr Blood Cancer.* 2012 Jun;58(6):891–7.
157. Scheer M, Vokuhl C, Blank B, Hallmen E, von Kalle T, Münter M, et al. Desmoplastic small round cell tumors: Multimodality treatment and new risk factors. *Cancer Med.* 2019 Feb;8(2):527–42.
158. Slotkin EK, Bowman AS, Levine MF, Dela Cruz F, Coutinho DF, Sanchez GI, et al. Comprehensive Molecular Profiling of Desmoplastic Small Round Cell Tumor. *Mol Cancer Res MCR.* 2021 Jul;19(7):1146–55.
159. Mello CA, Campos FAB, Santos TG, Silva MLG, Torrezan GT, Costa FD, et al. Desmoplastic Small Round Cell Tumor: A Review of Main Molecular Abnormalities and Emerging Therapy. *Cancers.* 2021 Jan 28;13(3):498.
160. Smith RS, Odintsov I, Liu Z, Lui AJW, Hayashi T, Vojnic M, et al. Novel patient-derived models of desmoplastic small round cell tumor confirm a targetable dependency on ERBB signaling. *Dis Model Mech.* 2022 Jan 1;15(1):dmm047621.

161. van Erp AEM, van Houdt L, Hillebrandt-Roeffen MHS, van Bree NFHN, Flucke UE, Mentzel T, et al. Olaparib and temozolomide in desmoplastic small round cell tumors: a promising combination in vitro and in vivo. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2020 Jul;146(7):1659–70.
162. Sbaraglia M, Bellan E, Dei Tos AP. The 2020 WHO Classification of Soft Tissue Tumours: news and perspectives. *Pathologica.* 2020 Nov 3;113(2):70–84.
163. Hassan A, Pestana RC, Parkes A. Systemic Options for Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Curr Treat Options Oncol.* 2021 Feb 27;22(4):33.
164. Isakoff MS, Bielack SS, Meltzer P, Gorlick R. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success. *J Clin Oncol.* 2015 Sep 20;33(27):3029–35.
165. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int J Cancer.* 2009 Jul 1;125(1):229–34.
166. Morrow JJ, Khanna C. Osteosarcoma Genetics and Epigenetics: Emerging Biology and Candidate Therapies. *Crit Rev Oncog.* 2015;20(3–4):173–97.
167. Sayles LC, Breese MR, Koehne AL, Leung SG, Lee AG, Liu HY, et al. Genome-Informed Targeted Therapy for Osteosarcoma. *Cancer Discov.* 2019 Jan;9(1):46–63.
168. Tirode F, Surdez D, Ma X, Parker M, Le Deley MC, Bahrami A, et al. Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations. *Cancer Discov.* 2014 Nov;4(11):1342–53.
169. Crompton BD, Stewart C, Taylor-Weiner A, Alexe G, Kurek KC, Calicchio ML, et al. The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer Discov.* 2014 Nov;4(11):1326–41.
170. Mondal G, Stevers M, Goode B, Ashworth A, Solomon DA. A requirement for STAG2 in replication fork progression creates a targetable synthetic lethality in cohesin-mutant cancers. *Nat Commun.* 2019 Apr 11;10(1):1686.
171. Ogura K, Elkrief A, Bowman AS, Koche RP, de Stanchina E, Benayed R, et al. Prospective Clinical Genomic Profiling of Ewing Sarcoma: ERF and FGFR1 Mutations as Recurrent Secondary Alterations of Potential Biologic and Therapeutic Relevance. *JCO Precis Oncol.* 2022 Aug;6:e2200048.
172. Riggi N, Suvà ML, Stamenkovic I. Ewing's Sarcoma. *N Engl J Med.* 2021 Jan 14;384(2):154–64.
173. Alberti L, Carniti C, Miranda C, Roccato E, Pierotti MA. RET and NTRK1 proto-oncogenes in human diseases. *J Cell Physiol.* 2003 May;195(2):168–86.
174. Garrido P, Hladun R, de Álava E, Álvarez R, Bautista F, López-Ríos F, et al. Multidisciplinary consensus on optimising the detection of NTRK gene alterations in tumours. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex.* 2021 Aug;23(8):1529–41.

175. Calandrini C, Schutgens F, Oka R, Margaritis T, Candelli T, Mathijsen L, et al. An organoid biobank for childhood kidney cancers that captures disease and tissue heterogeneity. *Nat Commun.* 2020 Mar 11;11(1):1310.
176. Spreafico F, Pritchard Jones K, Malogolowkin MH, Bergeron C, Hale J, de Kraker J, et al. Treatment of relapsed Wilms tumors: lessons learned. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009 Dec;9(12):1807–15.
177. Rakheja D, Chen KS, Liu Y, Shukla AA, Schmid V, Chang TC, et al. Somatic mutations in DROSHA and DICER1 impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours. *Nat Commun.* 2014 Sep 5;2:4802.
178. Wegert J, Ishaque N, Vardapour R, Geörg C, Gu Z, Bieg M, et al. Mutations in the SIX1/2 pathway and the DROSHA/DGCR8 miRNA microprocessor complex underlie high-risk blastemal type Wilms tumors. *Cancer Cell.* 2015 Feb 9;27(2):298–311.
179. Torrezan GT, Ferreira EN, Nakahata AM, Barros BDF, Castro MTM, Correa BR, et al. Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. *Nat Commun.* 2014 Jun 9;5:4039.
180. Walz AL, Ooms A, Gadd S, Gerhard DS, Smith MA, Guidry Auvil JM, et al. Recurrent DGCR8, DROSHA, and SIX homeodomain mutations in favorable histology Wilms tumors. *Cancer Cell.* 2015 Feb 9;27(2):286–97.
181. Gadd S, Huff V, Walz AL, Ooms AHAG, Armstrong AE, Gerhard DS, et al. A Children’s Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor. *Nat Genet.* 2017 Oct;49(10):1487–94.
182. Zsiros J, Brugieres L, Brock P, Roebuck D, Maibach R, Zimmermann A, et al. Dose-dense cisplatin-based chemotherapy and surgery for children with high-risk hepatoblastoma (SIOPEL-4): a prospective, single-arm, feasibility study. *Lancet Oncol.* 2013 Aug;14(9):834–42.
183. Nagae G, Yamamoto S, Fujita M, Fujita T, Nonaka A, Umeda T, et al. Genetic and epigenetic basis of hepatoblastoma diversity. *Nat Commun.* 2021 Sep 20;12(1):5423.
184. Prochownik EV. Reconciling the Biological and Transcriptional Variability of Hepatoblastoma with Its Mutational Uniformity. *Cancers.* 2021 Apr 21;13(9):1996.
185. Pearson AD, Stegmaier K, Bourdeaut F, Reaman G, Heenen D, Meyers ML, et al. Paediatric Strategy Forum for medicinal product development of epigenetic modifiers for children: ACCELERATE in collaboration with the European Medicines Agency with participation of the Food and Drug Administration. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2020 Nov;139:135–48.
186. Murawski M, Weeda VB, Maibach R, Morland B, Roebuck DJ, Zimmerman A, et al. Hepatocellular Carcinoma in Children: Does Modified Platinum- and Doxorubicin-Based Chemotherapy Increase Tumor Resectability and Change Outcome? Lessons Learned From the SIOPEL 2 and 3 Studies. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2016 Apr 1;34(10):1050–6.

187. Zhuo J, Lu D, Wang J, Lian Z, Zhang J, Li H, et al. Molecular phenotypes reveal heterogeneous engraftments of patient-derived hepatocellular carcinoma xenografts. *Chin J Cancer Res Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu.* 2021 Aug 31;33(4):470–9.
188. Tucker ER, Poon E, Chesler L. Targeting MYCN and ALK in resistant and relapsing neuroblastoma. *Cancer Drug Resist Alhambra Calif.* 2019;2(3):803–12.
189. Ogasawara S, Kiyota Y, Chuman Y, Kowata A, Yoshimura F, Tanino K, et al. Novel inhibitors targeting PPM1D phosphatase potently suppress cancer cell proliferation. *Bioorg Med Chem.* 2015 Oct 1;23(19):6246–9.
190. Berlanga P, Pasqualini C, Pötschger U, Sangüesa C, Castellani MR, Cañete A, et al. Central nervous system relapse in high-risk stage 4 neuroblastoma: The HR-NBL1/SIOPEN trial experience. *Eur J Cancer.* 2021 Feb 1;144:1–8.
191. Cassoux N, Thuleau A, Assayag F, Aerts I, Decaudin D. Establishment of an Orthotopic Xenograft Mice Model of Retinoblastoma Suitable for Preclinical Testing. *Ocul Oncol Pathol.* 2015 Apr;1(3):200–6.
192. Lemaitre S, Poyer F, Marco S, Fréneaux P, Doz F, Aerts I, et al. Looking for the Most Suitable Orthotopic Retinoblastoma Mouse Model in Order to Characterize the Tumoral Development. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017 Jun 1;58(7):3055–64.
193. Dt J, N J, M K, T Z, B H, M S, et al. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature [Internet].* 2012 Feb 8 [cited 2023 Mar 17];488(7409). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22832583/>
194. Tc A, El M, Sl P. Medulloblastoma: Molecular Classification-Based Personal Therapeutics. *Neurother J Am Soc Exp Neurother [Internet].* 2017 Apr [cited 2023 Mar 17];14(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28386677/>
195. Mf R, Jl S. Modeling pediatric medulloblastoma. *Brain Pathol Zurich Switz [Internet].* 2020 May [cited 2023 Mar 17];30(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31788908/>
196. Forget A, Martignetti L, Puget S, Calzone L, Brabetz S, Picard D, et al. Aberrant ERBB4-SRC Signaling as a Hallmark of Group 4 Medulloblastoma Revealed by Integrative Phosphoproteomic Profiling. *Cancer Cell.* 2018 Sep 10;34(3):379–395.e7.
197. Shiraishi R, Kawauchi D. Epigenetic regulation in medulloblastoma pathogenesis revealed by genetically engineered mouse models. *Cancer Sci.* 2021 Aug;112(8):2948–57.
198. Billmire DF. Malignant germ cell tumors in childhood. *Semin Pediatr Surg.* 2006 Feb;15(1):30–6.
199. Luo M, He Y, Xie B, Li S, Gan F, Zhang S, et al. Establishment and characterization of an ovarian yolk sac tumor patient-derived xenograft model. *Pediatr Surg Int.* 2021 Aug;37(8):1031–40.
200. Isonishi S. Experimental endocrinotherapy with tamoxifen of human ovarian dysgerminoma transplanted into nude mice. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 1987 Dec;39(12):2185–92.

201. Ochiai K, Isonishi S, Hirama Y, Yasuda M, Terashima Y. Effect of estrogen and progesterone on the growth of human ovarian dysgerminoma heterotransplanted to athymic nude mice. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol*. 1991 Jun;17(2):147–58.
202. Braekeveldt N, Bexell D. Patient-derived xenografts as preclinical neuroblastoma models. *Cell Tissue Res*. 2018 May;372(2):233–43.
203. Lo YC, Liu Y, Kammergaard M, Koladiya A, Keyes TJ, Davis KL. Single-cell technologies uncover intra-tumor heterogeneity in childhood cancers. *Semin Immunopathol*. 2023 Jan;45(1):61–9.
204. Murphy B, Yin H, Maris JM, Kolb EA, Gorlick R, Reynolds CP, et al. Evaluation of Alternative In Vivo Drug Screening Methodology: A Single Mouse Analysis. *Cancer Res*. 2016 Oct 1;76(19):5798–809.
205. Vassal G, Houghton PJ, Pfister SM, Smith MA, Caron HN, Li XN, et al. International Consensus on Minimum Preclinical Testing Requirements for the Development of Innovative Therapies For Children and Adolescents with Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2021 Aug;20(8):1462–8.

7. ANEXOS

Índice de Anexos

Anexo	Descripción	Página
Anexo I	Formularios de recogida de datos del programa de PDOX COMIK (RedCap)	229
Anexo II	Artículos publicados que emplean los modelos PDOX de la tesis	232
Anexo III	Fichas individualizadas de la comparativa histológica	235
Anexo IV	Tabla resumen de las características de los 46 PDOX	278
Anexo V	Tabla modelos PDOX: Pacientes que recayeron o progresaron	284
Anexo VI	Tabla modelos PDOX: Pacientes que fallecieron	285

Anexo I. Formularios de recogida de datos del programa de PDOX COMIK (RedCap)

<p>Datos paciente</p> <p>Número de tumor _____</p> <p>Datos de Pacientes _____</p> <p>SAP _____</p> <p>Date of birth _____</p> <p>Date of surgery/biopsy _____</p> <p>Age at biopsy (months) _____</p> <p>Days since surgery _____</p> <p>Diagnosis _____</p> <p>Histology groups <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> NEUROBLASTOMA <input type="radio"/> NEPHROBLASTOMA <input type="radio"/> RHABDOMYOSARCOMA <input type="radio"/> OTHER STS <input type="radio"/> EWING'S SARCOMA <input type="radio"/> OS/CHONDROSARCOMA <input type="radio"/> OTHER BONE SARCOMAS <input type="radio"/> ADULT TYPE CARCINOMAS <input type="radio"/> GERMAL TUMORS <input type="radio"/> MRT <input type="radio"/> HEPATOBLASTOMA <input type="radio"/> HEPATOCELLULAR CARCINOMA <input type="radio"/> DSRCT <input type="radio"/> RETINOBLASTOMAS <input type="radio"/> BRAIN TUMORS <input type="radio"/> NEUROENDOCRINE TUMORS <input type="radio"/> OTHERS </p> <p>Specify others _____</p> <p>Observations _____</p> <p>Síndrome u otra patología asociada relevante _____</p> <p>Situación clínica al Dx _____</p>	<p>Programa COMIK de Medicina Personalizada en Cáncer del Niño y el Adolescente Page 1</p> <p>Riesgo al Dx <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> Bajo <input type="radio"/> Intermedio /Estandar <input type="radio"/> Alto <input type="radio"/> Muy alto </p> <p>Situación clínica en el momento de la biopsia _____</p> <p>Risk group en momento de la biopsia <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> Bajo <input type="radio"/> Intermedio /Estandar <input type="radio"/> Alto <input type="radio"/> Muy alto </p> <p>Servicio obtención de la muestra/Centro de procedencia <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> Anatomía Patológica/Vall d'Hebron <input type="radio"/> Cirugía Oncológica/Vall d'Hebron <input type="radio"/> Neurocirugía pediátrica/Vall d'Hebron <input type="radio"/> Oftalmología/Vall d'Hebron <input type="radio"/> Radiología Pediátrica/Vall d'Hebron <input type="radio"/> Traumatología/Vall d'Hebron <input type="radio"/> Otros Centros <input type="radio"/> Otros Servicios Vall d'Hebron </p> <p>Primary/Metastasis <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> Primario <input type="radio"/> Metástasis <input type="radio"/> Primario/Metástasis </p> <p>Location <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> MEDIASTINO <input type="radio"/> RIÑON <input type="radio"/> MUSCULO <input type="radio"/> PRÓSTATA <input type="radio"/> HUESO <input type="radio"/> PARAVERTERBAL <input type="radio"/> GONADAS <input type="radio"/> CERVELL <input type="radio"/> PULMON <input type="radio"/> HIGADO <input type="radio"/> PIEL <input type="radio"/> GANGLIO <input type="radio"/> BRA <input type="radio"/> RETROPERITONEO <input type="radio"/> PELVIS <input type="radio"/> SNC <input type="radio"/> TIROIDES <input type="radio"/> ÓBITA <input type="radio"/> VEJIGA <input type="radio"/> DIAPRAGMA <input type="radio"/> TIMO <input type="radio"/> OTROS </p> <p>Specify other location _____</p> <p>Biopsy at diagnosis <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No </p> <p>Treatment <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> pre-treatment <input type="radio"/> Post-treatment </p> <p>Relapse <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No </p>		
<small>19/03/2023 1:07pm</small>	<small>projectedcap.org REDCap®</small>	<small>19/03/2023 1:07pm</small>	<small>projectedcap.org REDCap®</small>
<small>Page 3</small>		<small>Page 4</small>	
<p>Refractory <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No </p> <p>Progressive <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No </p> <p>Type of sample <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> TRUCUT <input type="radio"/> PIECEMEAL BIOPSY <input type="radio"/> RESECTION </p> <p>If surgical biopsy, OPEN or MINIMALLY INVASIVE? <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> OPEN <input type="radio"/> MINIMALLY INVASIVE </p> <p>TRUCUT G/cm _____</p> <p>Biopsy ID _____</p> <p>AP(observations) _____</p> <p>Necrosis (%) _____</p> <p>Ki67 _____</p> <p>TUMOR CONTENT (%) _____</p> <p>Material received _____</p> <p>Frozen material _____</p> <p>Other sample/Armengol _____</p> <p>Histology _____</p> <p>PDX Implantation <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No </p> <p>Material for implantation _____</p> <p>Type of sample <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> TRUCUT <input type="radio"/> PIECE </p> <p>Culture Medium <ul style="list-style-type: none"> <input type="radio"/> DMEM sin FBS <input type="radio"/> IMDM 20% FBS <input type="radio"/> Suero paciente </p>			
<small>19/03/2023 1:07pm</small>		<small>projectedcap.org REDCap®</small>	

Histology

Número de tumor _____

Histology _____

Biopsy ID _____

Número de laminillas _____

Laminillas HE 1 (Paciente/Ratón) _____

Laminillas HE 2 (Paciente/Ratón) _____

Laminillas HE 3 (Paciente/Ratón) _____

Laminillas HE 4 (Paciente/Ratón) _____

Laminillas HE 5 (Paciente/Ratón) _____

Histology group [histology_group] _____

Histology diagnosis _____

Histology pdx _____

Necrosis (%) _____

Ki67 (%) _____

Location PDX (se refiere a la localización del tumor en la necropsia, no a lo que se observa en la laminilla) _____

Metastasis PDX Yes No _____

Sites of metastasis (if possible) _____

Metastatic pattern similar to the patient's? No Yes Not applicable

Patient Histology _____

Growth pattern Infiltrative Expansive

Citomorphology Round Spindle cell Other: _____

Please specify other _____

Cellular Density Low Moderate High

Pleomorphism Yes No

Mitosis per 10 fields (number) _____

In neuroblastomas, MKI (number) _____

Necrosis(%) _____

Immunohistochemistry Positive Negative

Pattern Local Diffuse

Intensity Weak Moderate Strong

PDX Histology _____

Growth pattern Infiltrative Expansive

Citomorphology Round Spindle cell Other: _____

Please specify other _____

19/03/2023 1:07pm

projectedcap.org REDCap®

19/03/2023 1:07pm

projectedcap.org REDCap®

Cellular Density High Moderate Low

Pleomorphism Yes No

Mitosis per field (number) _____

In neuroblastomas, MKI (number) _____

Necrosis(%) _____

Immunohistochemistry Positive Negative

Pattern Local Diffuse

Intensity Weak Moderate Strong

Concordance

A) Cell Line (based on immunohistochemistry)
Is there concordance with the patient's IHC? Yes No

B) Morphology Yes No

c) Architecture Concordant Discordant

CLINICAL DATA (RELEVANT) _____

Observations Histology _____

19/03/2023 1:07pm

projectedcap.org REDCap®

Modelos Pdx

Programa COMIK de Medicina Personalizada en Cáncer del Niño y el Adolescente
Page 1

Número de tumor _____

DATOS IDENTIFICATIVOS

SAP: [sap]
PATIENTS HISTOLOGY: [histology_group]

ORGAN OF ORIGIN _____

ORTHOTOPIC IMPLANT Yes No

LOCATION _____

SUCCESSFUL PDX Yes No

SUBCUTANEOUS IMPLANT (Y/N) Yes No

SUCCEFUL SUBCUTANEOUS PDX Yes No

Time to tumour growth (days) _____

PDX SAME CASE
(Enter 'T' number) _____

NOTAS _____

DATOS BÁSICOS ANIMALES

MICE TYPE (STRAIN)
 Athymic
 NSG
 Other (specify) _____

Number of Athymic _____

Number of NSG _____

Other Mice type _____

19/03/2023 1:07pm

projectedredcap.org REDCap®

N IMPLANTED MICE _____

N SUCESFUL IMPLANTS _____

TIME UNTIL TUMOR GROWTH 1 _____

TIME UNTIL TUMOR GROWTH 2 _____

TIME UNTIL TUMOR GROWTH 3 _____

TIME UNTIL TUMOR GROWTH 4 _____

TIME UNTIL TUMOR GROWTH 5 _____

MEAN TIME UNTIL TUMOR GROWTH _____

SD TIME UNTIL TUMOR GROWTH _____

PASS 3

N IMPLANTED MICE _____

N SUCESFUL IMPLANTS _____

TIME UNTIL TUMOR GROWTH 1 _____

TIME UNTIL TUMOR GROWTH 2 _____

TIME UNTIL TUMOR GROWTH 3 _____

TIME UNTIL TUMOR GROWTH 4 _____

TIME UNTIL TUMOR GROWTH 5 _____

MEAN TIME UNTIL TUMOR GROWTH _____

SD TIME UNTIL TUMOR GROWTH _____

19/03/2023 1:07pm

projectedredcap.org REDCap®

Page 2

AGE MICE (weeks) 5-7 Other

Please specify other _____

TIME FROM BIOPSY TO IMPLANT Same day
 Day after
 Other (specify) _____

SAMPLE TYPE Trucut
 Piece
 Other (specify) _____

IMPLANTACION/PASES

PASS 1

N IMPLANTED MICE _____

N SUCESFUL IMPLANTS _____

N SUCESFUL IMPLANTS ATHYMICS _____

N SUCESFUL IMPLANTS NSG _____

N SUCESFUL IMPLANTS _____

TIME UNTIL TUMOR GROWTH 1 _____

TIME UNTIL TUMOR GROWTH 2 _____

TIME UNTIL TUMOR GROWTH 3 _____

TIME UNTIL TUMOR GROWTH 4 _____

TIME UNTIL TUMOR GROWTH 5 _____

MEAN TIME UNTIL TUMOR GROWTH _____

SD TIME UNTIL TUMOR GROWTH _____

PASS 2

19/03/2023 1:07pm

projectedredcap.org REDCap®

Page 4

Any derived cellular line? Yes No

19/03/2023 1:07pm

projectedredcap.org REDCap®

Anexo II. Artículos publicados que emplean los modelos PDOX de la tesis.



www.nature.com/cddiscovery

ARTICLE OPEN

Check for updates

MEK and MCL-1 sequential inhibition synergize to enhance rhabdomyosarcoma treatment

Clara Alcon¹, Fernando Martín^{1,2}, Estela Prada^{1,4}, Jaume Mora³, Aroa Soriano^{1,5}, Gabriela Guillén^{1,6,7}, Soledad Gallego^{1,5}, Josep Roma^{1,5}, Josep Samitier^{1,2,7}, Alberto Villanueva^{1,8,9} and Joan Montero^{1,2,10}

© The Author(s) 2022

Targeted agents have emerged as promising molecules for cancer treatment, but most of them fail to achieve complete tumor regression or attain durable remissions due to tumor adaptations. We used dynamic BH3 profiling to identify targeted agents effectiveness and anti-apoptotic adaptations upon targeted treatment in rhabdomyosarcoma. We focused on studying the use of BH3 mimetics to specifically inhibit pro-survival BCL-2 family proteins, overwhelm resistance to therapy and prevent relapse. We observed that the MEK1/2 inhibitor trametinib rapidly depleted the pro-apoptotic protein NOXA, thus increasing MCL-1 availability. Indeed, we found that the MCL-1 inhibitor S63845 synergistically enhanced trametinib cytotoxicity in rhabdomyosarcoma cells *in vitro* and *in vivo*. In conclusion, our findings indicate that the combination of a BH3 mimetic targeting MCL-1 with trametinib improves efficiency on rhabdomyosarcoma by blocking tumor adaptation to treatment.

Cell Death Discovery (2022) 8:172; <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00959-w>

INTRODUCTION

Rhabdomyosarcoma (RMS) constitutes the most frequent form of soft tissue sarcoma during childhood, accounting for 5–8% of malignant tumors in children and adolescents [1–5]. RMS is classified based on histological characteristics into four different subtypes: embryonal (ERMS), alveolar (ARMS), spindle cell/sclerosing, and pleomorphic [5]. The two major subtypes are ARMS accounting for 20% and ERMS accounting for 60% of cases in children [1, 6]. ARMS commonly occurs in the extremities and has a high propensity for metastasis, while ERMS is more likely to present as localized disease in genitourinary or head/neck regions and have a better prognosis [6]. All risk-groups of RMS are treated with a multi-modal approach that includes chemotherapy, radiation, and surgery [7]. However, the cure rates for high-risk metastatic patients have not achieved significant progress in years [7]. RMS treatment continues to be based on combinations of conventional cytotoxic agents developed in the late 1960s [8] which are accompanied by therapy-related toxicities and a decrease in patients' quality of life [9]. Targeted therapies have gained interest in the past years as an approximation to increase survival and decrease secondary effects in RMS patients [2, 8, 10, 11] mainly due to a better understanding of genetic and molecular alterations in patients' tumors [1, 8, 10, 12]. Nevertheless, despite that targeted therapies have revolutionized treatment for some adult cancers [13] and pediatric hematological malignancies [14, 15], less significant progress has been

achieved in pediatric solid tumors. Regarding RMS, preclinical studies have reported increased cytotoxicity when combining different targeted therapies with conventional chemotherapy [12], since single targeted agents alone would not be sufficient to reach clinical efficacy due to acquired resistances to those treatments [12].

Evasion of apoptosis represents a common feature of cancer persister cells that become resistant to treatments, and can be partially mediated by an increased expression of anti-apoptotic proteins [16, 17]. Apoptosis is a type of programmed cell death controlled by the BCL-2 family of proteins [18]. Members of this family are classified based on their structure, BCL-2 homology domains, and function [18, 19]. Alterations in different BCL-2 family members have been reported in RMS patients [2], including the overexpression of the anti-apoptotic proteins BCL-2 and MCL-1 [20, 21]. This could be of special interest to develop new therapeutic strategies targeting these anti-apoptotic proteins to treat high-risk or relapsed RMS patients [17, 22]. BH3 mimetics, small molecule inhibitors that mimic the action of sensitizer BH3-only proteins and selectively inhibit anti-apoptotic BCL-2 family members, are currently being exploited to overcome apoptosis resistance [19]. The functional assay dynamic BH3 profiling (DBP) can determine in less than 24 h how effective a treatment will be to engage apoptosis and it also allows us to identify cancer cells' selective dependence on anti-apoptotic proteins to guide BH3 mimetics' use and overcome therapy-induced resistance

¹Institute for Biengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), 08028 Barcelona, Spain. ²Networking Biomedical Research Center in Biengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), 28029 Madrid, Spain. ³Developmental Tumor Biology Laboratory, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, 08950 Esplugues de Llobregat, Spain. ⁴Pediatric Cancer Center Barcelona (PCCB), Hospital Sant Joan de Déu Barcelona, 08950 Esplugues de Llobregat, Spain. ⁵Group of Translational Research in Child and Adolescent Cancer, Vall d'Hebron Research Institute (VHRI), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08035 Barcelona, Spain. ⁶Department of Surgery, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Barcelona, Spain. ⁷Department of Electronics and Biomedical Engineering, University of Barcelona (UB), 08028 Barcelona, Spain. ⁸Program against Cancer Therapeutic Resistance (ProCURE), DIBELL, Catalan Institute of Oncology, 08907 l'Hospitalet del Llobregat, Barcelona, Spain. ⁹Xenopat SL, Business Biobuilder, Bellvitge Health Science Campus, 08907 l'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. ¹⁰email: jmontero@ibecbarcelona.eu

Received: 4 November 2021 Revised: 18 February 2022 Accepted: 16 March 2022
Published online: 10 April 2022

Official journal of CDDpress

SPINGER NATURE

Artículo I. DOI: [10.1038/s41420-022-00959-w](https://doi.org/10.1038/s41420-022-00959-w) (open access)

The oral KIF11 inhibitor 4SC-205 exhibits antitumor activity and potentiates standard and targeted therapies in primary and metastatic neuroblastoma models

Dear Editor,

Neuroblastoma remains incurable for most patients with high-risk disease.¹ Perturbation of transcription factors (MYCN and PHOX2B), kinases (ALK, MEK), and cell cycle regulators (CDK4/6, CHECK1), among other factors, make neuroblastoma cells highly proliferative, which is associated with poor patient outcomes.^{2,3} To circumvent the limitations of the classical microtubule poisons such as vinca alkaloids used in the treatment of neuroblastoma,¹ we sought to explore alternative mitotic regulators as new therapeutic targets for high-risk neuroblastoma patients. One of these mitotic spindle-specific proteins is kinesin family member 11 (KIF11), also known as kinesin spindle protein, kinesin-5, or Eg5, which is essential for bipolar spindle formation and mitotic progression in human cells.⁴

Transcriptomic analyses showed that the expression of multiple kinesins, including *KIF11* was higher in the high-risk neuroblastoma compared with low- and intermediate-risk groups (Figures 1A and S1; Table S1). Overall survival was significantly poorer in patients with high *KIF11* expression (Figure 1B–D; Table S2). *KIF11* high expression was identified as an independent prognostic factor of survival, together with risk assessment (HR = 3.051; Table S3) and found to be higher in patients with amplification of MYCN, 1p36 loss, or 17q23 gain (Figure 1E). At the protein level, KIF11 expression was detected in the cytoplasm of neuroblastic cells (Figure 1F) and showed higher expression compared to low- or intermediate-risk neuroblastoma samples ($p < 0.05$) and in tumors with segmental chromosome alterations such as 1p36, 11q deletion, and gain of 17q23 (Table S4). Kaplan–Meier analysis confirmed that high KIF11 protein expression was associated with shorter event-free and overall survival (Figures 1G and H). While there is a positive correlation between *KIF11* and *MYCN* mRNA expression levels, *MYCN* is neither sufficient, nor necessary for KIF11 expression (Figure S2).

According to functional genomics, neuroblastoma cells seem to be one of the cell types that are more dependent on the expression of KIF11 for survival being particularly sensitive to its pharmacological inhibition.⁵ Concurring with these observations, the silencing of KIF11 caused a reduction in cell viability (Figure S3A–C) and a 3–4 fold reduction in the growth of established neuroblastoma subcutaneous xenografts (Figure 2A–C and S3D–R). KIF11 inhibitors have moved forward toward phase 1 and 2 clinical trials in adult tumors,^{6,7} with very limited development for childhood cancer. Herein, we provide a complete pre-clinical characterization of the potent and highly selective KIF11 inhibitor, 4SC-205 (Figure 2D), the first oral KIF11 inhibitor that has been evaluated in phase I clinical trials in adult patients (NCT01065025). Compared to other KIF11 inhibitors, 4SC-205 can be administrated daily, thus being able to hit the target in a more sustained manner. Neuroblastoma cells treated with 4SC-205 (Figure 2E; Table S5) displayed all the expected phenotypic features resulting from KIF11 inhibition such as the inability to form bipolar spindles (Figures 2F and S4A), cell cycle arrest during mitosis (Figure S4B–H), and induction of apoptosis (Figure S5), thereby confirming the high KIF11 specificity of this compound. While similar effects were observed in 3D spheroid cultures (Figure S6A–C), 4SC-205 did not affect the viability of differentiated cells (Figure S6D–G).

When used *in vivo*, 4SC-205 treated mice showed a remarkable shrinkage of the original SK-N-BE(2) subcutaneous xenograft (Figures 2G and 2H) or tumor growth delay in SK-N-AS xenografts (Figures 2I, 2K, and Figure S7). Increased phosphorylation of histone H3 and apoptotic hallmarks (i.e., processing of PARP) confirmed that the antitumor effect of 4SC-205 was comparable to that of genetic KIF11 silencing *in vivo* (Figures 2I,L). Transcriptomic analysis of the 4SC-205-treated tumors confirmed the expected genetic changes of arrested cells in mitosis

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
© 2021 The Authors. Clinical and Translational Medicine published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Shanghai Institute of Clinical Bioinformatics

ARTICLE

Open Access

Sequential combinations of chemotherapeutic agents with BH3 mimetics to treat rhabdomyosarcoma and avoid resistance

Clara Alcon¹, Albert Manzano-Muñoz¹, Estela Prada^{2,3}, Jaume Mora^{2,3}, Aroa Soriano⁴, Gabriela Guillén^{4,5}, Soledad Gallego⁴, Josep Roma⁴, Josep Samitier^{1,6,7}, Alberto Villanueva^{4,8,9} and Joan Montero¹

Abstract

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most common soft tissue sarcoma in childhood and adolescence. Refractory/relapsed RMS patients present a bad prognosis that combined with the lack of specific biomarkers impairs the development of new therapies. Here, we utilize dynamic BH3 profiling (DBP), a functional predictive biomarker that measures net changes in mitochondrial apoptotic signaling, to identify anti-apoptotic adaptations upon treatment. We employ this information to guide the use of BH3 mimetics to specifically inhibit BCL-2 pro-survival proteins, defeat resistance and avoid relapse. Indeed, we found that BH3 mimetics that selectively target anti-apoptotic BCL-xL and MCL-1, synergistically enhance the effect of clinically used chemotherapeutic agents vincristine and doxorubicin in RMS cells. We validated this strategy *in vivo* using a RMS patient-derived xenograft model and observed a reduction in tumor growth with a tendency to stabilization with the sequential combination of vincristine and the MCL-1 inhibitor S63845. We identified the molecular mechanism by which RMS cells acquire resistance to vincristine: an enhanced binding of BID and BAK to MCL-1 after drug exposure, which is suppressed by subsequently adding S63845. Our findings validate the use of DBP as a functional assay to predict treatment effectiveness in RMS and provide a rationale for combining BH3 mimetics with chemotherapeutic agents to avoid tumor resistance, improve treatment efficiency, and decrease undesired secondary effects.

Introduction

Rhabdomyosarcoma (RMS) is a highly malignant cancer that, despite being relatively rare, is the most frequent soft-tissue sarcoma in children, accounting for 5% of all pediatric tumors¹. RMS tumors are highly aggressive and typically develop from skeletal muscle cells, arising in a variety of anatomic sites in the body^{2,3}. There is a slightly higher prevalence of this disease in males than in females, and it is often associated with genetic disorders, such as Li-Fraumeni familiar cancer syndrome and

neurofibromatosis type 1². Based on histologic criteria, RMS tumors are subdivided into two main groups, embryonal (ERMS) and alveolar (ARMS). ERMS account for 60% of all RMS, affecting children under the age of 10, especially around the head and neck regions^{2,3}. ARMS represent ~20% of all RMS, occurring mostly in adolescents and frequently localized in the limbs^{3,4}. The current treatment strategies for RMS include chemotherapy, radiation, and surgery⁴. Despite treatment improvement for patients with low-risk and intermediate-risk disease, the survival rates for high-risk patients have not advanced in the past decades⁴. Furthermore, the derived toxicities from current treatments and the lack of biomarkers⁵, highlight the need for new therapies to enhance RMS clinical outcomes.

Correspondence: Joan Montero (jmontero@ibecbarcelona.eu)

¹Institut for Bioengineering of Catalonia (IBEC), Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), 08028 Barcelona, Spain

²Developmental Tumor Biology Laboratory, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, 08950 Esplugues de Llobregat, Spain

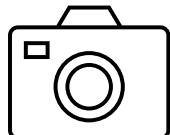
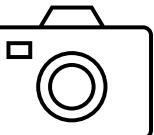
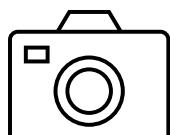
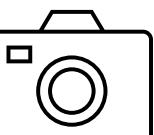
Full list of author information is available at the end of the article

Edited by C. Muñoz-Pinedo

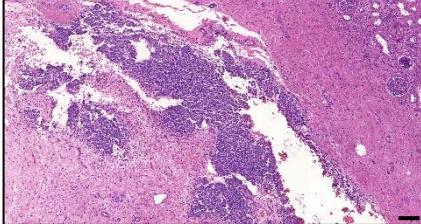
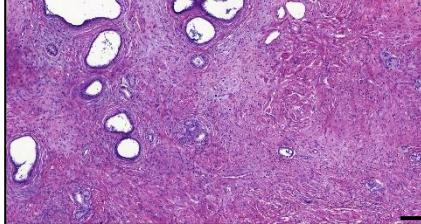
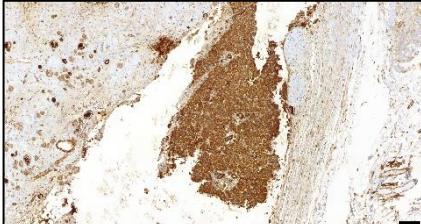
© The Author(s) 2020

 Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

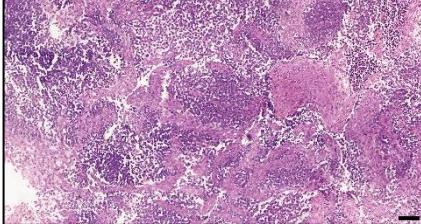
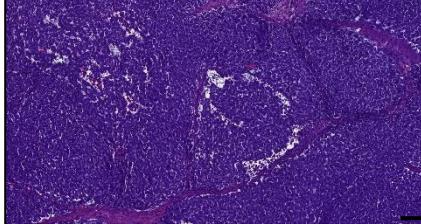
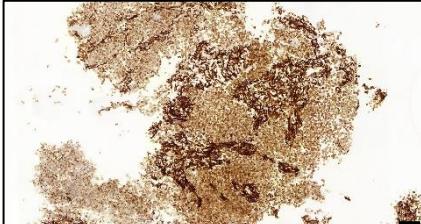
Anexo III. Fichas individualizadas de la comparativa histológica.

Código de PDOX	 PACIENTE	 PDOX
Histología		
H&E	Patrón de crecimiento	
	Citomorfología	
	Densidad celular	
	Pleomorfismo	
	Mitosis	
	Necrosis	
IHQ	Positiva / Negativa	
	Patrón	
	Intensidad	
H&E		
IHQ (*)		

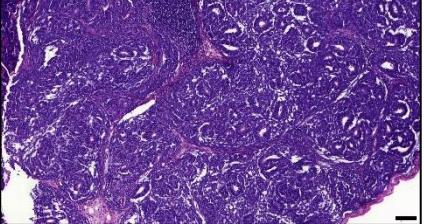
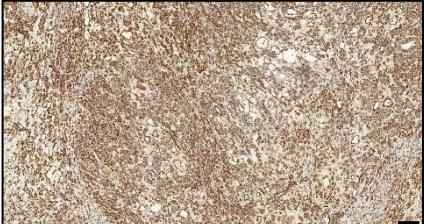
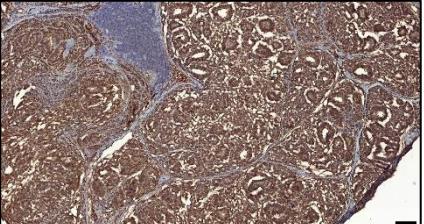
	Concordante
	No concordante
ND	No disponible

VH-PDOX-WT1	PACIENTE	PDOX
Histología	Nefroblastoma estromal (riñón izquierdo) y mixto (riñón derecho)	Nefroblastoma
E & H	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Blastema, estroma y epitelio
	Densidad celular	Baja
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	1
	Necrosis	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Local
	Intensidad	Fuerte
H&E		
IHQ (*)		ND

(*) Marcador IHQ utilizado: WT1

VH-PDOX-WT2	 PACIENTE	 PDOX	
Histología	Nefroblastoma blastematoso	Nefroblastoma	
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo	Infiltrativo
	Citomorfología	Redonda	Redonda
	Densidad celular	Alta	Alta
	Pleomorfismo	No	No
	Mitosis	26	34
	Necrosis	60%	50%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva	Positiva
	Patrón	Difuso	Difuso
	Intensidad	Moderada	Moderada
H&E			
IHQ (*)			

(*) Marcador IHQ utilizado: WT1

VH-PDOX-WT3	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Nefroblastoma mixto (epitelial, blastematoso y estromal)	Nefroblastoma
E & H	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Moderada
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	29
	Necrosis	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Moderada
H&E		
IHQ (*)		

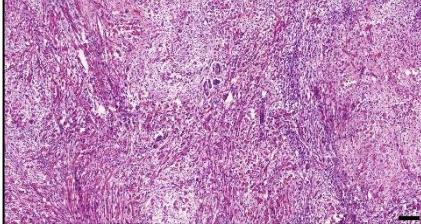
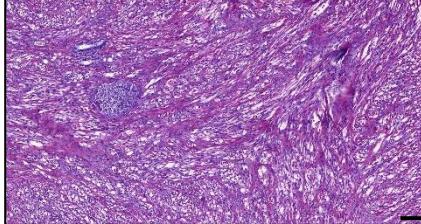
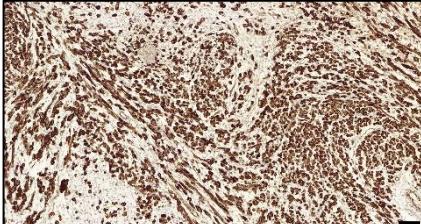
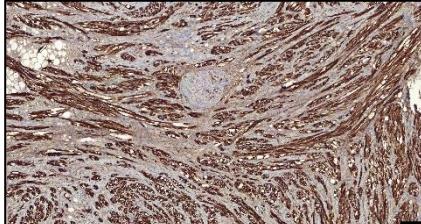
(*) Marcador IHQ utilizado: WT1

VH-PDOX-WT4	PACIENTE	PDOX
Histología	Nefroblastoma regresivo	Nefroblastoma tipo blastematoso
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Baja
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	0
	Necrosis	90%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Fuerte
H&E		
IHQ (*)		

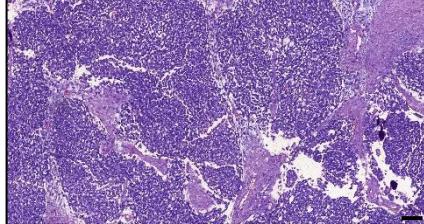
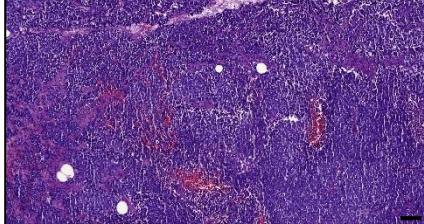
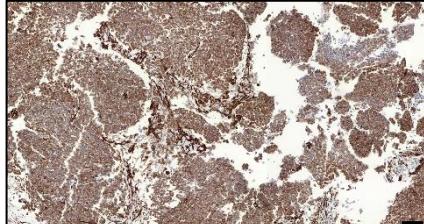
(*) Marcador IHQ utilizado: WT1

VH-PDOX-WT5	PACIENTE	PDOX
Histología	Nefroblastoma no anaplásico	Nefroblastoma
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Alta
	Pleomorfismo	Sí
	Mitosis	24
	Necrosis	1%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Fuerte
H&E		
IHQ (*)		

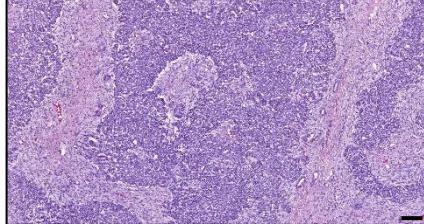
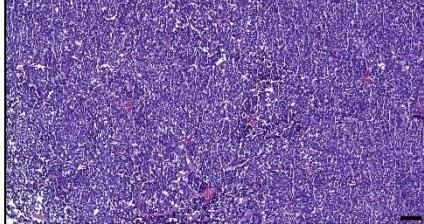
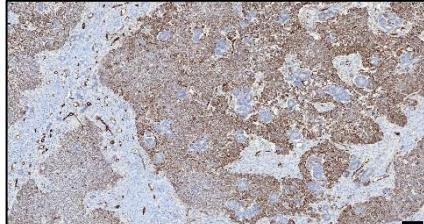
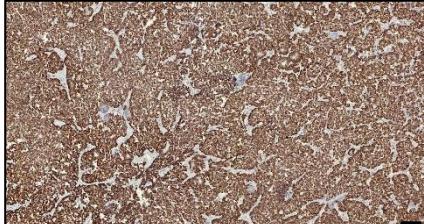
(*) Marcador IHQ utilizado: CD56

VH-PDOX-WT6	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Nefroblastoma mixto (estromal y epitelial)	Nefroblastoma
E & H	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Epitelial y fusiforme
	Densidad celular	Moderada
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	1
	Necrosis	30%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Fuerte
H&E		
IHQ (*)		

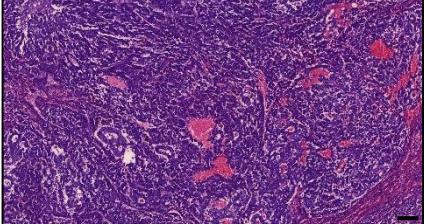
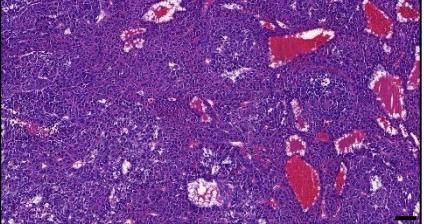
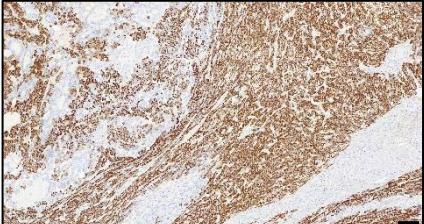
(*) Marcador IHQ utilizado: WT1

VH-PDOX-WT7	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Nefroblastoma blastematoso	Nefroblastoma
E & H	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Alta
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	22
	Necrosis	10%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Débil
H&E		
IHQ (*)		

(*) Marcador IHQ utilizado: WT1

VH-PDOX-WT8	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Nefroblastoma mixto	Nefroblastoma
E & H	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Moderada
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	6
	Necrosis	20%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Local
	Intensidad	Moderada
H&E		
IHQ (*)		

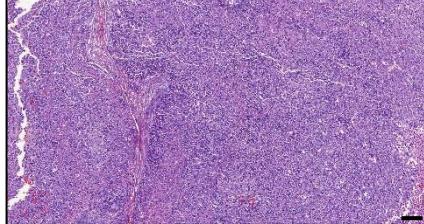
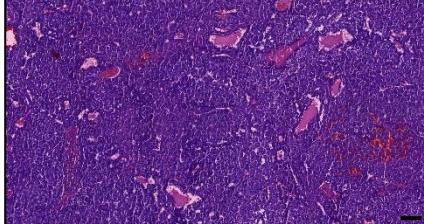
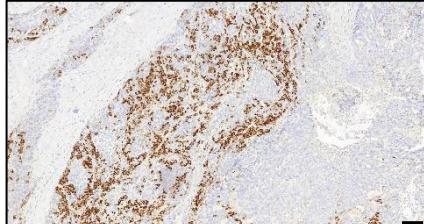
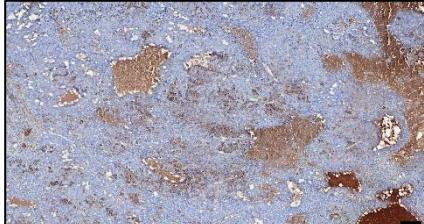
(*) Marcador IHQ utilizado: WT1

VH-PDOX-HB1	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Hepatoblastoma mixto: componente epitelial, mesenquimal y teratoide	Hepatoblastoma epitelial (sólo embrionario)
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Moderada
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	6
	Necrosis	5%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Moderada
H&E		
IHQ (*)		

(*) Marcador IHQ utilizado: HEPATOCYTE

VH-PDOX-HB2	PACIENTE	PDOX
Histología	Hepatoblastoma	Hepatoblastoma (muy indiferenciado)
E & H	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Alta
	Pleomorfismo	Sí
	Mitosis	3
	Necrosis	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Fuerte
H&E		
IHQ (*)		

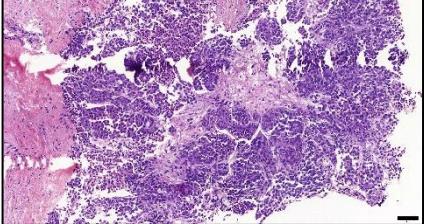
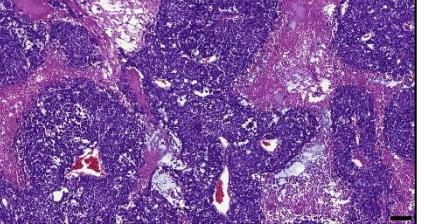
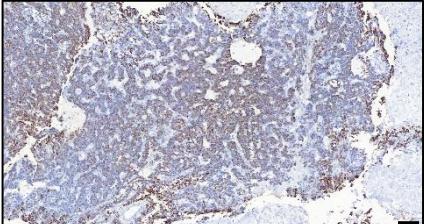
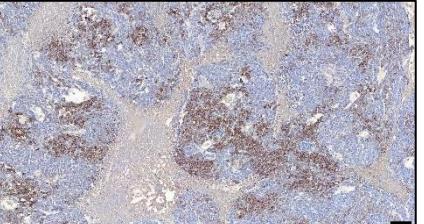
(*) Marcador IHQ utilizado: B-CATENINA

VH-PDOX-HB3	PACIENTE	PDOX	
Histología	Hepatoblastoma fetal y embrionario	Hepatoblastoma embrionario	
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo	Expansivo
	Citomorfología	Redonda	Redonda
	Densidad celular	Moderada	Alta
	Pleomorfismo	No	No
	Mitosis	19	4
	Necrosis	10%	5%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva	Positiva
	Patrón	Local	Local
	Intensidad	Moderada	Moderada
H&E			
IHQ (*)			

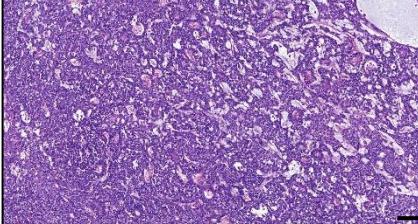
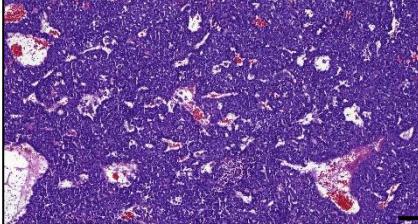
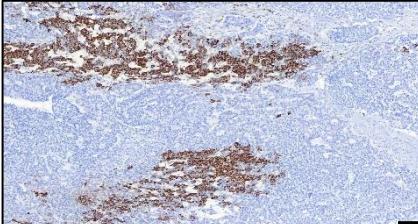
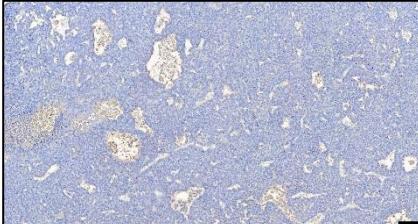
(*) Marcador IHQ utilizado: HEPATOCYTE

VH-PDOX-HB4	PACIENTE	PDOX	
Histología	Hepatoblastoma fetal, embrionario y patrón de células pequeñas	Hepatoblastoma	
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo	No valorable
	Citomorfología	Epitelial	Redonda
	Densidad celular	Moderada	Alta
	Pleomorfismo	No	No
	Mitosis	2	4
	Necrosis	40%	60%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva	Positiva
	Patrón	Difuso	Local
	Intensidad	Moderada	Moderada
H&E			
IHQ (*)			

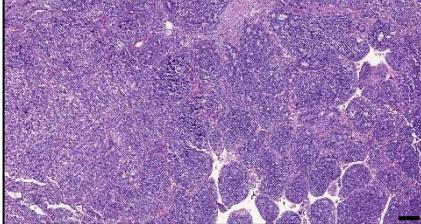
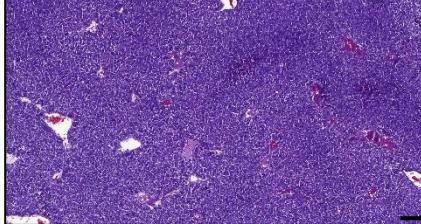
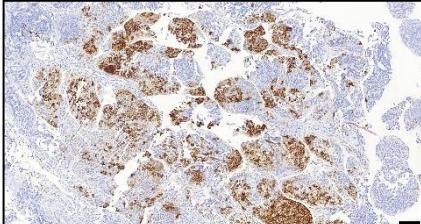
(*) Marcador IHQ utilizado: HEPATOCYTE

VH-PDOX-HB5	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Hepatoblastoma epitelial	Hepatoblastoma
E & H	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Moderada
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	2
	Necrosis	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Local
	Intensidad	Débil
H&E		
IHQ (*)		

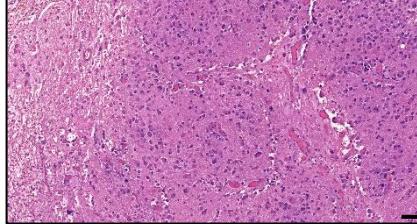
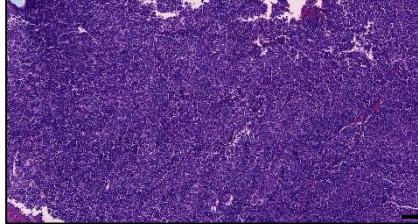
(*) Marcador IHQ utilizado: HEPATOCYTE

VH-PDOX-HB6	 PACIENTE	 PDOX	
Histología	Hepatoblastoma mixto	No disponible	
E & H	Patrón de crecimiento	Expansivo	Infiltrativo
	Citomorfología	Redonda	Redonda
	Densidad celular	Moderada	Alta
	Pleomorfismo	No	No
	Mitosis	2	12
	Necrosis	0%	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva	Negativa
	Patrón	Local	-
	Intensidad	Moderada	-
H&E			
IHQ (*)			

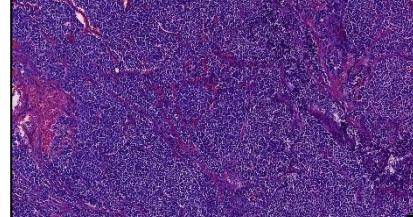
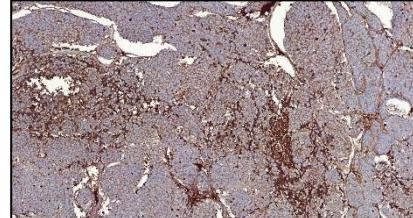
(*) Marcador IHQ utilizado: HEPATOCYTE

VH-PDOX-HCC1	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Hepatocarcinoma	Hepatocarcinoma
E & H	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Alta
	Pleomorfismo	Sí
	Mitosis	7
	Necrosis	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Local
	Intensidad	Moderada
H&E		
IHQ (*)		

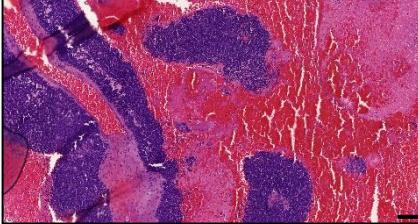
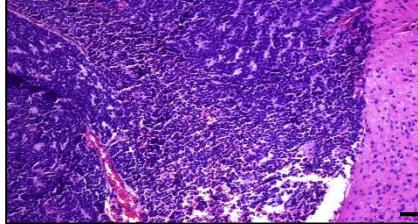
(*) Marcador IHQ utilizado: HEPATOCYTE

VH-PDOX-NB1	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Neuroblastoma en diferenciación	Neuroblastoma indiferenciado
H&E	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Ganglionar
	Densidad celular	Baja
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	0
	MKI	0
	Necrosis	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Fuerte
H&E		
IHQ (*)	ND	

(*) Marcador IHQ utilizado: SINAPTOFISINA

VH-PDOX-NB2	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Neuroblastoma indiferenciado	Neuroblastoma indiferenciado
H&E	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Alta
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	10
	MKI	4
	Necrosis	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Local
	Intensidad	Moderada
H&E		
IHQ (*)		

(*) Marcador IHQ utilizado: SINAPTOFISINA

VH-PDOX-NB3	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Neuroblastoma indiferenciado	Neuroblastoma indiferenciado
H&E	Patrón de crecimiento	Infiltrativo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Alta
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	4
	MKI	7
	Necrosis	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Moderada
H&E		
IHQ (*)		

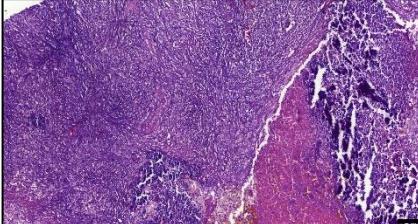
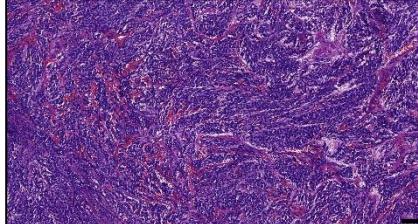
(*) Marcador IHQ utilizado: SINAPTOFISINA

VH-PDOX-NB4	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Neuroblastoma indiferenciado	Neuroblastoma indiferenciado
H&E	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Alta
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	ND
	MKI	0.2
	Necrosis	40%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Fuerte
H&E	ND	
IHQ (*)	ND	

(*) Marcador IHQ utilizado: SINAPTOFISINA

VH-PDOX-NB5	PACIENTE	PDOX
Histología	Neuroblastoma indiferenciado	Neuroblastoma indiferenciado
H&E	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Alta
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	3
	MKI	6
	Necrosis	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Fuerte
H&E		
IHQ (*)		

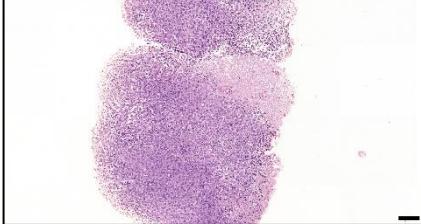
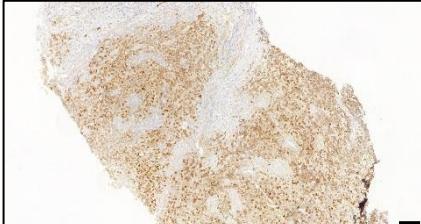
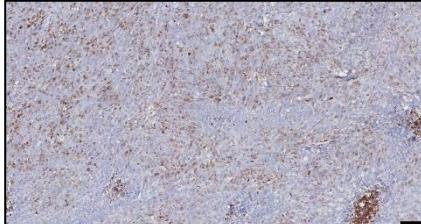
(*) Marcador IHQ utilizado: SINAPTOFISINA

VH-PDOX-NB6	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Neuroblastoma indiferenciado	Neuroblastoma
H&E	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Baja
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	0
	MKI	ND
	Necrosis	93%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Moderada
H&E		
IHQ (*)	ND	

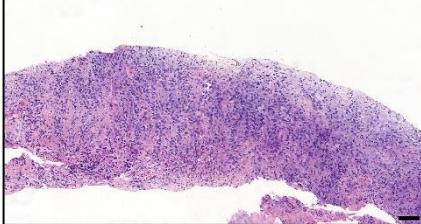
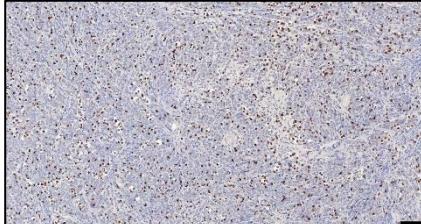
(*) Marcador IHQ utilizado: SINAPTOFISINA

VH-PDOX-RMS1	PACIENTE	PDOX
Histología	Rabdomiosarcoma embrionario	Rabdomiosarcoma embrionario
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Alta
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	19
	Necrosis	30%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Fuerte
H&E		
IHQ (*)		

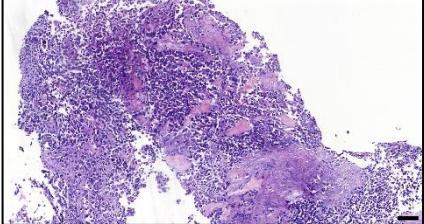
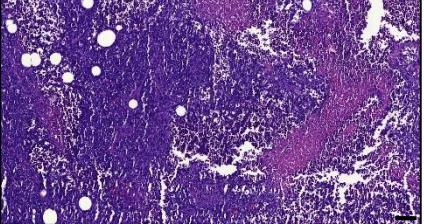
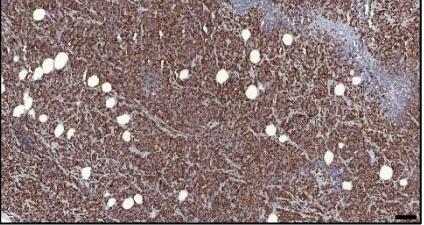
(*) Marcador IHQ utilizado: MIOGENINA

VH-PDOX-RMS3	 PACIENTE	 PDOX	
Histología	Rabdomiosarcoma embrionario	Rabdomiosarcoma	
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo	Expansivo
	Citomorfología	Redonda	Redonda
	Densidad celular	Alta	Alta
	Pleomorfismo	No	No
	Mitosis	13	35
	Necrosis	20%	10%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva	Positiva
	Patrón	Difuso	Difuso
	Intensidad	Moderada	Débil
H&E			
IHQ (*)			

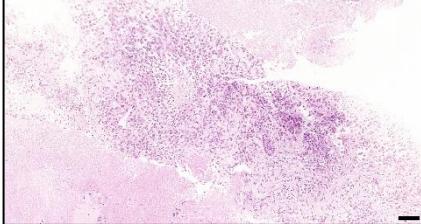
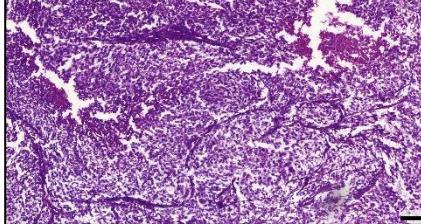
(*) Marcador IHQ utilizado: MIOGENINA

VH-PDOX-RMS4	 PACIENTE	 PDOX	
Histología	Rabdomiosarcoma embrionario	Rabdomiosarcoma	
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo	Expansivo
	Citomorfología	Redonda	Redonda y fusiforme
	Densidad celular	Moderada	Alta
	Pleomorfismo	No	No
	Mitosis	5	15
	Necrosis	0%	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva	Positiva
	Patrón	Difuso	Local
	Intensidad	Moderada	Moderada
H&E			
IHQ (*)			

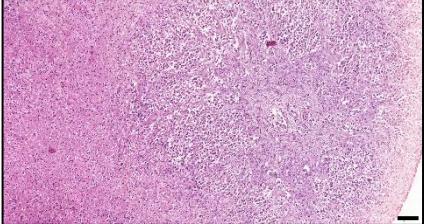
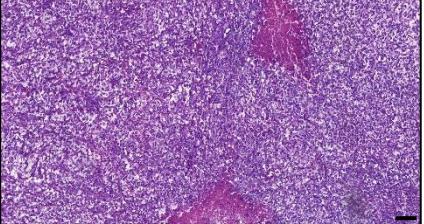
(*) Marcador IHQ utilizado: MIOGENINA

VH-PDOX-RMS5	 PACIENTE	 PDOX	
Histología	Rabdomiosarcoma alveolar	Rabdomiosarcoma alveolar	
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo	Infiltrativo
	Citomorfología	Redonda	Redonda
	Densidad celular	Moderada	Alta
	Pleomorfismo	No	No
	Mitosis	5	12
	Necrosis	5%	10%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva	Positiva
	Patrón	Difuso	Difuso
	Intensidad	Fuerte	Fuerte
H&E			
IHQ (*)	ND		

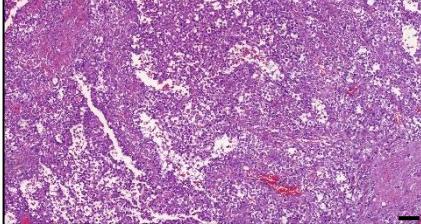
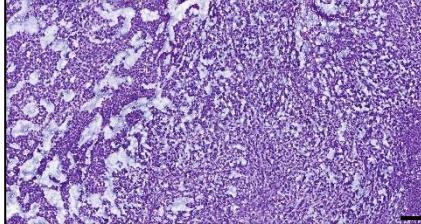
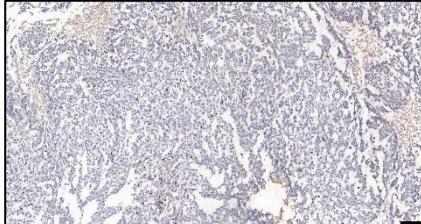
(*) Marcador IHQ utilizado: MIOGENINA

VH-PDOX-MRT1	 PACIENTE	 PDOX	
Histología	Tumor rabdoide maligno	Tumor rabdoide maligno	
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo	Expansivo
	Citomorfología	Redonda	Redonda
	Densidad celular	Moderada	Alta
	Pleomorfismo	No	No
	Mitosis	2	1
	Necrosis	50%	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Negativa	Negativa
	Patrón	-	-
	Intensidad	-	-
H&E			
IHQ (*)	ND		

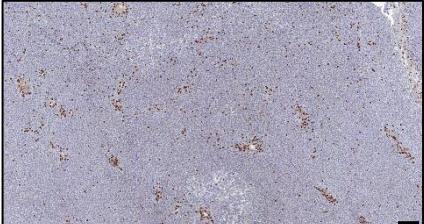
(*) Marcador IHQ utilizado: INI-1

VH-PDOX-MRT2	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Tumor rabdoide maligno	Tumor rabdoide maligno
E & H	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Alta
	Pleomorfismo	Sí
	Mitosis	4
	Necrosis	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Negativa
	Patrón	-
	Intensidad	-
H&E		
IHQ (*)		

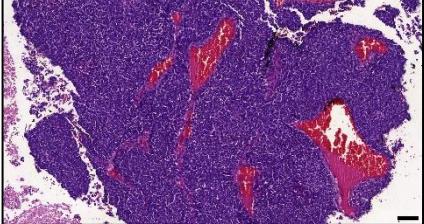
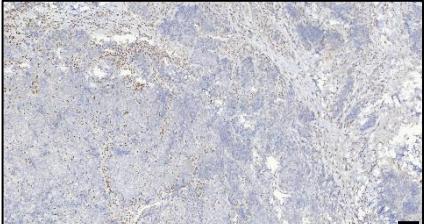
(*) Marcador IHQ utilizado: INI-1

VH-PDOX-MRT3	 PACIENTE	 PDOX	
Histología	Tumor rabdoide maligno	Tumor rabdoide maligno	
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo	Infiltrativo
	Citomorfología	Rabdoide	Rabdoide
	Densidad celular	Moderada	Moderada
	Pleomorfismo	Sí	Sí
	Mitosis	0	0
	Necrosis	30%	60%
IHQ	Positiva / Negativa	Negativa	Negativa
	Patrón	-	-
	Intensidad	-	-
H&E			
IHQ (*)			

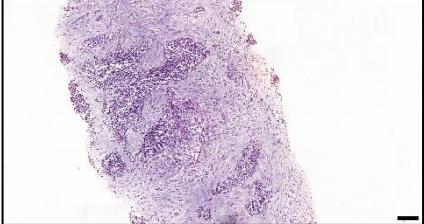
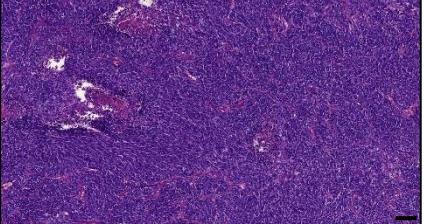
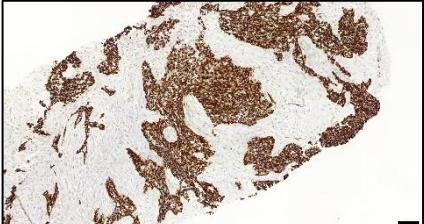
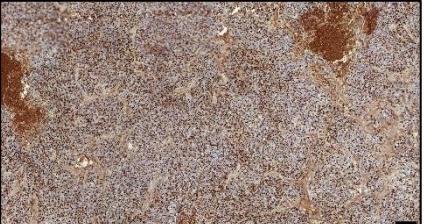
(*) Marcador IHQ utilizado: INI-1

VH-PDOX-MRT4	 PACIENTE	 PDOX	
Histología	Tumor rabdoide maligno	Tumor rabdoide maligno (extracraneal)	
E & H	Patrón de crecimiento	Expansivo	Expansivo
	Citomorfología	Redonda	Redonda
	Densidad celular	Alta	Alta
	Pleomorfismo	No	No
	Mitosis	15	10
	Necrosis	50%	70%
IHQ	Positiva / Negativa	Negativa	Negativa
	Patrón	-	-
	Intensidad	-	-
H&E			
IHQ (*)			

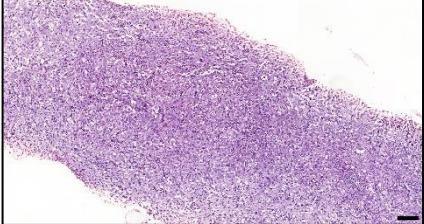
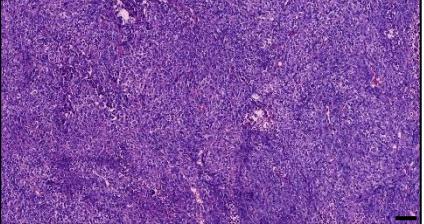
(*) Marcador IHQ utilizado: INI-1

VH-PDOX-MRT5	 PACIENTE	 PDOX	
Histología	Tumor rabdoide maligno	Tumor rabdoide maligno	
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo	Expansivo
	Citomorfología	Redonda	Redonda
	Densidad celular	Alta	Alta
	Pleomorfismo	No	No
	Mitosis	16	16
	Necrosis	0%	20%
IHQ	Positiva / Negativa	Negativa	Negativa
	Patrón	-	-
	Intensidad	-	-
H&E			
IHQ (*)			

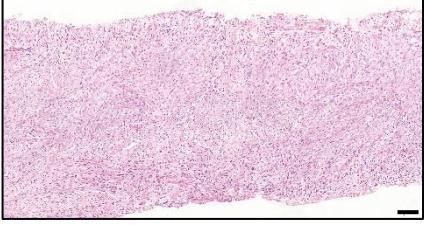
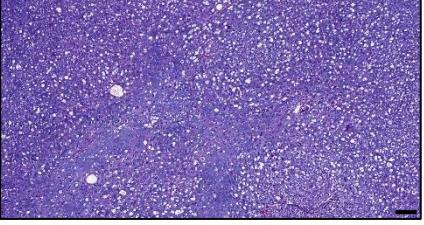
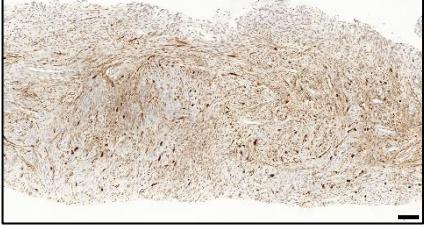
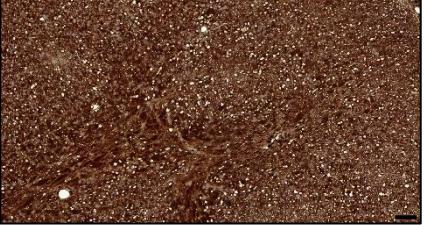
(*) Marcador IHQ utilizado: INI-1

VH-PDOX-DSRCT1	 PACIENTE	 PDOX	
Histología	Tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas	Tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas	
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo	Expansivo
	Citomorfología	Redonda	Redonda
	Densidad celular	Moderada	Alta
	Pleomorfismo	No	No
	Mitosis	2	25
	Necrosis	0%	20%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva	Positiva
	Patrón	Difuso	Local
	Intensidad	Fuerte	Moderada
H&E			
IHQ (*)			

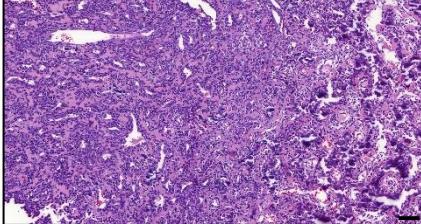
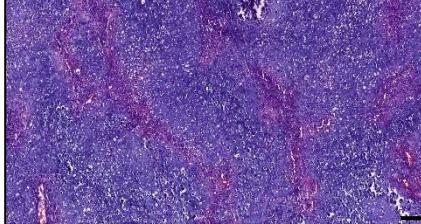
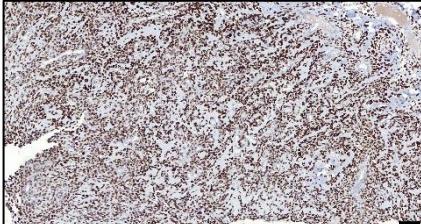
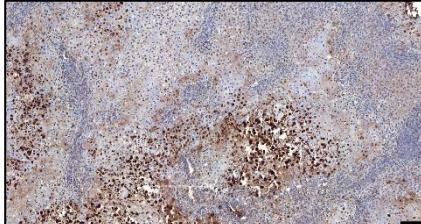
(*) Marcador IHQ utilizado: DESMINA

VH-PDOX-NRSTS1	 PACIENTE	 PDOX	
Histología	Sarcoma indiferenciado	Sarcoma indiferenciado	
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo	Infiltrativo
	Citomorfología	Redonda	Redonda
	Densidad celular	Alta	Alta
	Pleomorfismo	ND	No
	Mitosis	4	28
	Necrosis	40%	50%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva	Positiva
	Patrón	Difuso	Difuso
	Intensidad	Fuerte	Moderada
H&E			
IHQ (*)			

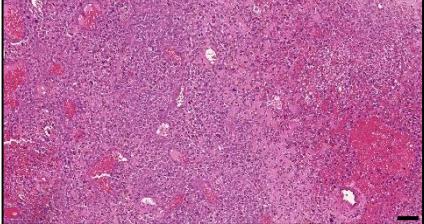
(*) Marcador IHQ utilizado: VIMENTINA

VH-PDOX-NRSTS2	 PACIENTE	 PDOX	
Histología	Tumor maligno de la vaina del nervio periférico (MPNST)	ND	
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo	Expansivo
	Citomorfología	Célula fusiforme	Redonda
	Densidad celular	Moderada	Moderada
	Pleomorfismo	No	No
	Mitosis	6	0
	Necrosis	0%	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva	Positiva
	Patrón	Local	Difuso
	Intensidad	Moderada	Fuerte
H&E			
IHQ (*)			

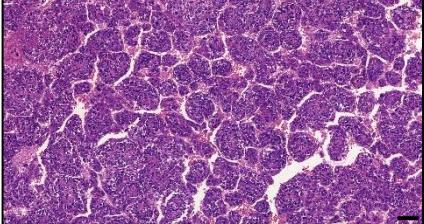
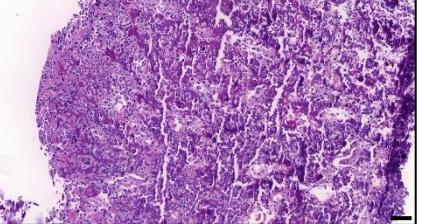
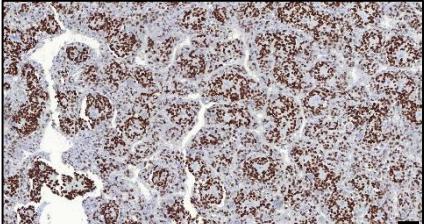
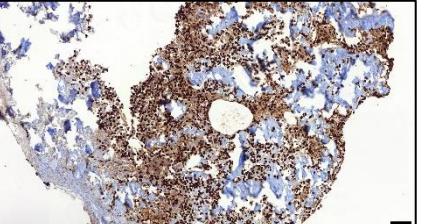
(*) Marcador IHQ utilizado: S100

VH-PDOX-OS1	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Osteosarcoma	Osteosarcoma (condroide)
E & H	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Moderada
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	32
	Necrosis	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Fuerte
H&E		
IHQ (*)		

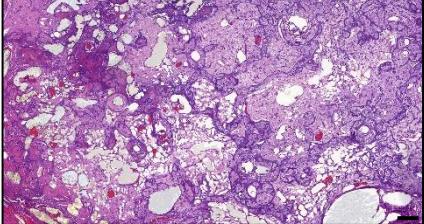
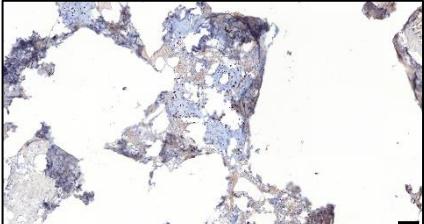
(*) Marcador IHQ utilizado: SATB2

VH-PDOX-OS2	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Osteosarcoma	Osteosarcoma
E & H	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Moderada
	Pleomorfismo	Sí
	Mitosis	15
	Necrosis	20%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Moderada
H&E		
IHQ (*)		

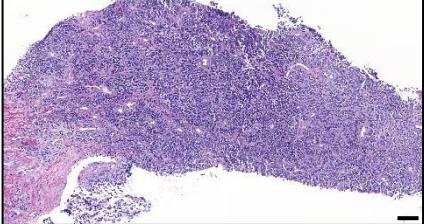
(*) Marcador IHQ utilizado: SATB2

VH-PDOX-OS3	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Osteosarcoma	Osteosarcoma
 E & H	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Moderada
	Pleomorfismo	Sí
	Mitosis	4
	Necrosis	10%
 IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Fuerte
H&E		
IHQ (*)		

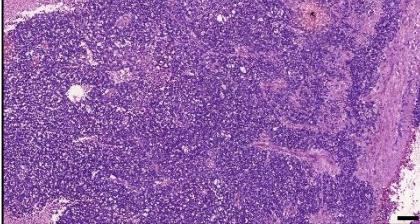
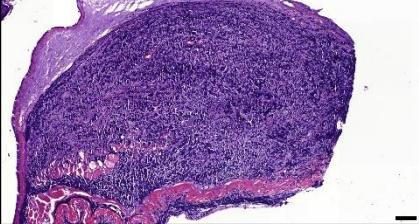
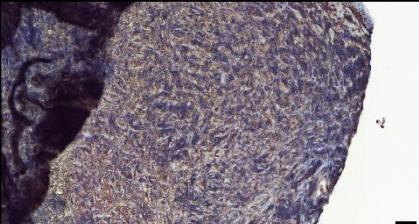
(*) Marcador IHQ utilizado: SATB2

VH-PDOX-OS4	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Osteosarcoma	Osteosarcoma
E & H	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Baja
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	0
	Necrosis	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Negativa
	Patrón	-
	Intensidad	-
H&E		
IHQ (*)		

(*) Marcador IHQ utilizado: SATB2

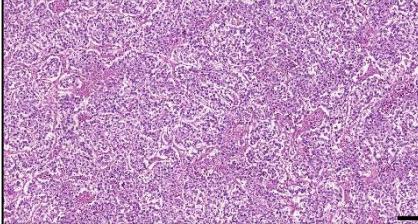
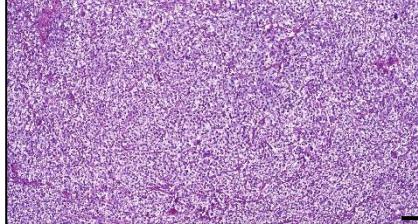
VH-PDOX-EWS3	 PACIENTE	 PDOX	
Histología	Sarcoma de Ewing	Sarcoma de Ewing	
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo	Expansivo
	Citomorfología	Redonda	Redonda
	Densidad celular	Alta	Alta
	Pleomorfismo	No	No
	Mitosis	3	23
	Necrosis	15%	25%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva	Positiva
	Patrón	Difuso	Difuso
	Intensidad	Fuerte	Fuerte
H&E			
IHQ (*)			

(*) Marcador IHQ utilizado: NKX2.2

VH-PDOX-RB1	 PACIENTE	 PDOX	
Histología	Retinoblastoma moderadamente diferenciado	Retinoblastoma indiferenciado y moderadamente indiferenciado	
E & H	Patrón de crecimiento	Infiltrativo	Infiltrativo
	Citomorfología	Redonda	Redonda
	Densidad celular	Alta	Alta
	Pleomorfismo	No	No
	Mitosis	20	2
	Necrosis	10%	0%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva	Positiva
	Patrón	Difuso	Difuso
	Intensidad	Moderada	Débil
H&E			
IHQ (*)			

(*) Marcador IHQ utilizado: SINAPTOFISINA; PDOX a 40X (escala 50um)

VH-PDOX-CNS1	PACIENTE	PDOX
Histología	Meduloblastoma clásico	Meduloblastoma
	Patrón de crecimiento	Expansivo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Alta
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	10
	Necrosis	0%
	Positiva / Negativa	No valorable
	Patrón	-
	Intensidad	-
H&E		
IHC	-	-

VH-PDOX-GCT1	 PACIENTE	 PDOX
Histología	Disgerminoma	Disgerminoma
 & 	Patrón de crecimiento	Infiltrativo
	Citomorfología	Redonda
	Densidad celular	Alta
	Pleomorfismo	No
	Mitosis	15
	Necrosis	5%
IHQ	Positiva / Negativa	Positiva
	Patrón	Difuso
	Intensidad	Fuerte
H&E		
IHQ (*)		

(*) Marcador IHQ utilizado: PLAP

Anexo IV. Tabla resumen de las características de los 46 PDOX por cada grupo tumoral.

SARCOMAS							
Modelo PDOX	Sexo	Histología tumor paciente	Momento de obtención de la muestra	Riesgo del paciente en el momento de la obtención de la muestra	Origen de la muestra	Tratamiento recibido	Genómica
VH-PDOX-MRT1	F	Tumor rabdoide maligno	Biopsia diagnóstica	Muy alto	Primario	Pre-tratamiento	SMARCB1: Deleción en homocigosis: P: LF
VH-PDOX-MRT2	F	Tumor rabdoide maligno	Biopsia diagnóstica	Muy alto	Primario	Pre-tratamiento	SMARCB1: Deleción en homocigosis: P: LF
VH-PDOX-MRT3	M	Tumor rabdoide maligno	Cirugía 1ª línea	Muy alto	Primario	Post-tratamiento	SMARCB1: Deleción en homocigosis: P: LF
VH-PDOX-MRT4	F	Tumor rabdoide maligno	Biopsia diagnóstica	Muy alto	Primario	Pre-tratamiento	SMARCB1: Deleción en homocigosis: P: LF
VH-PDOX-MRT5	F	Tumor rabdoide maligno	Recaída / Progresión / Refractariedad	Muy alto	Metástasis	Post-tratamiento	SMARCB1: Deleción en homocigosis: P: LF
VH-PDOX-RMS1	M	Rabdomiosarcoma embrionario	Recaída / Progresión / Refractariedad	Alto	Primario	Post-tratamiento	FGFR4: p.G636C: LP: GF
VH-PDOX-RMS2	F	Rabdomiosarcoma alveolar	Recaída / Progresión / Refractariedad	Muy alto	Metástasis	Post-tratamiento	CDK4: Amplificación (22 copias): P: GF GLI1: Amplificación (22 copias): LP: GF PAX3-FOXO1 translocación: P
VH-PDOX-RMS3	F	Rabdomiosarcoma embrionario	Biopsia diagnóstica	Alto	Primario	Pre-tratamiento	TP53: p.R248Q (germinal) + una copia perdida en el tumor: VAF 75% tumor: P: LF PAK1: Amplificación (7 copias): LP: GF KRAS: Amplificación (6 copias): P: GF
VH-PDOX-RMS4	M	Rabdomiosarcoma embrionario	Recaída / Progresión / Refractariedad	Muy alto	Metástasis	Post-tratamiento	NRAS: p.Q61K: VAF 40%: P: GF PTEN: p.L25F: VAF 24%: LP: LF
VH-PDOX-RMS5	F	Rabdomiosarcoma alveolar	Recaída / Progresión / Refractariedad	Muy alto	Metástasis	Post-tratamiento	TP53: p.Q52*: VAF 85%: LP: LF KDR: p.S290R: VAF 28%: LP: GF PAX7-FOXO1 translocación: P
VH-PDOX-DSRCT1	M	Tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas	Biopsia diagnóstica	Muy alto	Primario	Pre-tratamiento	EWS-WT1 translocación: P

VH-PDOX-NRSTS1	M	Sarcoma indiferenciado	Recaída / Progresión / Refractariedad	Muy alto	Primario	Post-tratamiento	TP53: p.G244C: VAF 55%: P: LF PIK3CA: p.R38H: VAF 10%: P: GF CDKN2A/CDKN2B: Deleción en homocigosis: P: LF
VH-PDOX-NRSTS2	F	Tumor maligno de la vaina del nervio periférico (MPNST)	Biopsia diagnóstica	Alto	Primario	Pre-tratamiento	NF1: R1362* (germinal): P: LF
VH-PDOX-OS1	F	Osteosarcoma	Recaída / Progresión / Refractariedad	Alto	Metástasis	Pre-tratamiento	TP53: NM_000546.6: c.782+1G>T (<i>splice donor variant</i>): VAF 72%: P: LF ATRX: p. T1582Nfs*19: VAF 71%: LP: LF
VH-PDOX-OS2	F	Osteosarcoma	Recaída / Progresión / Refractariedad	Muy alto	Metástasis	Post-tratamiento	TP53: NM_000546.6: c.782+1G>T (<i>splice donor variant</i>): VAF 72%: P: LF ATRX: p. T1582Nfs*19: VAF 71%: LP: LF
VH-PDOX-OS3	M	Osteosarcoma	Recaída / Progresión / Refractariedad	Alto	Metástasis	Pre-tratamiento	CCNE1: Amplificación (6 copias): P: GF
VH-PDOX-OS4	M	Osteosarcoma	Recaída / Progresión / Refractariedad	Alto	Metástasis	Post-tratamiento	-
VH-PDOX-EWS1	M	Sarcoma de Ewing	Biopsia diagnóstica	Intermedio / Estándar	Primario	Pre-tratamiento	ERRFI1: Deleción en homocigosis: LP: LF EWSR1 translocación: P
VH-PDOX-EWS2	F	Sarcoma de Ewing	Recaída / Progresión / Refractariedad	Alto	Metástasis	Post-tratamiento	STAG2: NM_001042749.2: c.819+1G>A (<i>splice donor variant</i>): VAF 45%: LP: LF FGFR1: p.K687E: VAF 51%: P: GF EWSR1-FLI1 translocación: P
VH-PDOX-EWS3	M	Sarcoma de Ewing	Biopsia diagnóstica	Alto	Primario	Pre-tratamiento	CDKN2A/CDKN2B: Deleción en homocigosis: P: LF EWSR1 translocación: P
VH-PDOX-SO-NOS1	F	Sarcoma óseo NOS	Recaída / Progresión / Refractariedad	Muy alto	Metástasis	Post-tratamiento	CDKN2A/CDKN2B: Deleción en homocigosis: P: LF TERT: Amplificación: LP: GF NF1: Deleción en homocigosis: LP: LF TPM3-NTRK1 translocación: P

Características de las muestras de paciente de las que derivan los modelos PDOX de sarcomas establecidos. Están resaltados en amarillo y salmón los modelos PDOX que provienen del mismo paciente. La información genómica proviene mayoritariamente de la secuenciación de las muestras en los programas de medicina personalizada COMIK (WES) y MAPPYACTS (WES/RNAseq) y de estudios realizados en diferentes departamentos de Vall d'Hebron mediante FISH, PCR y panel NGS, entre otras técnicas. F: Femenino, M: Masculino, VAF: del inglés, Variant Allele Frequency, P: del inglés, Pathogenic, LP: del inglés, Likely Pathogenic, GF: del inglés, Gain of Function, LF: del inglés, Loss of Function.

NEFROBLASTOMAS							
Modelo PDOX	Sexo	Histología tumor paciente	Momento de obtención de la muestra	Riesgo del paciente en el momento de la obtención de la muestra	Origen de la muestra	Tratamiento recibido	Genómica
VH-PDOX-WT1	M	Nefroblastoma estromal (riñón izquierdo), mixto (riñón derecho)	Cirugía 1ª línea	Intermedio / Estándar	Primario	Post-tratamiento	-
VH-PDOX-WT2	F	Nefroblastoma blastematoso	Recaída / Progresión / Refractariedad	Muy alto	Metástasis	Post-tratamiento	TP53: p.C242G (germinal): VAF 94% tumor: P: LF
VH-PDOX-WT3	F	Nefroblastoma mixto (epitelial, blastematoso y estromal)	Cirugía 1ª línea	Intermedio / Estándar	Primario	Post-tratamiento	-
VH-PDOX-WT4	M	Nefroblastoma regresivo	Cirugía 1ª línea	Intermedio / Estándar	Primario	Post-tratamiento	-
VH-PDOX-WT5	M	Nefroblastoma no anaplásico	Biopsia diagnóstica	Intermedio / Estándar	Primario	Pre-tratamiento	-
VH-PDOX-WT6	M	Nefroblastoma mixto (estromal y epitelial)	Cirugía 1ª línea	Intermedio / Estándar	Primario	Post-tratamiento	-
VH-PDOX-WT7	F	Nefroblastoma blastematoso	Recaída / Progresión / Refractariedad	Muy alto	Primario	Post-tratamiento	TP53: p.R337H: VAF 89%: P; LF MLH1: p.L559Cfs*32 + una copia perdida: VAF 50% : LP; LF ASXL1: p.G645Vfs*58: VAF: 44%: LP: LF
VH-PDOX-WT8	M	Nefroblastoma mixto	Cirugía 1ª línea	Intermedio / Estándar	Primario	Post-tratamiento	-
VH-PDOX-WT9	F	Nefroblastoma	Recaída / Progresión / Refractariedad	Muy alto	Metástasis	Post-tratamiento	DROSHA: p.E1147K: VAF 46%: P SIX1: p.Q177R: VAF: 48%: P ZFHX3: p.K497*+ una copia perdida: VAF 96%: LP: LF CBFB: p.F32Tfs*55+ una copia perdida: VAF 94%: LP: LF

Características de las muestras de paciente de las que derivan los modelos PDOX de nefroblastomas establecidos. La información genómica proviene mayoritariamente de la secuenciación de las muestras en los programas de medicina personalizada COMIK (WES) y MAPPYACTS (WES/RNAseq) y de estudios realizados en diferentes departamentos de Vall d'Hebron mediante FISH, PCR y panel NGS, entre otras técnicas. F: Femenino, M: Masculino, VAF: del inglés, Variant Allele Frequency, P: del inglés, Pathogenic, LP: del inglés, Likely Pathogenic, GF: del inglés, Gain of Function, LF: del inglés, Loss of Function.

TUMORES HEPÁTICOS							
Modelo PDOX	Sexo	Histología tumor paciente	Momento de obtención de la muestra	Riesgo del paciente en el momento de la obtención de la muestra	Origen de la muestra	Tratamiento recibido	Genómica
VH-PDOX-HB1	M	Hepatoblastoma mixto: componente epitelial (fetal y embrionario), mesenquimal (hueso) y teratoide (epitelio escamoso)	Cirugía 1ª línea	Intermedio / Estándar	Primario	Post-tratamiento	-
VH-PDOX-HB2	M	Hepatoblastoma	Recaída / Progresión / Refractariedad	Muy alto	Metástasis	Post-tratamiento	Sin alteraciones moleculares patogénicas o probablemente patogénicas detectadas por WES
VH-PDOX-HB3	M	Hepatoblastoma fetal y embrionario	Recaída / Progresión / Refractariedad	Alto	Metástasis	Post-tratamiento	Sin alteraciones moleculares patogénicas o probablemente patogénicas detectadas por WES
VH-PDOX-HB4	M	Hepatoblastoma fetal, embrionario y patrón de células pequeñas	Recaída / Progresión / Refractariedad	Alto	Primario	Post-tratamiento	CTNNB1: p.W25_D32del; VAF 31%; P: GF MITF: p.E318K (germinal); VAF 44% tumor: P: GF
VH-PDOX-HB5	F	Hepatoblastoma epitelial	Biopsia diagnóstica	Alto	Primario	Pre-tratamiento	Alteraciones en el estado de metilación de la región cromosómica 11p15 sometida a imprinting: hipermetilación de IC1 e hipometilación de IC2 como consecuencia de disomía uniparental
VH-PDOX-HB6	F	Hepatoblastoma mixto	Cirugía 1ª línea	Alto	Primario	Post-tratamiento	Alteraciones en el estado de metilación de la región cromosómica 11p15 sometida a imprinting: hipermetilación de IC1 e hipometilación de IC2 como consecuencia de disomía uniparental
VH-PDOX-HCC1	M	Hepatocarcinoma	Recaída / Progresión / Refractariedad	Muy alto	Metástasis	Post-tratamiento	TP53: p.R248Q (germinal); VAF 91% tumor: P: LF

Características de las muestras de paciente de las que derivan los modelos PDOX de tumores hepáticos establecidos. Están resaltados en amarillo y salmón los modelos PDOX que provienen del mismo paciente. La información genómica proviene mayoritariamente de la secuenciación de las muestras en los programas de medicina personalizada COMIK (WES) y MAPPYACTS (WES/RNAseq) y de estudios realizados en diferentes departamentos de Vall d'Hebron mediante FISH, PCR y panel NGS, entre otras técnicas. F: Femenino, M: Masculino, VAF: del inglés, Variant Allele Frequency, P: del inglés, Pathogenic, LP: del inglés, Likely Pathogenic, GF: del inglés, Gain of Function, LF: del inglés, Loss of Function.

NEUROBLASTOMAS							
Modelo PDOX	Sexo	Histología tumor paciente	Momento de obtención de la muestra	Riesgo del paciente en el momento de la obtención de la muestra	Origen de la muestra	Tratamiento recibido	Genómica
VH-PDOX-NB1	F	Neuroblastoma en diferenciación	Cirugía 1ª línea	Alto	Primario	Post-tratamiento	MYCN: Amplificación: P: GF
VH-PDOX-NB2	F	Neuroblastoma indiferenciado	Recaída / Progresión / Refractariedad	Muy alto	Metástasis	Post-tratamiento	NRAS: p.Q61K: VAF 32% : P: GF MYCN: Amplificación (37 copias) P: GF
VH-PDOX-NB3	F	Neuroblastoma indiferenciado	Recaída / Progresión / Refractariedad	Muy alto	Metástasis	Post-tratamiento	NRAS: p.Q61K: VAF 53%: P: GF MYCN: Amplificación (213 copias): P: GF
VH-PDOX-NB4	M	Neuroblastoma indiferenciado	Cirugía al diagnóstico	Alto	Primario	Pre-tratamiento	11q deletcionado MYCN no amplificado ALK no amplificado ni mutado
VH-PDOX-NB5	F	Neuroblastoma indiferenciado	Biopsia diagnóstica	Alto	Primario	Pre-tratamiento	ALK: p.G1128A: VAF 43%: P: GF MYCN: Amplificación (110 copias): P: GF ABCB1: Amplificación (24 copias)
VH-PDOX-NB6	M	Neuroblastoma indiferenciado	Cirugía 1ª línea	Alto	Primario	Post-tratamiento	ALK: p.F1174L: VAF 27%: P: GF PPM1D: p.E476*: VAF 23%: LP: GF MYCN: Amplificación (171 copias): P: GF

Características de las muestras de paciente de las que derivan los modelos PDOX de neuroblastomas establecidos. Están resaltados en amarillo los modelos PDOX que provienen del mismo paciente. La información genómica proviene mayoritariamente de la secuenciación de las muestras en los programas de medicina personalizada COMIK (WES) y MAPPYACTS (WES/RNAseq) y de estudios realizados en diferentes departamentos de Vall d'Hebron mediante FISH, PCR y panel NGS, entre otras técnicas. F: Femenino, M: Masculino, VAF: del inglés, Variant Allele Frequency, P: del inglés, Pathogenic, LP: del inglés, Likely Pathogenic, GF: del inglés, Gain of Function, LF: del inglés, Loss of Function.

OTROS TIPOS TUMORALES							
Modelo PDOX	Sexo	Histología tumor paciente	Momento de obtención de la muestra	Riesgo del paciente en el momento de la obtención de la muestra	Origen de la muestra	Tratamiento recibido	Genómica
VH-PDOX-RB1	M	Retinoblastoma moderadamente diferenciado	Biopsia diagnóstica	Intermedio / Estándar	Primario	Pre-tratamiento	RB1: Deleción (germinal): P: LF
VH-PDOX-CNS1	M	Meduloblastoma clásico	Biopsia diagnóstica	Muy alto	Primario	Pre-tratamiento	MYCN: Amplificación (37 copias): P: GF Positivo para monosomía 6
VH-PDOX-GCT1	F	Disgerminoma	Biopsia diagnóstica	Intermedio / Estándar	Primario	Pre-tratamiento	-

Características de las muestras de paciente de las que derivan los modelos PDOX de otros tipos tumorales. La información genómica proviene mayoritariamente de la secuenciación de las muestras en los programas de medicina personalizada COMIK (WES) y MAPPYACTS (WES/RNAseq) y de estudios realizados en diferentes departamentos de Vall d'Hebron mediante FISH, PCR y panel NGS, entre otras técnicas. F: Femenino, M: Masculino, VAF: del inglés, Variant Allele Frequency, P: del inglés, Pathogenic, LP: del inglés, Likely Pathogenic, GF: del inglés, Gain of Function, LF: del inglés, Loss of Function.

Anexo V. Modelos PDOX cuyos pacientes experimentaron una recaída. El mismo color indica que las muestras proceden de un mismo paciente.

ID Muestra (n= 26)	Momento de la muestra	 Días entre la biopsia / cirugía y la recaída / progresión	 Días entre la implantación y el crecimiento ortotópico	¿Se llegaría a P1 antes de la recaída / progresión?
VH-1	R	123	45,5	Sí
VH-14	D	60	55	Sí
VH-16	D	52	105	No
VH-18	R	173	63	Sí
VH-20	D	297	86	Sí
VH-29	R	26	270	No
VH-33	R	62	94	No
VH-40	R	25	104	No
VH-41	R	71	50	Sí
VH-50	D	214	66	Sí
VH-51	D	329	77	Sí
VH-53	D	648	118	Sí
VH-54	R	191	88	Sí
VH-55	R	135	104	Sí
VH-64	D	227	177	Sí
VH-74	R	69	90	No
VH-79	D	54	66	No
VH-83	R	23	140	No
VH-89	D	285	45	Sí
VH-94	R	77	232	No
VH-104	R	120	270	No
VH-109	D	664	120	Sí
VH-113	R	123	40	Sí
VH-114	R	328	54	Sí
VH-115	D	136	75	Sí
VH-131	R	10	60	No

R: Recaída, Progresión,
Refractariedad

D: Biopsia al diagnóstico / Cirugía
en 1^a línea

Anexo VI. Modelos PDOX cuyos pacientes fallecieron (*exitus*). Las muestras del mismo color indican que proceden de un mismo paciente.

ID Muestra (n=24)	Momento de la muestra	Días entre la biopsia / cirugía y el éxitus 	Días entre la implantación y el crecimiento ortotópico 	¿Se llegaría a P1 antes del éxitus?	Estimación días entre la implantación y el P3 ($(P1 * 3) + 21$ días) 	¿Se llegaría a P3 antes del éxitus?	¿Se podría haber logrado una aproximación de medicina personalizada? (P3 + 60 días)
VH-1	R	238	45,5	Sí	158	Sí	Sí
VH-10	R	244	113	Sí	360	No	No
VH-14	D	81	55	Sí	186	No	No
VH-16	D	73	105	No	336	No	No
VH-18	R	340	63	Sí	210	Sí	Sí
VH-20	D	370	86	Sí	279	Sí	Sí
VH-29	R	102	270	No	831	No	No
VH-33	R	184	94	Sí	303	No	No
VH-40	R	121	104	Sí	333	No	No
VH-41	R	73	50	Sí	171	No	No
VH-50	D	490	66	Sí	219	Sí	Sí
VH-54	R	676	88	Sí	285	Sí	Sí
VH-55	R	646	104	Sí	333	Sí	Sí
VH-64	D	228	177	Sí	552	No	No
VH-72	D	1104	165	Sí	516	Sí	Sí
VH-74	R	119	90	Sí	291	No	No
VH-79	D	66	66	Sí	219	No	No
VH-83	R	82	140	No	441	No	No
VH-89	D	311	45	Sí	156	Sí	Sí
VH-94	R	113	232	No	717	No	No
VH-104	R	130	270	No	831	No	No
VH-111	R	26	54	No	183	No	No
VH-113	R	171	40	Sí	141	Sí	No
VH-131	R	47	60	No	201	No	No

R: recaída / progresión / refractariedad

D: biopsia al diagnóstico / cirugía en 1^a línea

Este trabajo de tesis doctoral se ha financiado mediante las generosas donaciones de las familias de algunos de nuestros pacientes y de la organización sin ánimo de lucro "Rotary Club de Barcelona" al Grupo de Investigación "Cáncer y Enfermedades Hematológicas Infantiles" del VHIR. También se ha financiado a través de la acción social corporativa de la *startup* Xenopat S.L. del ICO/Idibell y del proyecto PI21/01661, concedido por el Instituto de Salud Carlos III y cofinanciado por la Unión Europea.

