



Universidad de Navarra

Facultad de Medicina
Universidad de Navarra
Departamento de Neurocirugía

**Desarrollo de un nuevo modelo ortotópico de tumor difuso de
protuberancia (DIPG) en ratón a través de sistema guiado por *bolt*.
Nuevas vías de tratamiento en modelos preclínicos de DIPG.**

**Tesis para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía
presentada por:**

Miguel Marigil Sánchez

Pamplona, 2017

El presente trabajo titulado "Desarrollo de un nuevo modelo ortotópico de tumor difuso de protuberancia (DIPG) en ratón a través de sistema guiado por bolt. Nuevas vías de tratamiento en modelos preclínicos de DIPG " y presentado por Miguel Marigil Sánchez ha sido realizado bajo mi dirección y autorizo su presentación ante el tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, Mayo de 2017

Dra. Marta Alonso Roldán

Dra. Sonia Tejada Solís

A Patricia, para continuar afrontando juntos todos los proyectos por difíciles o lejanos que parezcan

Agradecimientos:

A Marta Alonso, por su trabajo, apoyo y dedicación durante estos años. Gracias por abrirme las puertas de la investigación, sin tus ideas y tu capacidad para sacar lo mejor de un investigador, este proyecto no habría visto la luz.

Al Departamento de Neurocirugía de la Universidad de Navarra por su apoyo para poder dedicar parte de mi tiempo diario en formación translacional.

A Sonia Tejada y Ricardo Díez Valle por mostrarme el camino de la neurocirugía y enseñarme todos los principios de la neurooncología.

A Jorge Guridi por estimularme en todo momento a profundizar en todos aquellos aspectos que siempre se pueden mejorar.

A Naiara, por su paciencia y dedicación. A todos los demás miembros del Laboratorio de Tumores Cerebrales del CIMA: Marisol, Montse, Marc, Javier, Arlet, Mario y Helena. En gran medida todos me habéis ayudado a introducirme en el campo de la investigación preclínica.

A mis padres, Miguel y Eugenia, por su apoyo incondicional. Gracias por inculcarme desde pequeño el hábito del trabajo y sacrificio; sin vosotros no habría llegado donde me encuentro ahora ni podría afrontar los proyectos futuros.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Abreviaturas | 11 |
| 1. Introducción | 15 |
| 1.1 Tumores pediátricos de troncoencéfalo | 16 |
| <u>1.1.1 Epidemiología de los tumores cerebrales pediátricos y tumores de troncoencéfalo</u> | 16 |
| <u>1.1.2 Perspectiva histórica de los tumores de troncoencéfalo</u> | 17 |
| <u>1.1.3 Diagnóstico diferencial de los tumores de troncoencéfalo</u> | 18 |
| <u>1.1.4 Tratamiento de los tumores de troncoencéfalo</u> | 19 |
| 1.2 Gliomas Difusos de Protuberancia (DIPG) | 19 |
| <u>1.2.1 Epidemiología de los DIPG</u> | 19 |
| <u>1.2.2 Comportamiento de los DIPG</u> | 20 |
| <u>1.2.3 Diagnóstico de los tumores difusos de protuberancia</u> | 21 |
| <u>1.2.4 Pronóstico de los pacientes con DIPG</u> | 23 |
| <u>1.2.5 Tratamiento estándar de los tumores difusos de protuberancia</u> | 24 |
| 1.3 Papel de la biopsia en los DIPG | 28 |
| <u>1.3.1 Controversias en la realización de biopsias en lesiones de protuberancia</u> | 28 |
| <u>1.3.2 Técnica quirúrgica de la biopsia para DIPG</u> | 31 |
| 1.4 Caracterización molecular de los tumores pediátricos de alto grado protuberanciales y no-protuberanciales | 34 |
| <u>1.4.1 Limitación de la clasificación histopatológica</u> | 34 |
| <u>1.4.2 Complejidad genética de los DIPG</u> | 35 |
| <u>1.4.3 Mutaciones en vías carcinogénicas canónicas en pacientes con DIPG</u> | 36 |
| <u>1.4.4 Clasificación genética integrada: relación entre genes codificantes de histonas y tumores de troncoencéfalo</u> | 38 |
| <u>1.4.5 Conexión entre regulación de la cromatina y carcinogénesis en DIPG.</u> | 39 |
| <u>1.4.6 Consecuencias oncogénicas de los mecanismos genéticos y epigenéticos de las mutaciones de la histona H3 en DIPG</u> | 41 |
| <u>1.4.7 Otras aberraciones genéticas implicadas en la carcinogénesis del DIPG</u> | 42 |
| 1.5 Sistemas de resistencia farmacológica y administraciones alternativas en el tratamiento de los DIPG | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 1.6 Desarrollo de un nuevo modelo ortotópico de tumor difuso de protuberancia..... | 45 |
| 1.7 Inmunoterapia en los tumores cerebrales | 46 |
| <u>1.7.1 Microambiente tumoral</u> | <u>46</u> |
| <u>1.7.2 Inmunomodulación a través de la modificación de señales activadoras/inhibitorias de los checkpoints del sistema inmune</u> | <u>47</u> |
| <u>1.7.3 Nuevas terapias basadas en el tratamiento inmunomodulador del cáncer: Eficacia en modelos animales preclínicos y aplicación en la investigación clínica.....</u> | <u>49</u> |
| 1.8 Actividad sinérgica antitumoral de la asociación de radioterapia e inmunoterapia..... | 51 |
| <u>1.8.1 Efecto de la radioterapia sobre el sistema inmune</u> | <u>51</u> |
| <u>1.8.2 Papel del coestimulador 4-1BB como modulador de la supervivencia celular: vías de señalización y mecanismo de acción.....</u> | <u>57</u> |
| <u>1.8.3 Asociación del anticuerpo anti-41BB y radioterapia como estrategia terapéutica en un nuevo modelo animal ortotópico de DIPG.....</u> | <u>60</u> |
| 2. Justificación, Hipótesis y Objetivos | 62 |
| 2.1 Justificación..... | 63 |
| 2.2 Hipótesis | 63 |
| 2.3 Objetivos..... | 64 |
| 3. Métodos..... | 66 |
| 3.1 Descripción del sistema de inserción guiada por bolt o tornillo..... | 67 |
| 3.2 Líneas celulares empleadas..... | 67 |
| <u>3.2.1 Línea celular para validación del modelo ortotópico de DIPG</u> | <u>68</u> |
| <u>3.2.2 Línea celular para evaluar el efecto combinado de radioterapia y anticuerpo anti-4-1BB con modelo de ratón inmunocompetente.....</u> | <u>68</u> |
| 3.3 Animales del estudio | 69 |
| 3.4 Tratamiento con radioterapia y anticuerpo anti-4-1BB | 69 |
| <u>3.4.1 Diseño del protocolo de tratamiento con radioterapia: planificación y dosimetría</u> | <u>69</u> |
| <u>3.4.2 Anticuerpo anti-4-1BB</u> | <u>72</u> |
| 3.5 Estudio de supervivencia..... | 72 |

| | |
|--|------------|
| 3.6 Examen anatomopatológico y estudios inmunohistoquímicos | 72 |
| <u>3.6.1 Estudio por inmunohistoquímica de la respuesta inmune inducida en el experimento que evaluaba la eficacia de la combinación de radioterapia y anticuerpo anti-4-1BB</u> | 73 |
| 4. Resultados..... | 74 |
| 4.1 Validación del modelo DIPG: proceso de inserción del bolt y desarrollo del tumor..... | 75 |
| <u>4.1.1 Establecimiento de las coordenadas del modelo DIPG</u> | 75 |
| <u>4.1.2 Técnica de inserción del tornillo</u> | 76 |
| <u>4.1.3 Preparación de las líneas celulares e implantación.....</u> | 77 |
| <u>4.1.4 Evolución después de la cirugía</u> | 78 |
| <u>4.1.5 Desarrollo tumoral, seguimiento y supervivencia de los ratones de la cepa athymic portadores del injerto ortotópico de DIPG.....</u> | 79 |
| <u>4.1.6 Análisis anatomopatológico de los tumores de nuestro modelo ortotópico de DIPG con la línea Tp54.....</u> | 81 |
| 4.2 Tratamiento con radioterapia del modelo inmunocompetente C57BL/6 con la línea celular GL261. Evaluación de la eficacia del anticuerpo anti-4-1BB in vivo. | 83 |
| <u>4.2.1 Tratamiento con radioterapia estándar en monoterapia: escalada de dosis</u> | 83 |
| <u>4.2.2 Evaluación del impacto de la asociación de radioterapia y el anticuerpo 4-1BB en el modelo DIPG</u> | 86 |
| <u>4.2.3 Estudio del efecto de la estimulación inmune antitumoral en ratones de larga supervivencia</u> | 93 |
| 5. Discusión..... | 95 |
| 5.1 Relevancia traslacional de este nuevo modelo ortotópico de DIPG..... | 96 |
| 5.2 Inmunoterapia contra el DIPG: Aplicación de la radioterapia como punto de partida de las respuestas mediadas por el sistema inmune. | 98 |
| <u>5.2.1 Eficacia de la administración de radioterapia en monoterapia</u> | 100 |
| 5.3 Asociación de radioterapia y anticuerpo anti-4-1BB | 102 |
| <u>5.3.1 Impacto traslacional derivado del tratamiento combinado.....</u> | 104 |
| 6. Conclusiones..... | 109 |

7. Bibliografía.....111

Abreviaturas

| | |
|-----------------|---|
| (18)F-FDG | 18-Fluorodesoxiglucosa |
| ACVR1 | <i>Activin A receptor type I</i> |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ATP | <i>Adenosine triphosphate</i> |
| ATRX | <i>Alpha thalassemia/Mental retardation syndrome X-linked protein</i> |
| BHE | Barrera hemato-encefálica |
| BMP | <i>Bone morphogenetic protein</i> |
| CBTRUS | <i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i> |
| CCND | <i>Cyclin D1 protein gen</i> |
| CD | Células dendríticas |
| CDKN2A | <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> |
| CED | <i>Convection enhanced delivery</i> |
| Células NK | Células <i>Natural Killer</i> |
| CMH | Complejo mayor de histocompatibilidad |
| Cociente Co/NAA | Cociente Colina/N-acetil aspartato |
| CPA | Células presentadoras de antígeno |
| CTLA4 | <i>Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4</i> |
| DAAX | <i>Death domain associated protein</i> |
| DE | Desviación estándar |
| ADC | <i>Apparent diffusion coefficient</i> |
| DIPG | <i>Diffuse intrinsic pontine glioma</i> |
| EGFR | <i>Epidermal growth factor receptor</i> |
| ERK | <i>Extracellular signal regulated kinase</i> |
| FOP | <i>Fibrodysplasia ossificans progressiva</i> |
| Gen H3F3A | Gen codificante de la isoforma de histona H3.3 |
| GFAP | <i>Glial fibrillary acidic protein</i> |
| Gy | <i>Grays</i> |
| Gen HIST1H3B | Gen codificante de la isoforma de histona H3.1 |
| HMGB1 | High-mobility group box protein 1 |

| | |
|------------|---|
| ICD | <i>Immunogenic-cell death</i> |
| IFN-gamma | Interferon -gamma |
| IGF1R | <i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i> |
| IL-10 | <i>Interleukin 10</i> |
| JNK | <i>c-Jun N-terminal kinase</i> |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| LTreg | Linfocito T regulador |
| MDSC | <i>Myeloid derived supressor cells</i> |
| MET | Subtipo de receptor tirosin kinasa |
| NF-kB | <i>Nuclear factor kB</i> |
| NFAT | <i>Nuclear factor of activated T-cells</i> |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OS | <i>Overall survival</i> |
| p38 MAPK | <i>p38 mitogen-associated protein kinase</i> |
| PD-1/PDL-1 | <i>Programmed-death receptor/ligand</i> |
| PDGFR | <i>Platelet-derived growth factor receptor</i> |
| PET | <i>Proton emission tomography</i> |
| PFS | <i>Progression free survival</i> |
| PNET | <i>Primitive neuroectodermal tumor</i> |
| PRC | <i>Polycomb repressive complex</i> |
| RB | Retinoblastoma |
| RM | Resonancia magnética |
| RTK | Receptor tirosin kinasa |
| SNC | Sistema nervioso central |
| STING | Vía del estimulador de genes productores de IFN |
| FLAIR | Fluid attenuated inversion recovery |
| TC | Tomografía computerizada |
| TCR | Receptor de células T |
| TERT | <i>Telomerase reverse transcriptase</i> |
| TGF-Beta | <i>Transforming growth factor Beta</i> |
| TIL | <i>Tumor infiltrating lymphocytes</i> |
| TNFR | <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i> |
| TP53 | <i>Tumor protein 53</i> |
| TRAFs | <i>TNFR-associated factors</i> |

VCAM-1

Vascular cellular adhesion molecules type 1

VEGF

Vascular endothelial growth factor

1. Introducción

INTRODUCCIÓN

1.1 Tumores pediátricos de troncoencéfalo

1.1.1 Epidemiología de los tumores cerebrales pediátricos y tumores de troncoencéfalo

Los tumores primarios del SNC constituyen el tumor sólido más frecuente en los pacientes con edades comprendidas entre 0-19 años con una incidencia anual aproximada en Estados Unidos de 5,57 casos por 100.000 habitantes seguidos en frecuencia por la leucemia. En cuanto a la tasa de mortalidad, los tumores cerebrales representan la segunda causa de muerte por cáncer en los pacientes comprendidos en el rango de edad 0-19 años con una tasa anual ajustada por edad de 0,65 por 100.000, sólo superados por la leucemia con una tasa de 0,66 por 100.000. Si nos centramos en el rango de 0-14 años estos tumores pasan a ser la principal causa de mortalidad en relación con cáncer (datos relativos a la población de Estados Unidos, recogidos del CBTRUS Statistical Report) (Figura 1).

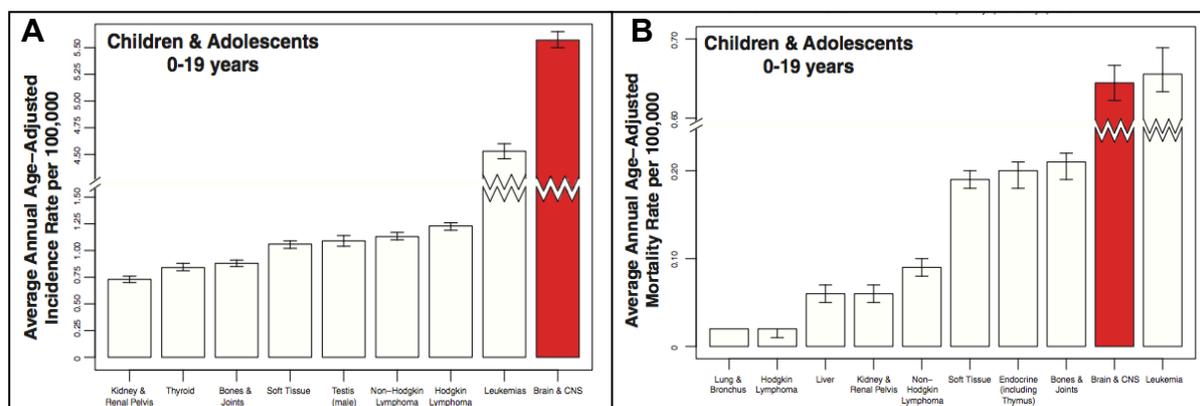


Figura 1. Tasas anuales de incidencia (A) y mortalidad (B) ajustadas por edad de los tumores cerebrales en comparación con otros tumores. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous NPCR/SEER 2008-2012,USCS 2008-2012,NCVS 2008-2012.

Recientemente los estudios moleculares de estos tumores han mostrado que sus características biológicas son totalmente distintas a los tumores homólogos en pacientes mayores de 18 años. A diferencia del adulto, donde el tumor cerebral maligno más frecuente es el glioblastoma multiforme de localización supratentorial, más del 60% de los tumores

INTRODUCCIÓN

pediátricos son de localización infratentorial con un perfil histopatológico compatible con lesiones gliales de bajo grado según la clasificación de la OMS (Organización Mundial de la Salud). En el rango de edades entre 0-14 años los tipos histológicos más frecuentes son los astrocitomas pilocíticos seguidos en frecuencia por los tumores embrionarios y los gliomas malignos. Respecto al grupo de pacientes con edades comprendidas entre 15-19 años los tumores gliales primarios constituyen la entidad más frecuente en este grupo poblacional correspondiendo en el 74% de los casos a lesiones malignas (1).

Entre un 10 y un 20 % de todos los tumores pediátricos se localizan en el tronco-encéfalo y el subtipo difuso de protuberancia representa el 75-80 % de todos ellos. Su tratamiento y pronóstico han permanecido desafortunadamente inalterados durante más de tres décadas (2).

Sin embargo, en los últimos años los esfuerzos de colaboración multicéntrica de varios países han dado sus frutos y han contribuido en el avance de la investigación de los tumores difusos de tronco, aportando un mayor conocimiento acerca del comportamiento y la biología de estos tumores (1, 3).

1.1.2 Perspectiva histórica de los tumores de troncoencéfalo

El primer caso descrito en la literatura de un paciente con un tumor difuso de protuberancia se produjo en 1926 cuando W. Harris y W.D. Newcomb publicaron la historia clínica de un paciente de 14 años que presentaba un cuadro neurológico rápidamente progresivo con afectación de pares craneales bilateralmente y de la vía piramidal que falleció a los pocos meses del diagnóstico. La autopsia reveló una lesión infiltrativa tumoral que desde el interior de la protuberancia se extendía craneal y caudalmente hasta alcanzar el núcleo rojo y la región de la oliva (4).

Hasta la introducción de las pruebas de imagen cerebrales en la década de los 70, todas las lesiones que afectaran al troncoencéfalo se consideraban por igual como integrantes del

INTRODUCCIÓN

mismo grupo tumoral. Sin embargo, a partir de la década de los 80 y tras la mejora de las herramientas diagnósticas por imagen como el scanner y la introducción de la resonancia cerebral, se producen las primeras aproximaciones en el diagnóstico y tratamiento de este tipo de lesiones heterogéneas en cuanto a comportamiento y pronóstico (5).

Tras estos avances que permitieron redefinir la clasificación de los tumores de tronco, se estableció una correlación entre los síntomas que presentaban los pacientes y las características radiológicas de las lesiones que asentaban en cualquiera de las áreas que componen el troncoencéfalo: mesencéfalo, protuberancia y bulbo. Se publicaron las primeras series quirúrgicas de pacientes en los que se definían varios subgrupos tumorales en función de su localización, perfil radiológico e histológico y que presentaban un patrón de comportamiento claramente distinto en cuanto a evolución y mortalidad. De todos ellos, los tumores difusos de protuberancia constituían la única entidad con un comportamiento clínico distinto y sin posibilidad de tratamiento quirúrgico debido a su patrón de crecimiento difuso desde la protuberancia (5, 6).

1.1.3 Diagnóstico diferencial de los tumores de troncoencéfalo

Los tumores de troncoencéfalo son extremadamente infrecuentes en la edad adulta y representan el 10-20 % de los tumores cerebrales de la edad pediátrica. En función de su origen dentro del tronco y de sus características radiológicas, se identifican 5 subgrupos que aglutinan un grupo heterogéneo de entidades histológicas: gliomas tectales, lesiones focales, tumores exofíticos, tumores cervicomedulares y los tumores difusos de protuberancia o DIPG (diffuse intrinsic pontine gliomas) los cuales son objeto de estudio de este trabajo de tesis doctoral (7).

En cuanto al tipo histológico de estos tumores, además de los de origen glial con localización primaria en tronco, se deben diferenciar los tumores primitivos neuroectodérmicos (PNET; primitive neuroectodermic tumors) y otras lesiones no tumorales (lesiones desmielinizantes o

INTRODUCCIÓN

vasculares) con origen en la protuberancia. Estudios histológicos postmortem han demostrado una cifra de hasta un 22 % de lesiones con sospecha de DIPG y con diagnóstico anatomopatológico definitivo de PNET. La importancia en diferenciar las dos entidades radica en que algunos pacientes con PNET de tronco han obtenido supervivencias a largo plazo mayores que los difusos de protuberancia con esquemas de tratamiento que incluían radioterapia y quimioterapia (8, 9).

1.1.4 Tratamiento de los tumores de troncoencéfalo

En función de su localización e infiltración, algunos de estos tumores pueden beneficiarse de una extirpación quirúrgica parcial o total, con un perfil de morbimortalidad bajo y son catalogados por la clasificación de la OMS como tumores gliales de bajo grado. De forma particular los tumores dorsales exofíticos y los cervicomedulares constituyen los subgrupos histológicos con mejor pronóstico y los que además pueden beneficiarse de un tratamiento quirúrgico; por tanto constituyen los subtipos con mejores resultados de supervivencia a largo plazo de todos los tumores de tronco (10, 11).

1.2 Gliomas Difusos de Protuberancia (DIPG)

1.2.1 Epidemiología de los DIPG

Los tumores difusos de protuberancia representan la categoría de tumor de tronco más frecuente (aproximadamente 80% de los tumores gliales primarios en esta localización) y es el segundo tumor cerebral pediátrico maligno más frecuente (2). Se diagnostican alrededor de 200-300 nuevos casos en Estados Unidos cada año, presentando una incidencia aproximada de 1 caso por cada 100.000 habitantes (2, 12). Su tratamiento y pronóstico han permanecido desafortunadamente inalterados durante más de tres décadas siendo la principal causa de muerte por un tumor cerebral en los pacientes pediátricos (2, 12). Aunque el rango de edad en el que aparecen los DIPG se encuentra entre la infancia y la adolescencia, presenta un pico de

INTRODUCCIÓN

incidencia en pacientes menores, en edad escolar, con una mediana de edad de presentación a los 7 años y no muestran predilección por ningún sexo (13).

1.2.2 Comportamiento de los DIPG

En el caso particular de los DIPG, presentan un patrón de invasión difuso dentro de la protuberancia lo que les convierte en lesiones inaccesibles quirúrgicamente. La evolución de estas lesiones difusas se caracteriza por la aparición de un cuadro clínico rápidamente progresivo, en el orden de días o semanas, en un paciente previamente sano en el que se objetiva una imagen radiológica característica que muestra una lesión infiltrativa que expande el tronco desde la protuberancia. Los pacientes con DIPG presentan una latencia corta, normalmente de 2-3 meses, entre la presentación y el diagnóstico (14). La evolución de los síntomas durante más de 6 meses previamente al diagnóstico obliga a buscar una entidad alternativa al considerarse una presentación atípica. La tríada clásica de síntomas incluye: afectación cerebelosa (ataxia, dismetría, disartria), signos por alteración de vías largas (hipertonía, hiperreflexia, clonus, signo de Babinski, déficit motor) y afectación aislada o múltiple de pares craneales de forma uni o bilateral, principalmente parálisis de los pares craneales VI o VII. Sin embargo, esta asociación de síntomas, aunque muy característica, se presenta conjuntamente sólo en el 50 % de los pacientes (2, 15). La diplopía por afectación del VI par craneal es casi siempre el primer signo clínico del DIPG por lo que su presencia, sobre todo asociada a otros déficits neurológicos, es altamente predictiva de la presencia de este tumor. Hasta un tercio de los pacientes presentan síntomas derivados de la hipertensión intracraneal o hidrocefalia secundaria a la obstrucción del acueducto de Silvio por ensanchamiento de la protuberancia (13, 15-17). Otros síntomas más infrecuentes como la alteración del control de esfínteres (en ausencia de una lesión medular asociada) implican la disfunción selectiva por el tumor de los núcleos pontinos implicados en el control de la micción (18).

INTRODUCCIÓN

1.2.3 Diagnóstico de los tumores difusos de protuberancia

El diagnóstico actual de los DIPG se realiza mediante imagen radiológica con resonancia magnética (RM) , ya que estos tumores presentan unos hallazgos radiológicos comunes y muy característicos. Desde 1990, con la generalización de la RM, el papel de la biopsia en los tumores difusos de protuberancia había quedado relegada a un segundo plano, estando sólo indicada cuando la clínica de presentación y/o la imagen radiológica eran atípicas.

Aunque no existen actualmente unos criterios definidos (19), en general se acepta como un diagnóstico altamente probable de DIPG aquellos pacientes con un cuadro clínico de presentación inferior a 3 meses con al menos 2 o 3 síntomas compatibles con afectación del tronco-encéfalo y una resonancia magnética que demuestre una infiltración extensa de más del 55-66% de la protuberancia (17).

En resonancia magnética, estos tumores se comportan como lesiones hiperintensas en secuencias T2 y T2-FLAIR e hipointensas en secuencias potenciadas en T1. La mayor parte de los tumores no captan contraste, aunque en algunos casos se pueden observar lesiones con captación en anillo y una zona de necrosis central (Figura 2). Otro hallazgo muy característico de estos tumores es el desplazamiento o la invasión tumoral rodeando la arteria basilar (20, 21).

INTRODUCCIÓN



Figura 2. RM de un paciente con el aspecto radiológico característico de DIPG. Tanto el corte A, secuencia axial FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery), como el corte B, secuencia potenciada en T2, muestran una lesión expansiva a nivel de la protuberancia que se extiende hacia los pedúnculos cerebelosos y mesencéfalo. El corte C, secuencia potenciada en T1 con contraste (gadolinio), ilustra el patrón heterogéneo de captación de contraste de estos tumores con la posible presencia asociada de un realce nodular situado en este caso en la porción central de la protuberancia.

Estas lesiones pueden invadir estructuras vecinas como el mesencéfalo, tálamo y pedúnculos cerebelosos; el bulbo sin embargo, no suele afectarse de inicio siendo muy característica la existencia de una clara demarcación pontomedular en los cortes sagitales. Esta capacidad para romper e invadir los límites zonales de la protuberancia constituye una ventaja anatómica que contribuye a explicar en parte el perfil difuso de expansión y progresión que presentan. Por el contrario, se ha sugerido que las lesiones benignas de tronco como los tumores cervicomedulares y dorsales exofíticos debido a su patrón de crecimiento lento y no invasivo son más susceptibles de quedar contenidas por las barreras anatómicas que suponen las fibras de decusación pontino-bulbares y cervico-medulares (6).

Por último, la diseminación leptomenígea es un fenómeno infrecuente en el debut de la enfermedad aunque existen casos aislados descritos de diseminación por el neuroeje en el momento inicial del diagnóstico (21, 22). El mecanismo de progresión obedece a su naturaleza de extensión mediante infiltración de estructuras vecinas: pedúnculos cerebrales y tálamo más frecuentemente. En algunos estudios postmortem se ha puesto de manifiesto también la presencia de células tumorales infiltrantes a través del SNC destacando su naturaleza agresiva a través de su gran capacidad de infiltración subaracnoidea sobre todo en

INTRODUCCIÓN

fases avanzadas de la enfermedad, llegando a alcanzar zonas más allá del propio tronco como el cerebelo, tálamo, la corteza supratentorial o la región subventricular. Por tanto, su capacidad de diseminación en fases avanzadas de progresión puede llevarla a cabo a través de una invasión directa, una diseminación leptomenígea o incluso extensión subventricular (23, 24).

Nuevas secuencias de resonancia entre las que se encuentran estudios mediante espectroscopia así como el análisis de secuencias de difusión/ADC o perfusión han permitido caracterizar mejor estas lesiones. De forma particular el estudio mediante espectroscopia uni o multivoxel del tumor supone una herramienta no invasiva que permite el estudio continuo y el análisis in vivo del comportamiento metabólico del tumor, demostrando una relación entre mayor agresividad tumoral y peor pronóstico cuando el cociente Co/NAA se encuentra por encima de 2.1 (25). Por otro lado la aplicación de estas secuencias en la práctica clínica podría contribuir a la medición de la respuesta al tratamiento y la detección precoz de progresión de los pacientes con herramientas diagnósticas no invasivas (26). Por su parte, los estudios de PET que incluyen como parámetro diagnóstico la captación de (18)F-FDG pueden contribuir también a establecer una mejor definición no invasiva del comportamiento metabólico del tumor en toda su extensión a través del tronco facilitando el seguimiento de estos pacientes (27).

1.2.4 Pronóstico de los pacientes con DIPG

Estos tumores representan un gran reto para la neuro-oncología ya que el pronóstico de los tumores difusos de protuberancia no se ha modificado en las últimas 3 décadas, alcanzando unas tasas de mortalidad cercanas al 100% de los pacientes, tasas de supervivencia peores que en cualquier otro subtipo de tumor de tronco (19).

Los tumores difusos constituyen en este momento la principal causa de muerte debida al

INTRODUCCIÓN

diagnóstico de un tumor cerebral en niños con edades comprendidas entre 0-14 años. La mediana de supervivencia sin radioterapia alcanza los 4 meses. Todos los pacientes progresan mostrando una mediana de supervivencia libre de progresión y supervivencia global de aproximadamente 6 meses y entre 8-11 meses respectivamente. Las supervivencia global al año del diagnóstico es del 30% y menor de 10% a los 2 años (17). Los pacientes que han presentado supervivencias por encima de estas medianas, alrededor de un 2-3% de los casos, en su mayoría se describían como lesiones atípicas desde el punto de vista radiológico, que no habían sido biopsiadas y presentaban además una evolución clínica más favorable, por lo que muy probablemente no se correspondían realmente con un verdadero tumor difuso de protuberancia (13, 19, 20).

De entre los hallazgos radiológicos con implicación pronóstica en las secuencias convencionales, se ha demostrado que aquellos pacientes que presentan una captación de contraste presentan tasas de supervivencia inferiores que los pacientes que no presentaban este hallazgo (28, 29).

1.2.5 Tratamiento estándar de los tumores difusos de protuberancia

a) Radioterapia

El tratamiento quirúrgico de los DIPG no es posible debido a su localización profunda en la protuberancia y su naturaleza invasiva lo que dificulta además un acceso apropiado de los distintos regímenes terapéuticos.

El tratamiento mediante radioterapia aplicada sobre la lesión ha constituido el estándar de la terapia de estos pacientes durante más de 50 años (19). Actualmente la radioterapia es administrada a nivel local sobre el área tumoral con un margen de seguridad de 1-2 cm. El esquema terapéutico estándar consiste en la aplicación de 30-33 fracciones diarias de 1.8-2 Gy, 5 veces por semana, alcanzando una dosis total de entre 54-60 Gy. Dicho esquema

INTRODUCCIÓN

obtiene una mejoría clínica hasta en un 70% de los pacientes con respuestas variables al tratamiento que oscilan entre un 40-60% del total de pacientes. Se han administrado dosis máximas de hasta 78 Gy sin demostrar ningún beneficio clínico, pero sí un aumento en la toxicidad derivada del tratamiento (30, 31). Los esquemas de hiperfraccionamiento tampoco han demostrado mayor eficacia comparados con la administración estándar (32).

En este contexto la radioterapia hipofraccionada, constituida por diversos esquemas de aplicación como 45 Gy en 15 sesiones, 44.8 Gy en 16 fracciones , 39 Gy o 33 Gy en 13 fracciones o 21 días, sugieren un potencial beneficio clínico porque acortan la duración del tratamiento, facilitan una retirada rápida de los corticoides en la mayoría de los pacientes y obtienen resultados similares respecto al régimen estándar en cuanto al control sintomático y de la enfermedad, aunque con un discreto descenso en las tasas de supervivencia respecto al esquema convencional.

Sin embargo, la administración del tratamiento reduciendo el número de fracciones del total de la dosis sí ha demostrado su importancia desde el punto de vista de la carga y duración del tratamiento en pacientes pediátricos. Esto es debido a que los esquemas de hipofraccionamiento presentan una duración inferior a 3 semanas en lugar de las 6 del esquema convencional, por lo que consiguen disminuir el número de visitas al hospital reduciendo la duración total de los tratamientos en pacientes pediátricos y sus familias, factor a tener en cuenta en determinadas situaciones (33-35).

Respecto a la respuesta al tratamiento, las tasas de supervivencia libre de progresión (*PFS*) y supervivencia global (*OS*) no diferían mucho del esquema convencional: 5.0 versus 7.6 y 9.0 versus 9.4 meses respectivamente. Por tanto, a similar eficacia existe un aumento de la calidad de vida de los pacientes y sus padres derivado de este régimen, el cual debe ser informado y consensuado con las familias como una posible alternativa válida (34).

INTRODUCCIÓN

Asimismo, dado que la radioterapia constituye actualmente la única alternativa con potencial eficacia, se han intentado añadir al esquema convencional varios agentes radiosensibilizadores, como el cisplatino y motexafin-gadolinio entre otros, sin haberse encontrado ninguna evidencia de beneficio clínico sobre la dosimetría de la radioterapia estándar (20).

La radioterapia también se aplica para la progresión de estos tumores ya que consigue un alivio transitorio de los síntomas neurológicos de los pacientes que se encuentran en progresión clínica y radiológica medible en secuencias potenciadas en T1/T2. En series limitadas de pacientes se ha demostrado que es posible aplicar una reirradiación con un esquema basado en la administración de 18-20 Gy en fracciones de 2 Gy diarios dirigidos focalmente sobre el tumor durante 2 semanas. A pesar del riesgo añadido de toxicidad, el tratamiento ha demostrado en general una adecuada tolerancia, obteniendo una mejoría radiológica en algunos casos y con unas tasas de supervivencia libre de progresión (*PFS*) de entre 4-8 meses, ligeramente superiores respecto a otros esquemas terapéuticos administrados en recurrencia. El grupo de pacientes que más parece beneficiarse de un nuevo ciclo de reirradiación serían aquellos niños con buen estado general que hayan respondido al primer ciclo y con un período prolongado de *PFS* entre ambos ciclos de radioterapia (36, 37).

b) Quimioterapia

De forma paralela a los ensayos con radioterapia, se han llevado a cabo hasta la fecha múltiples ensayos clínicos con una gran variedad de agentes citotóxicos asociados a la radioterapia, sin que ninguno de ellos haya demostrado eficacia clínica significativa. La mayor parte de estos estudios estaban basados en la aplicación de terapias que habían demostrado eficacia en tumores cerebrales del adulto (38-40). A continuación se describen los agentes más relevantes evaluados:

INTRODUCCIÓN

Temozolomida: Esquema consistente en la administración de temozolomida de forma concomitante a la radioterapia y posterior temozolomida adyuvante. Dicho agente alquilante ha demostrado beneficio clínico y adecuada tolerancia en el ámbito de otros tumores primarios agresivos del SNC como el glioblastoma del adulto, sin embargo, no ha aportado ningún beneficio en el tratamiento de los pacientes con DIPG y sí un aumento de la toxicidad, sobre todo hematológica. Las tasas de respuesta y supervivencia del esquema de radioterapia-temozolomida comparadas con controles históricos no alcanzaron la significación estadística ya que presentaban tasas de *PFS* y *OS* de 5-8.8 meses y 7-16 meses respectivamente. Por tanto, este agente citotóxico está actualmente desaconsejado en el tratamiento de estos tumores (41, 42).

Bevacizumab-irinotecán o tipifanib: De manera similar y nuevamente por analogía con los resultados obtenidos en pacientes con glioblastoma, se ha intentado demostrar beneficio de estas asociaciones terapéuticas (43, 44) obteniendo respuestas muy reducidas y a expensas de un aumento del perfil de toxicidad (45).

Nimotuzumab-vinorelbine: La asociación de Nimotuzumab, anticuerpo monoclonal que bloquea la cascada del RTK al inhibir el EGFR, junto con el agente alquilante que modifica la permeabilidad de la BHE (barrera-hematoencefálica) (vinorelbine), han demostrado una eficacia mayor como terapia administrada antes, durante y como consolidación tras la radioterapia respecto a otros esquemas mencionados previamente. En conjunto y dentro del escaso impacto clínico, los resultados del ensayo fase II del grupo de Massimino et al mostraban los mejores resultados de quimioterapia asociada a radioterapia en DIPG, con una mediana de *PFS* y *OS* de 8.5 y 15 meses respectivamente (46).

Nuevos fármacos biológicos en función del perfil genético de los DIPG: Otros esquemas terapéuticos asociados a la radioterapia en primera línea se han estudiado en ensayos clínicos

INTRODUCCIÓN

recientes para intentar explorar su eficacia y seguridad. Algunos ejemplos son los inhibidores de EGFR (erlotinib o gefitinib) (47, 48), inhibidores de VEGF-2 (vandetanib), inhibidor de PDGFR (dasatinib) (49) o interferon alfa pegilado (50). A día de hoy no han supuesto ningún beneficio en cuanto a supervivencia libre de progresión y supervivencia global respecto a otras series históricas de pacientes con DIPG. Dichos agentes y su mecanismo de acción serán analizados de una forma más detallada en el punto que evalúa las vías carcinogénicas implicadas en la generación de los DIPG.

1.3 Papel de la biopsia en los DIPG

1.3.1 Controversias en la realización de biopsias en lesiones de protuberancia

La biología de los DIPG ha permanecido inexplorada hasta hace relativamente poco tiempo. Las biopsias de pacientes con DIPG han sido consideradas durante años por la comunidad médica como una técnica de alto riesgo con escaso rendimiento diagnóstico debido a la heterogeneidad de la lesión, reconociendo su aportación en casos muy seleccionados y atípicos. Teniendo en cuenta además que el pronóstico de estas lesiones es independiente de su grado histológico y que su teórica información no conlleva asociada ninguna modificación en cuanto a su tratamiento, la resonancia ha constituido hasta ahora el método aprobado para su diagnóstico.

La posibilidad de obtener una muestra histopatológica se reducía a los pocos casos en los que se biopsiaban lesiones atípicas y que probablemente en muchos casos no se correspondían con tumores que manifestaran la verdadera naturaleza de los DIPG (31, 51). Todos los esfuerzos terapéuticos dedicados al tratamiento de este tumor han sido muy poco eficaces en gran parte por el escaso conocimiento del que se dispone acerca de los mecanismos moleculares oncogénicos implicados en el desarrollo de los DIPG.

INTRODUCCIÓN

El empeño de varias instituciones por obtener muestras postmortem de DIPG para poder caracterizar estos tumores ha supuesto un gran avance en la última década. Estos estudios procedentes de la autopsia de pacientes fallecidos por DIPG se llevaban a cabo de acuerdo a un estricto protocolo ético y asistencial que incluía seguimiento y soporte de los familiares del paciente. Gracias a estas muestras histológicas, se obtuvieron las primeras caracterizaciones del comportamiento biológico de estos tumores y se han podido desarrollar líneas celulares válidas que han permitido el desarrollo de estudios in vitro, así como el establecimiento de nuevos modelos animales de DIPG (9, 52).

Sin embargo, existe una potencial disparidad en relación con las características mutacionales observadas en las muestras de pacientes tratados y no tratados, pero no se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo para determinar el grado de correlación de las mismas. En esta misma línea y a pesar de que el conjunto de alteraciones mutacionales observadas en muestras de pacientes tratados y no tratados son similares, se ha descrito que las muestras de pacientes sin tratar presentan una tasa global de mutaciones mucho menor que aquellos pacientes tratados con radioterapia (53-55). Por tanto, la necesidad de obtener muestras tumorales originarias del tumor no tratado que permitan definir su perfil genético y así poder establecer hipotéticamente un patrón de mutaciones específico o dianas potenciales sobre las que dirigir una terapia individualizada, ha llevado a reabrir el debate sobre la necesidad de obtener biopsias en los pacientes con DIPG antes de recibir tratamiento.

En el contexto de ensayos clínicos, varios centros especializados a nivel internacional, han demostrado la seguridad y viabilidad de la realización de la biopsia en los pacientes con sospecha diagnóstica de DIPG. Como consecuencia de esta urgente necesidad de estudiar mejor la naturaleza de estos tumores, cuyo tratamiento y pronóstico se han mantenido inalterados durante décadas, la controversia acerca de la realización de las biopsias en

INTRODUCCIÓN

pacientes con DIPG está siendo sustituida por una tendencia a replantear la introducción de un nuevo protocolo de biopsia. La creciente aplicabilidad y precisión de las técnicas de neuronavegación sumada a la mejora de las herramientas diagnósticas de biología molecular han producido tres cambios fundamentales en el abordaje diagnóstico de estas lesiones:

- En primer lugar la realización de una biopsia en pacientes con buen estado neurológico con sospecha diagnóstica de DIPG es un procedimiento seguro, sin mortalidad quirúrgica asociada en manos expertas y con un riesgo de empeoramiento neurológico transitorio que dependiendo de las series se encuentra en torno al 5 % (56, 57).
- En segundo lugar, y contrariamente a lo descrito hasta hace unos años, el rendimiento diagnóstico de estas biopsias se encuentra cercano al 100% (57). Existe un componente de heterogeneidad en estos tumores que se suma a la complejidad para seleccionar una diana quirúrgica, sobre todo si la lesión presenta una zona de captación de contraste o bien un área infiltrante profunda, ya que no siempre es posible obtener muestras de dos regiones distintas del mismo tumor. Sin embargo, el grado histopatológico determinado por la clasificación de la OMS no se relaciona con el pronóstico en estos tumores. Por tanto la opción de llevar a cabo una biopsia debe entenderse en el contexto de algún ensayo clínico que permita al paciente contrarrestar el riesgo de la biopsia con el de recibir un tratamiento experimental, dado que no existe tratamiento eficaz en la actualidad. En este sentido una mejor definición del perfil genético de estos tumores podrá contribuir a la identificación y selección de potenciales dianas terapéuticas personalizadas canalizadas a través de su inclusión en ensayos clínicos controlados y aprobados por un comité ético específico (58).
- Por último, la disponibilidad de muestras procedentes de estos ensayos puede

INTRODUCCIÓN

proporcionar líneas celulares con las que establecer modelos animales que reproduzcan el tumor original y con el potencial beneficio asociado de desarrollar ensayos preclínicos de nuevos agentes terapéuticos con los que testar su eficacia en estudios *in vitro* e *in vivo*. Hasta el momento, se han conseguido desarrollar distintos modelos animales iniciales que han reproducido con éxito las características de los tumores difusos de protuberancia y que constituyen la base sobre la que testar nuevas aproximaciones terapéuticas (51, 56-59).

1.3.2 Técnica quirúrgica de la biopsia para DIPG

La técnica quirúrgica para la aplicación de biopsias estereotácticas de lesiones del troncoencéfalo es un procedimiento con un gran recorrido histórico, descrito por primera vez en 1978 (60). Sin embargo, la introducción y mejora progresiva de las técnicas de imagen supuso un retroceso en la caracterización histológica de las lesiones del tronco ya que se consideraba que el riesgo de la técnica no compensaba el escaso beneficio diagnóstico. Dichas conclusiones fueron remarcadas por el trabajo de Albright et al. del grupo de tumores infantiles, el cual descartaba la utilidad de la biopsia y recomendaba la aplicación sistematizada de la RM para el diagnóstico de lesiones con características propias de DIPG (22). Sin embargo, el hecho de que no existan tratamientos eficaces en estos tumores ha llevado a la comunidad científica a plantearse de nuevo la necesidad de realizar biopsias de estos tumores, y varios centros pediátricos de referencia han perfeccionado sus protocolos de biopsia estereotáctica de dichas lesiones con muy buenos resultados (56, 61). En ellos, los pacientes presentaban unas tasas de mortalidad entre 0-3 %, con una tasa de morbilidad neurológica transitoria cercana al 5 %. En su serie de 2015, Puget et al publicaban por primera vez la realización de biopsias en una serie de 130 pacientes con sospecha inicial de DIPG confirmando la seguridad de esta técnica en centros de referencia con una tasa de mortalidad del 0% y una morbilidad transitoria del 4% (57). De acuerdo a este protocolo, la

INTRODUCCIÓN

biopsia se puede realizar con técnica estereotáctica *frame* o *frameless* (57) y en cualquiera de los dos casos se requiere el establecimiento de unas coordenadas de acuerdo a una prueba de imagen como el TC o RM cerebrales previas a la intervención sobre las que seleccionar la diana que pueda proporcionar el mayor rendimiento y cobertura de la lesión.

En general, la mayor parte de la experiencia acumulada se basa en técnicas de estereotaxia referenciadas en base a la colocación de un frame al paciente. En los casos en los que sea posible es recomendable biopsiar tanto la parte captante de contraste como la zona de tejido tumoral infiltrante, siendo el área más segura la localizada entre el pedúnculo cerebeloso medio y la protuberancia. El rendimiento diagnóstico de estas muestras se encuentra cercano al 100%. Es importante destacar que, de acuerdo con los datos publicados en las series más grandes de pacientes a los que se les realizaba una biopsia por esta técnica, es posible obtener varios cilindros de material con una misma trayectoria para diagnóstico, cultivo celular y extracción de ADN/ARN, sin aumentar con ello el riesgo de complicaciones quirúrgicas (57).

Se han descrito 2 trayectorias para el acceso a lesiones profundas localizadas a nivel del tronco: la ruta supratentorial transfrontal la cual permite alcanzar lesiones localizadas en cualquiera de los segmentos del tronco, y la ruta infratentorial transcerebelosa, siendo ésta última generalmente la más aceptada ya que con un recorrido más corto permite acceder de forma selectiva a la protuberancia, sobre todo a su tercio posterior, a través del pedúnculo cerebeloso medio con lo que se evita atravesar estructuras elocuentes (Figura 3). Además, no se han demostrado diferencias significativas en cuanto a rendimiento histológico y complicaciones entre ambas opciones (57).

INTRODUCCIÓN

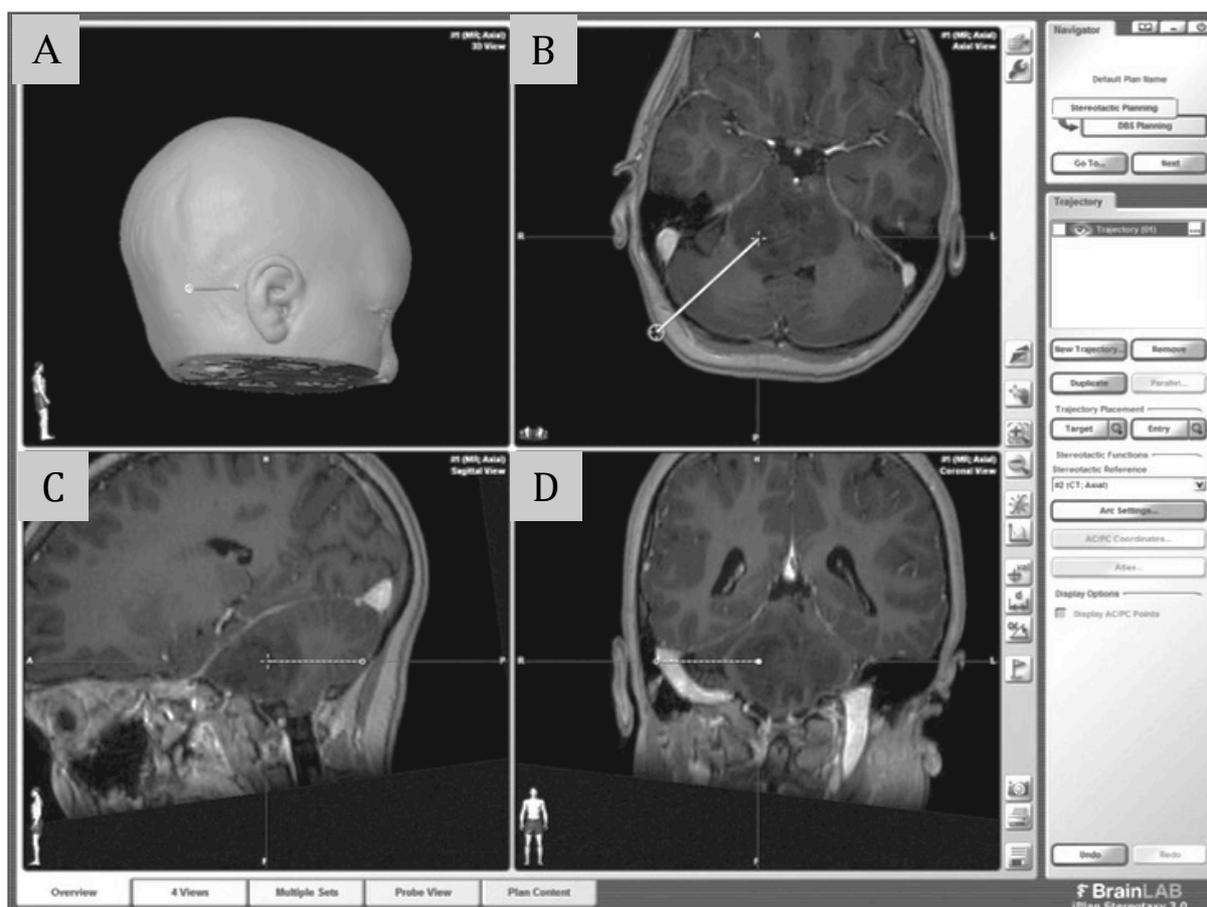


Figura 3. Trayectoria hasta la lesión a través de un abordaje transcerebeloso planificada con el programa de neuronavegación BrainLAB. **A** Reconstrucción 3D. **B** Corte axial correspondiente a la secuencia T1-gadolinio en la que se ilustra la trayectoria de la aguja de biopsia a través del pedúnculo cerebeloso. **C y D** Reconstrucción de la misma secuencia en proyecciones sagital y coronal respectivamente. Puget et al, Childs Nerv Syst (2015).

Por tanto, la realización de la biopsia de pacientes con DIPG constituye una opción relativamente segura y se encuentra respaldada por numeros trabajos de centros pediátricos de referencia. En base a estos datos se pueden plantear ensayos clínicos que incluyan la realización de estas biopsias. La información derivada de las muestras histopatológicas obtenidas constituye un pilar fundamental para establecer una adecuada correlación biológica, guiar la elección de nuevas terapias así como desarrollar nuevos modelos animales consistentes sobre los que apoyar futuras investigaciones (58).

1.4 Caracterización molecular de los tumores pediátricos de alto grado protuberanciales y no-protuberanciales

1.4.1 Limitación de la clasificación histopatológica

De acuerdo con la clasificación previa de la OMS de 2007, los gliomas difusos de cualquier origen constituían un espectro de procesos neoplásicos de origen glial categorizados en cuatro grados de malignidad de acuerdo a unas características morfológicas (presencia de atipias celulares, mitosis, proliferación vascular y/o necrosis). A pesar del cambio que ha supuesto la revisión de la clasificación previa de la OMS en 2016 al tener en cuenta no sólo el aspecto morfológico si no también incluir datos moleculares y genéticos, las descripciones basadas exclusivamente en los hallazgos morfológicos han regulado durante años los estudios llevados a cabo con tumores cerebrales pediátricos (62).

En el caso de los DIPG, la mayor parte de las muestras postmortem evaluadas se clasificaban como astrocitomas malignos grado IV, aunque otras muestras de pacientes con esta entidad mostraban que algunos tumores difusos de protuberancia eran clasificados como lesiones de grado III o incluso grado II (63).

Como se ha comentado previamente la mayoría de tumores de bajo grado se encuentran en pacientes pediátricos de forma comparativa con el predominio de los altos grados en el adulto y con un comportamiento en general benigno. Sin embargo, los tumores difusos de protuberancia, aunque histológicamente puedan mostrar características de gliomas de bajo grado, presentan el mismo comportamiento agresivo que los glioblastomas del adulto. Con el objetivo de evaluar su comportamiento biológico, los estudios moleculares de pacientes pediátricos han reunido datos procedentes de muestras de los tumores difusos de protuberancia y de aquellos tumores pediátricos de alto grado no protuberanciales debido a su similitud histológica y comportamiento clínico agresivo en común.

INTRODUCCIÓN

1.4.2 Complejidad genética de los DIPG

La aplicación sistematizada de las técnicas de biología molecular en las muestras de los pacientes con DIPG ha supuesto una revolución en el conocimiento de esta entidad. En primer lugar el análisis del genoma de pacientes con DIPG puso de manifiesto la detección de diferencias en la expresión génica de aquellos tumores de protuberancia comparados con astrocitomas grado IV no protuberanciales de pacientes adultos y pediátricos, demostrando que aunque los tumores de alto grado en estos grupos poblacionales comparten características histopatológicas similares, en realidad corresponden a entidades biológicas totalmente distintas reguladas por procesos moleculares y oncogénicos diferentes entre cada uno de ellos (63, 64).

En primer lugar, entre los hallazgos encontrados destaca una sobreexpresión significativamente elevada de los pacientes con DIPG, comparados con glioblastomas supratentoriales del adulto, de la familia de los receptores de Tirosin-Quinasa (RTK): PDGFR-alfa, MET e IGF1R (65).

En segundo lugar, la secuenciación genómica completa de exones (Whole-Exome Sequencing) procedentes de muestras de pacientes pediátricos con tumores gliales difusos de alto grado protuberanciales y no protuberanciales, identificó por primera vez la presencia de la mutación del gen H3F3A que codifica la variante de la histona H3.3, siendo ésta la primera vez en biología que se describe una patología neoplásica en humanos producida por mutaciones en genes codificadores de histonas. Este hallazgo representa una huella molecular de gran relevancia ya que sus genes codificadores han sido considerados siempre como estructuras biológicas altamente estables y conservadas en todas las células eucariotas. Dicha mutación conlleva asociada la sustitución de dos amino-ácidos importantes en la porción distal de los telómeros: K27M que conlleva la sustitución de un residuo de lisina por metionina y G34V/R que implica sustitución de glicina por valina y/o arginina. Dichas

INTRODUCCIÓN

mutaciones están implicadas en la modificación del proceso regulatorio de la transcripción génica mediado por las histonas (66).

Por otro lado, otros estudios de muestras procedentes de biopsias de pacientes con DIPG han aplicado distintas técnicas con el objetivo de establecer un perfil molecular integrado que permita definir patrones representativos de expresión génica, encontrando diferencias clave al compararlos con los resultados de pacientes con tumores de alto grado no protuberanciales de pacientes adolescentes y adultos. Como hallazgo relevante dichos estudios han permitido detectar 2 grupos de DIPG que muestran un perfil genético diferente.

-Por un lado, el grupo asociado con un fenotipo mesenquimal relacionado con sobreexpresión de genes proangiogénicos y más cercano a un perfil astrocitario.

-Por otro, el grupo caracterizado por un fenotipo oligodendroglial regulado por una sobreexpresión del perfil PDGFR y proneural, siendo éste último el que ha mostrado un peor pronóstico comparado con el fenotipo mesenquimal.

De forma diferencial el grupo oligodendroglial se comporta como una lesión de peor pronóstico remarcando nuevamente las diferencias moleculares existentes con los tumores del adulto. Esta diferencia es reforzada por el hallazgo infrecuente de las mutaciones de IDH1/2 y 1p-19q en pacientes con DIPG, mutaciones por otro lado comunes en el adulto, asentando el conocimiento de que los procesos regulatorios de la oncogénesis existentes entre ambos grupos poblacionales son completamente diferenciales (67).

1.4.3 Mutaciones en vías carcinogénicas canónicas en pacientes con DIPG

Los tumores pediátricos de alto grado, entre los que se incluyen los difusos de protuberancia muestran también similitudes en cuanto a alteraciones genéticas implicadas en las vías carcinogénicas del glioblastoma del adulto. Entre ellas la modificación de la vías RTK-RAS-PI3K-AKT, RTK-RAS-BRAF, TP53 y la vía del RB (63, 66) (Figura 4).

INTRODUCCIÓN

El PDGFR-alfa es el subtipo de RTK más comúnmente alterado en estos pacientes, mientras que dentro de dicha cascada, la mutación del gen supresor PTEN y del receptor EGFR, aunque frecuentes en el adulto, son relativamente raros en estos tumores pediátricos. La amplificación del subtipo de RTK MET o IGF1R también se ha asociado con estos tumores. Por su parte la mutación del FGFR1 (receptor para el factor de crecimiento de los fibroblastos) se ha identificado en tumores pediátricos talámicos pero no en los tumores localizados en hemisferios cerebrales. Por último, la mutación BRAF V600E se detecta en 10 % de los tumores pediátricos hemisféricos pero no se ha detectado en los casos de DIPG (68).

En el caso de la vía del TP53, dicha mutación se ha identificado hasta en un 55 % de los tumores de alto grado pediátricos y concretamente en un 42% de los DIPG. La vía del RB se encuentra afectada con menor frecuencia en tumores pediátricos de alto grado que en los adultos (66).

De forma similar a la baja frecuencia de alteraciones presentes en la cascada del TP53, en el caso de la vía del RB las deleciones de CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) están presentes en un 25 % de los tumores de alto grado no tronco-encefálicos pero son extremadamente infrecuentes en DIPG. Por el contrario, se han identificado amplificaciones focales de CDK4, CDK6 o las ciclinas CCND1, CCND2 o CCND3 en tumores pediátricos de alto grado de todas las localizaciones. Estas subunidades son componentes del complejo cyclin-CDK que producen una fosforilación a nivel del checkpoint-G1 de la vía del RB (64, 66, 69, 70).

INTRODUCCIÓN

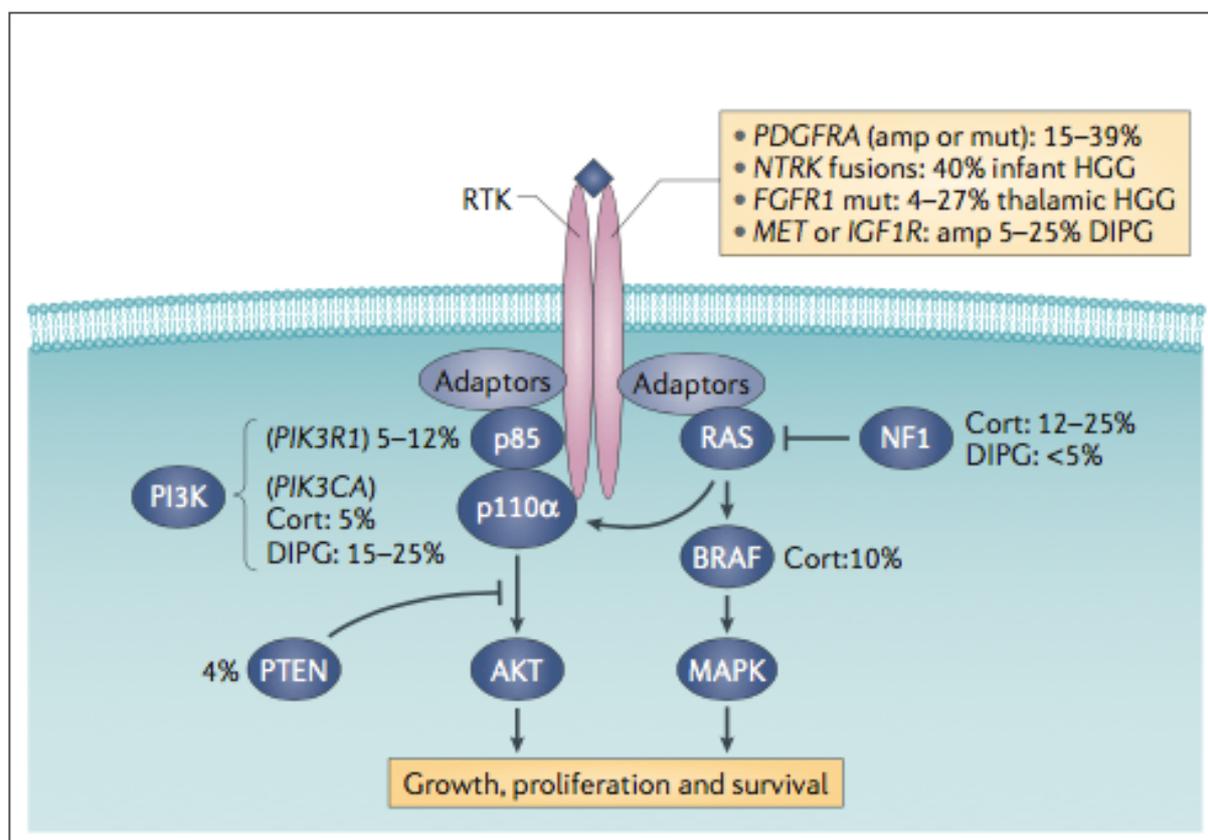


Figura 4. Mutaciones recurrentes en vías carcinogénicas de RTK-AKT y RTK-RAS-MAPK implicadas en tumores pediátricos de alto grado. La unión de los distintos factores de crecimiento al RTK desencadena la activación de varias vías de señalización a través fundamentalmente de dos de sus componentes, PI3K y MAPK. En este esquema se representa el porcentaje de las distintas mutaciones que con mayor frecuencia están implicados en los procesos que regulan la carcinogénesis de los tumores pediátricos de alto grado y DIPG. S. Baker et C Jones, Nature Reviews (2014).

El descubrimiento de este conjunto de alteraciones moleculares específicas, de los que se desconoce exactamente el papel directo que juegan en la tumorigénesis del DIPG, representan potenciales marcadores diagnósticos y pronósticos así como futuras dianas susceptibles de ser modificadas con nuevos agentes terapéuticos.

1.4.4 Clasificación genética integrada: relación entre genes codificantes de histonas y tumores de troncoencéfalo

El descubrimiento de la implicación de genes codificadores de histonas pone de manifiesto los distintos procesos biológicos que regulan la génesis tumoral entre los gliomas supratentoriales de alto grado de adultos y los pacientes pediátricos con tumores de alto grado, particularmente en los tumores difusos protuberanciales.

INTRODUCCIÓN

Estudios de secuenciación genómica más exhaustivos han permitido explorar y ampliar con más detalle estas mutaciones oncogénicas implicadas en los tumores de alto grado de pacientes pediátricos (hasta ahora clasificados morfológicamente como astrocitomas grado III/IV) identificando alteraciones moleculares recurrentes y específicas que pueden resumirse en 2 características fundamentales que constituyen la huellas moleculares de estos tumores: en primer lugar dichos marcadores genéticos varían de forma individualizada en función de la localización anatómica del tumor y en segundo lugar estas huellas genéticas han permitido establecer una clasificación entre grupos de mejor o peor pronóstico además de presentar una variabilidad en relación con la edad de presentación (71).

1.4.5 Conexión entre regulación de la cromatina y carcinogénesis en DIPG.

Los estudios de secuenciación avanzados han descrito mutaciones en los genes de la histona H3F3A e HIST1H3B las cuales codifican para las variantes de la histona H3.3 y H3.1 respectivamente. La frecuencia de dichas alteraciones es del 70 % y 18 % en las principales series analizadas de los pacientes con DIPG respectivamente. La isoforma H3.1 se sintetiza durante la fase S del ciclo celular para compactar el DNA mientras que la isoforma H3.3 es producida a lo largo de todo el ciclo para reemplazar las histonas perdidas durante los procesos en los que se alteran los nucleosomas (72, 73).

Como se ha introducido anteriormente, las mutaciones de la histona H3 pueden tener lugar en dos residuos de la porción amino-terminal de los telómeros resultando en la sustitución de dos aminoácidos: sustitución de un residuo de lisina por metionina (K27M) y sustitución de glicina por valina o arginina (G34V/R). Dichas mutaciones dan lugar a cambios en la modificación del proceso regulatorio de la transcripción génica en el que están implicadas las histonas. Es destacable que dichas mutaciones presenten una correlación anatómica, la cual proporciona mayor evidencia a la teoría de que la patogénesis molecular de los DIPG es

INTRODUCCIÓN

significativamente diferente no sólo del adulto si no de la de sus homólogos pediátricos localizados a nivel de los hemisferios cerebrales.

La mutación K27M se ha identificado en un 78 % de los DIPG así como en otros tumores de línea media incluyendo el tálamo (asociado además de manera particular a la mutación del FGFR-1) y menos frecuentemente en cerebelo y la médula espinal. Esta mutación se encuentra asociada en su mayor parte al gen H3F3A codificante de la variante H3.3 y sólo en un 25 % con la variante H3.1 (63) (Figura 5).

Por el contrario, la mutación G34V/R es casi exclusiva del gen H3F3A y restringida a los tumores pediátricos de alto grado hemisféricos, aunque también se ha descrito en pacientes mayores de hasta 30-40 años (63, 64, 74, 75).

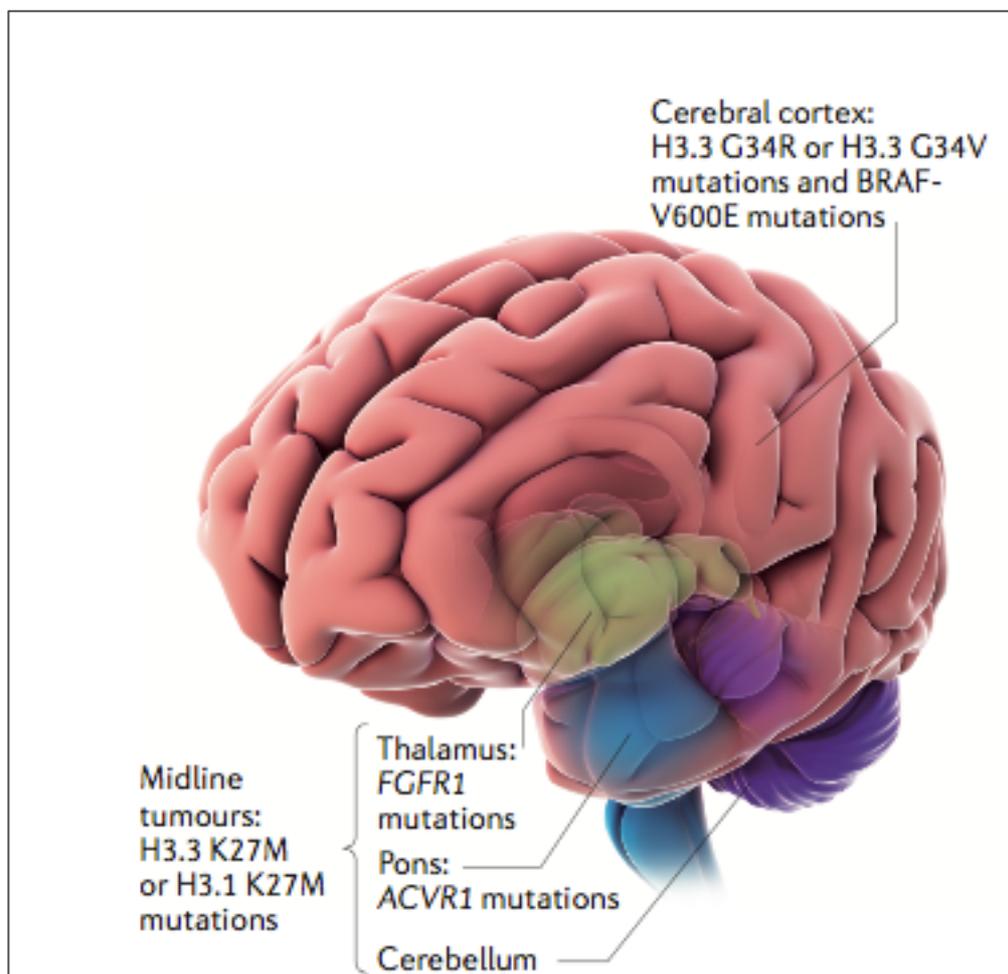


Figura 5. Distribución regional de las mutaciones selectivas en tumores de alto grado pediátricos protuberanciales y no protuberanciales. Las mutaciones de la histona H3.3 G34 V/R y BRAF V600 E se

INTRODUCCIÓN

detectan fundamentalmente en tumores corticales, mientras que la mutación de la histona 3 K27M se identifica preferentemente en tumores de línea media, con la mayor frecuencia asociada en los DIPG. Por su parte, la mutación de ACVR1 es exclusiva de DIPG y la mutación del FGFR1 de los tumores talámicos. S. Baker et C Jones, Nature Reviews (2014).

Además de una división anatómica, las mutaciones en genes reguladores de histonas también presentan una diferente segregación respecto a la edad de presentación ya que los casos producidos por mutaciones K27M se diagnostican en pacientes con una mediana de edad de 6-7 años comparado con los 13-14 años al diagnóstico de las mutaciones G34V/R. Respecto al impacto pronóstico, aquellos pacientes con mutaciones K27M presentan una mediana de supervivencia menor, de 12 meses, respecto a la mediana de 24 meses del grupo asociado a la sustitución G34V/R (69, 71).

1.4.6 Consecuencias oncogénicas de los mecanismos genéticos y epigenéticos de las mutaciones de la histona H3 en DIPG

Como se ha comentado previamente los dos aminoácidos susceptibles de sufrir una mutación se localizan en la cola de las histonas influyendo en última instancia en los cambios post-transcripcionales de la porción terminal de las mismas. Las histonas constituyen un elemento regulador que ejerce un control fino en la transcripción génica. De forma habitual la porción terminal de las histonas experimenta modificaciones post-transcripcionales a través de varios procesos como la metilación, acetilación, ubiquitinación o marcaje de residuos de lisina así como fosforilación. Las enzimas responsables de catalizar la adición o retirada de estas partículas se denominan elementos modificadores de la cromatina o *cromatin writers/erasers*. Todas estas modificaciones influyen en el grado de compactación de la cromatina y en la configuración tanto estructural como funcional de los nucleosomas afectando en último lugar a los procesos de transcripción génica. Se han descrito una gran variedad de mutaciones en

INTRODUCCIÓN

cada uno de estos niveles de regulación de la cromatina implicados en la génesis de distintos tipos de tumores (72, 73).

En el caso particular de la mutación K27M, presenta consecuencias en el control de la expresión génica. De forma resumida, en condiciones normales el residuo K27 es trimetilado interactuando con el complejo denominado Polycomb repressive complex 2 (PRC2) para frenar la transcripción de genes concretos. La sustitución del residuo de lisina por metionina producida por la mutación K27M evita que se produzca esta trimetilación modificando la expresión de todas las isoformas de la proteína H3. Finalmente, dicho estado de hipometilación es el responsable de la activación de diversos genes poniendo de manifiesto la compleja interacción entre fenómenos genéticos y epigenéticos que regulan la histonas (63).

1.4.7 Otras aberraciones genéticas implicadas en la carcinogénesis del DIPG

Además de las mutaciones específicas en genes codificadores de histonas, se han descrito otras alteraciones en distintos procesos reguladores de la cromatina como las chaperonas de histonas ATRX o DAAX que se encuentran mutadas en el 15-25 % de los tumores de alto grado simultáneamente con G34R o G34V. Dichas proteínas están implicadas en la unión de la heterocromatina de la región telomérica a la variante de histona H3.3. Tanto la afectación del gen H3F3A, como ATRX o DAAX están fuertemente asociados con procesos alternativos de prolongación de los telómeros independientes de la enzima telomerasa. Por otro lado cabe señalar que aunque las mutaciones del promotor de TERT como mecanismo de elongación de los telómeros dependiente de la telomerasa constituyen un hallazgo muy frecuente en el glioma del adulto, éstas sólo se detectan en un 3 % de los tumores pediátricos.

Además y de forma característica, se han descrito mutaciones de las enzimas catalizadoras conocidas como *writers* o *erasers* en todos los residuos de lisina modificados en la cola de la

INTRODUCCIÓN

histona 3 a excepción de K27, poniendo de manifiesto que la afectación del residuo K27 en los tumores pediátricos de alto grado y DIPG se manifiesta exclusivamente a través de la mutación de la Histona 3 (66).

Otro marcador de la singularidad genética de los tumores difusos de protuberancia ha consistido en la detección de la mutación del gen que codifica para el receptor BMP de la activina A tipo 1 (ACVR1) en un 24 % de los DIPG. Esta alteración representa una variante exclusiva de estos tumores de tronco (Figura 5) (70). Además, presenta una predominancia por el sexo femenino, se encuentra asociada al diagnóstico de la lesión en edades más tempranas y los tumores en los que se detecta presentan unas tasas de supervivencia algo mayores que los controles de series históricas, 14.9 comparado con 10.9 meses de supervivencia global en los casos mutados y no mutados respectivamente.

Esta mutación se había identificado previamente en pacientes con Fibrodisplasia Osificans Progresiva (FOP), enfermedad caracterizada por la formación de focos de osificación heterotópicos en tejidos blandos que condicionan deformidades óseas severas. De forma característica los pacientes con FOP no presentan ninguna predisposición al cáncer, a pesar de que comparten la presencia de mutaciones idénticas a las encontradas en pacientes con DIPG. Este hallazgo sugiere que la vía del ACVR1 supone una ventaja selectiva cuando se combina con otras alteraciones, más que una mutación con potencial carcinogénico directo (55, 70).

1.5 Sistemas de resistencia farmacológica y administraciones alternativas en el tratamiento de los DIPG

A pesar de los múltiples ensayos clínicos y tratamientos experimentales evaluados hasta la fecha, la radioterapia es desafortunadamente el único tratamiento que actualmente obtiene una mejora de la supervivencia de los pacientes sin perder de vista que se trata de una terapia

INTRODUCCIÓN

fundamentalmente paliativa.

Los nuevos descubrimientos clínicos y biológicos han cambiado el panorama del armamentario terapéutico ya que las alteraciones moleculares específicas de estos tumores permiten el acceso a nuevas terapias selectivas y dirigidas a una diana específica. Sin embargo, la utilización de pequeñas moléculas inhibitorias de las vías de señalización por ejemplo de EGFR (erlotinib, gefitinib), PDGFR (dasatinib), RAS (tipifarnib) y VEGF (vandetanib) entre otros, no han demostrado eficacia clínica. Posibles razones para la respuesta negativa de estas terapias podría ser multifactorial e incluyen: la selección inadecuada de mutaciones diana no implicadas directamente en la carcinogénesis del tumor, inaccesibilidad de la BHE o el desarrollo de resistencias secundarias a través de proteínas transportadoras (44, 47-50, 76).

Debido a esta resistencia innata de los DIPG a los distintos tratamientos a pesar de terapias individualizadas, en el futuro los ensayos clínicos deberán plantearse la utilización combinada de múltiples terapias específicas con el objetivo de aumentar su eficacia al incrementar la cobertura de dianas moleculares. Por ejemplo, recientemente se ha descrito el potencial beneficio de la aplicación combinada de inhibidores de la enzima acetiltransferasa de histonas (panobinostat) junto con los inhibidores de la demetilasa de histonas, asociación que ha demostrado eficacia en experimentos *in vitro* y en modelos animales ortotópicos de DIPG (77, 78).

Otro de los factores implicados en la resistencia terapéutica podría ser la dificultad de la penetración de los fármacos en la protuberancia y sobre todo a nivel intratumoral. Este mecanismo puede verse favorecido por la relativamente intacta BHE en el caso de los DIPG como sugiere su limitada capacidad para la captación de contraste (22).

Además de la BHE, otro obstáculo implicado en su resistencia es la expresión de proteínas

INTRODUCCIÓN

transportadoras de fármacos bien en las células tumorales o en las endoteliales, tal y como se ha demostrado en ensayos in vitro. Por tanto, recientemente se han estudiado vías alternativas de administración de nuevas terapias que permitan mejorar la capacidad de penetración, como por ejemplo la aplicación de fármacos por vía intranasal. Dicho sistema constituye una vía muy específica para la difusión de las potenciales terapias desde las fosas nasales, a través del espacio subaracnoideo que conecta con las terminaciones del bulbo olfatorio y el nervio trigémino hasta alcanzar las cisternas del troncoencéfalo. Este sistema sólo ha demostrado hasta ahora una adecuada distribución farmacológica y efecto citotóxico en modelos animales.

Otra forma de mejorar la penetración de las terapias es la administración directa intracerebral, mediante catéteres, ya sea en una sola infusión o de forma continua vía *CED (Convention Enhanced Delivery)*, a través de un catéter de infusión intracraneal, el cual aunque no ha demostrado beneficio clínico hasta el momento porque no existe el fármaco adecuado, sí ha mostrado que se trata de una técnica segura y que ha conseguido mejorar el perfil farmacodinámico de las terapias administradas (79-81).

1.6 Desarrollo de un nuevo modelo ortotópico de tumor difuso de protuberancia.

La disponibilidad de nuevas líneas celulares de pacientes con DIPG y su mayor conocimiento genético, han favorecido un rápido desarrollo de nuevos modelos animales preclínicos, los cuales han supuesto un nuevo paso en el avance del conocimiento acerca de los mecanismos y alteraciones que subyacen en este tumor así como en la valoración de nuevas terapias. Durante los últimos años se han desarrollado varios modelos ortotópicos murinos que reproducen de una manera consistente la naturaleza difusa de la invasión de la protuberancia con distintas líneas celulares de glioma. Dichos experimentos se han llevado a cabo con la

INTRODUCCIÓN

ayuda de un sistema de estereotaxia con el objetivo de administrar la línea celular correspondiente en una región concreta del tronco del animal a través de una aguja guiada por un sistema exacto de coordenadas previamente establecidas. Además de su reproducibilidad y precisión, estos experimentos han permitido valorar la eficacia de distintas terapias asociadas a la radioterapia (74, 82-84).

A pesar de estar basado en una guía de administración precisa y de constituir una técnica validada, consideramos este procedimiento muy costoso debido al tiempo de ejecución necesario para llevar a cabo el experimento en cada animal, así como por el coste derivado del consumo de recursos humanos y materiales. Otra limitación añadida es su capacidad reducida para estudiar un gran número de animales por experimento, debido al tiempo necesario para administrar un nuevo fármaco o aplicar una terapia génica específica en la misma diana tumoral en todos los individuos de cada grupo. Todo ello contribuye a que la experimentación preclínica pueda verse dificultada en algunos casos concretos con este esquema y se necesiten desarrollar nuevos modelos animales.

1.7 Inmunoterapia en los tumores cerebrales

1.7.1 Microambiente tumoral

El concepto clásico que concebía el SNC como una región inmuno-privilegiada con escasa capacidad efectora de la respuesta inmune, ha sufrido un cambio puesto que actualmente dicha denominación es considerada como una caracterización imprecisa del microambiente tumoral. De este modo, experimentos recientes han demostrado que los procesos de salida y entrada tanto de células como de moléculas solubles a través de la BHE son regulados de forma dinámica tras la activación del sistema inmunitario, resaltando el carácter variable y regulable de la respuesta inmune a nivel del SNC (85).

INTRODUCCIÓN

Mientras que la ausencia del sistema tradicional de drenaje linfático contribuía a este concepto estático de la respuesta inmune a nivel cerebral, actualmente ha quedado ampliamente demostrada no sólo la entrada al cerebro de elementos de la respuesta celular y molecular, si no también se ha descrito la salida de antígenos tumorales que alcanzan ganglios linfáticos periféricos, sobre todo a nivel cervical, a través de los espacios de Virchow-Robin perivasculares. Además, se ha descrito el transporte antigénico mediado a través del líquido cefalorraquídeo (LCR) desde la fosa cribosa a la submucosa nasal (86).

Sin embargo, y a pesar de la redefinición de esta respuesta inmune dinámica que tiene lugar a nivel cerebral, se desconoce si la respuesta antitumoral es iniciada localmente a nivel cerebral o por el contrario se produce originariamente a nivel del sistema inmune periférico.

1.7.2 Inmunomodulación a través de la modificación de señales activadoras/inhedoras de los checkpoints del sistema inmune

El conjunto de alteraciones genéticas y epigenéticas asociadas al cáncer, y en nuestro caso particular a los tumores cerebrales de la protuberancia, proporcionan una gran variedad de antígenos que el sistema inmune puede utilizar para distinguir células tumorales de sus homólogas sanas. En el caso de las células T, la calidad y amplitud de la respuesta inmunitaria, iniciada por el reconocimiento de antígenos tumorales por el receptor de las células T (TCR), está regulada por el equilibrio entre señales reguladoras con capacidad activadora e inhibitoria (constituyentes de los denominados check-points del sistema inmune). En condiciones normales dichas señales contribuyen al mantenimiento de la autotolerancia, prevención de la auto-inmunidad y protección de los tejidos sanos cuando el sistema inmune es activado.

La expresión de estas proteínas encargadas de la homeostasis del sistema inmunitario puede verse afectada por células tumorales, como un mecanismo de inmuno-resistencia. Otros mecanismos de inmunoresistencia incluyen la linfopenia, la disminución de la capacidad de

INTRODUCCIÓN

síntesis de anticuerpos, el aumento de citoquinas inmunosupresoras (Il-10, TGF β), el aumento de expresión de moléculas inhibitorias de células T (FasL and PDL-1) y el reclutamiento de células T reguladoras así como de las células derivadas de mieloides supresoras (*myeloid derived supressor ; MDSC*).

Las terapias dirigidas contra dianas concretas que regulan el complejo armamentario del sistema inmune están basadas en el principio de que a mayor infiltración linfocitaria intratumoral, mayor es la probabilidad de producir una regresión tumoral al contrarrestar el microambiente de inmunoresistencia (87). Por este motivo, las células T constituyen los elementos principales y más susceptibles de modificación terapéutica, ya que además presentan unas características de presentación antigénica y respuesta específicas: capacidad de reconocimiento y destrucción selectiva mediados por antígenos tumorales (células T CD8+) y posibilidad de orquestar todos los elementos reguladores del sistema innato y adaptativo a través de los subtipos T CD4+. Recientemente se ha descrito un tercer mecanismo denominado '*cross-presentation*', donde los antígenos tumorales procedentes de células tumorales alteradas por una respuesta efectora inicial, son presentados por moléculas del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad o *major histocompatibility complex*) tipo I a los linfocitos T CD 8 +, reconduciendo la respuesta adaptativa de forma específica hacia las células tumorales (86).

Por tanto, la interacción entre agonistas de receptores co-estimuladores y los antagonistas de señales inhibitorias resultan finalmente en la amplificación de respuestas específicas de células T que son antígeno-selectivas y por tanto susceptibles de ser aplicadas como tratamiento inmune antitumoral para distintas entidades oncológicas.

Entre el conjunto de ligandos-receptores que influyen en estos mecanismos y que han sido objeto de investigación reciente como terapia inmune en distintos modelos tumorales se encuentran: antagonistas de señales inhibitorias como CTLA4, PD1-PDL1 o co-

INTRODUCCIÓN

estimuladores de señales activadoras como CD27-CD70, 41BBL(CD137L)-41BB y OX40L-OX40 (88).

1.7.3 Nuevas terapias basadas en el tratamiento inmunomodulador del cáncer:

Eficacia en modelos animales preclínicos y aplicación en la investigación clínica

Estudios recientes con modelos murinos ortotópicos supratentoriales de glioblastoma han demostrado un beneficio en la supervivencia de los animales tratados con anticuerpos anti-CTLA4 o anti-PD1/PDL1. El beneficio de bloquear estos receptores y ligandos implicados en la inhibición del sistema inmune es consecuencia del aumento de la infiltración tumoral de linfocitos T CD4 + y CD 8 + así como una disminución de los linfocitos T reguladores (T reg). Ambos anticuerpos se diferencian en la fase de activación del sistema inmune sobre el que actúan: mientras que el anticuerpo anti-CTLA4 ejerce su efecto en fases tempranas, los anti-PD1/PDL1 presentan un patrón de acción en fases más tardías de la activación del sistema inmune (89-91). Estos resultados han motivado su traslado al campo de la investigación clínica y en la actualidad existen varios ensayos que incluyen estas moléculas para el tratamiento del glioblastoma del adulto e incluso específicamente un estudio fase II (NCT01952769) que evalúa la eficacia y seguridad de la administración de una molécula con mecanismo anti-PD1 (Pidizilimumab) en pacientes con DIPG (87, 89-91).

Otro tratamiento inmunomodulador que se está investigando es el anticuerpo anti-4-1BB. 4-1BB es un receptor glicoproteico transmembrana miembro de la superfamilia del TNFR (*tumor necrosis factor receptor*) que incluye entre otros componentes al receptor FAS, CD40, CD27 y CD30 (Figura 6). Su mecanismo de acción específico así como su aplicación como inmunoterapia del cáncer serán revisados con mayor profundidad más adelante. De forma resumida, dicha proteína es expresada en la superficie de células activadas T CD4 +, T CD8 + así como en otros componentes del sistema inmune como células NK, células dendríticas y

INTRODUCCIÓN

neutrófilos. La unión del ligando de 4-1BB que se encuentra en la superficie de macrófagos activados, células B y células dendríticas, con su receptor linfocitario, desencadena una cascada de señalización a través de la vía NFAT, c-JUN y p38 que conduce finalmente a la proliferación de linfocitos T citotóxicos (CD 8+). Además, promueve la activación de células T helper lo cual induce un aumento de la producción de IFN-gamma, una citocina efectora del sistema inmune. En caso necesario, la unión de esta molécula coestimuladora a su receptor es capaz de reforzar la estimulación de una respuesta inmune subóptima porque a diferencia de los inhibidores arriba mencionados (CTLA4 y PD1), esta molécula es una activadora de la regulación del sistema inmune mediando en señales de supervivencia y proliferación de células T CD8 +.

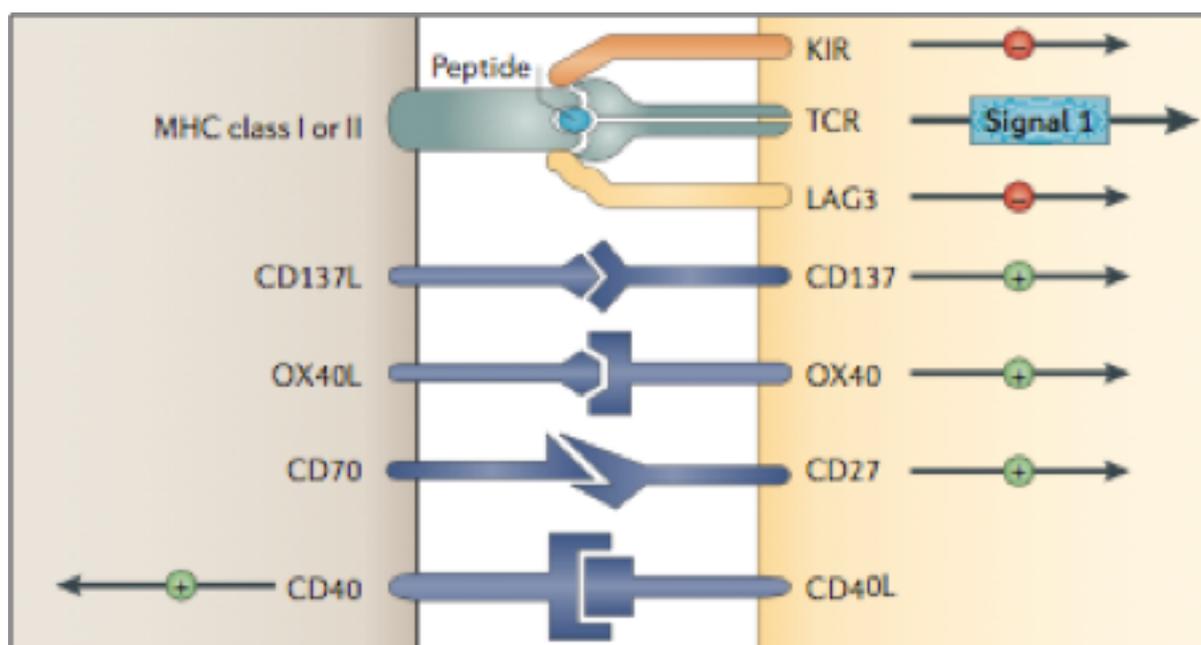


Figura 6. Principales interacciones coestimuladoras ligando/receptor entre miembros de la familia del TNFR que facilitan la activación de células T tras la señal iniciadora por la interacción de MHC-TCR. D.Pardoll, Nature Reviews(2012).

Los anticuerpos anti-4-1BB han demostrado su eficacia en combinación o en monoterapia para producir una regresión tumoral de modelos animales intracraneales con glioblastomas supratentoriales (92, 93). Sin embargo, a pesar de su potencial terapéutico no existen en este momento modelos animales ni ensayos clínicos que se encuentren estudiando su actividad y

INTRODUCCIÓN

eficacia para gliomas pediátricos tanto a nivel supratentorial como en el caso concreto de los tumores de protuberancia (87).

Debido a su facilidad de administración, accesibilidad y a que se trata de un anticuerpo cuyo efecto no se ha evaluado todavía en modelos animales con tumores pediátricos, hemos seleccionado esta molécula reguladora del sistema inmunitario para administrarla en nuestro modelo ortotópico de tumor difuso de protuberancia, con el objetivo de evaluar su influencia y actividad sobre el sistema inmune y al mismo tiempo estudiar su posible impacto en la supervivencia.

1.8 Actividad sinérgica antitumoral de la asociación de radioterapia e inmunoterapia

1.8.1 Efecto de la radioterapia sobre el sistema inmune

Como se ha comentado previamente, la resistencia de los tumores difusos de protuberancia a los distintos regímenes de quimioterapia estándar ha llevado a buscar nuevas alternativas terapéuticas en la combinación de radioterapia y los nuevos fármacos inmunomoduladores que presentan un perfil de actividad directo y específico al actuar sobre las células del sistema inmunitario.

Por su parte, la radioterapia es un tratamiento citolítico no selectivo dirigido a destruir células en constante división. Los linfocitos T, principales efectores de la inmunoterapia oncológica, son componentes celulares sensibles también a sus efectos citolíticos. A pesar de esta interacción a priori antagónica entre radioterapia e inmunoterapia, la destrucción masiva de células tumorales causada por la radiación ionizante se comporta como una señal activadora y potenciadora de la respuesta inmune del paciente que contribuye a mantener sus componentes celulares derivando en última instancia en un rechazo tumoral mediado por el sistema inmune (94, 95). Además, con las nuevas técnicas de radioterapia que consiguen administrar la dosis total del tratamiento en varias fracciones y de manera muy precisa sobre una diana

INTRODUCCIÓN

terapéutica concreta, se minimizan los efectos secundarios de la radiación sobre los tejidos sanos circundantes al mismo tiempo que se maximizan los beneficios terapéuticos sobre la diana tumoral.

Por todo ello, el papel de la radioterapia está asumiendo un nuevo rol como armamentario antitumoral apoyado en la inmunoregulación. Inicialmente el modelo tradicional del control tumoral asociado a la radiación, fundamentado en las cuatro 'R' de la radiobiología (redistribución, reparación, reoxigenación y repoblación), estaba basado en el daño directo de la radiación sobre el ADN y en el efecto citotóxico indirecto sobre las células tumorales derivado de la formación de radicales libres. De forma paralela, estudios preclínicos previos demostraron el efecto que la radioterapia ejerce sobre el microambiente tumoral y en la activación del sistema inmune asociado redefiniendo el concepto clásico al añadir el papel de una quinta 'R' de rechazo tumoral regulado por el sistema inmune (96, 97).

De este modo, la multitud de respuestas biológicas derivadas del tratamiento con radioterapia convierten la zona del tumor irradiado en un vacuna "in-situ" o también denominado núcleo inmunogénico contribuyendo al aumento del reclutamiento de células presentadoras de antígenos (CPA; *antigen-presenting cells*) y moléculas del MHC-I específicas de antígeno para la presentación del mismo a los linfocitos T CD8 +. La generación de un rechazo tumoral eficaz y mantenido mediado por estos linfocitos requiere de la activación y posterior reclutamiento de células T naive así como de la liberación de neoantígenos tumorales, proceso originado por la muerte celular tumoral inducida por la radiación (94).

De forma importante, la activación de una respuesta antitumoral mediada por células T (reacción adaptativa), requiere de la presentación antigénica tumoral a estas células efectoras por parte de las células dendríticas (CD). Este proceso depende de la producción de IFN-1 cuya liberación por parte de estas CPA es inducido por el DNA de las células tumorales

INTRODUCCIÓN

destruidas, el cual tiene la capacidad de activar la vía del estimulador de genes productores de IFN-I (STING) (94, 98).

Además, la destrucción de células tumorales asociada a la radioterapia desencadena la producción de 3 clases principales de señalización molecular (translocación de calreticulina en la superficie celular, el factor nuclear HMGB1 y la liberación de ATP) con el objetivo de potenciar la activación de las CD y aumentar la presentación antigénica tumoral a células T citotóxicas en el microambiente tumoral. Este proceso, denominado muerte celular inmunogénica (*immunogenic cell death; ICD*), puede producirse por varios mecanismos como apoptosis, necrosis, autofagia e inducción de senescencia celular (94). De este modo las células tumorales eliminadas pueden actuar como mediadores de la activación de respuestas antitumorales innatas y adquiridas.

Los cambios inducidos por la radiación en este microambiente tumoral ahora convertido en núcleo inmunogénico favorecen además la perpetuación de este proceso. Por un lado, la radioterapia induce la liberación de citocinas que contribuyen a la atracción de células T efectoras así como la expresión endotelial de moléculas de adhesión vascular (vascular cellular adhesion molecules; VCAM-1) las cuales permiten la extravasación e infiltración de las células T en dicho núcleo (99). Por otro lado, el estrés celular derivado de los componentes tumorales que sobreviven contribuye a aumentar la expresión de moléculas de señalización celular con el objetivo de aumentar la presentación de las células diana tumorales a sus linfocitos T citotóxicos específicos. Además, este proceso de reconocimiento y muerte celular sostiene a su vez un sistema de liberación mantenida de nuevos neoantígenos tumorales el cual favorece el reclutamiento de un mayor repertorio celular efector y por tanto dando lugar a una respuesta adaptativa amplificada y robusta (99) (Figura 7).

INTRODUCCIÓN

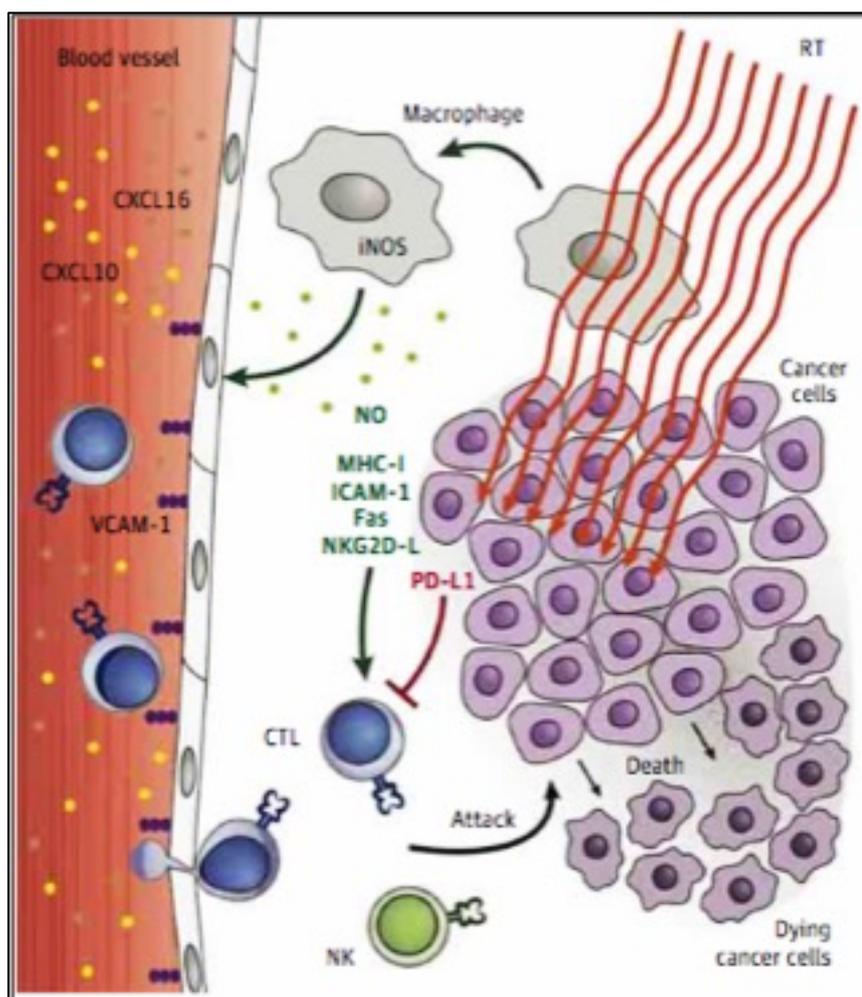


Figura 7. Esquema que representa la modulación de los distintos compartimentos del microambiente tumoral por la radioterapia. La radioterapia contribuye a mejorar el reclutamiento e infiltración de células T a través de la secreción de quemoquinas, la extravasación celular a través del aumento de expresión de moléculas de adhesión vascular endotelial (VCAM-1) así como a la presentación antigénica al aumentar la expresión de distintos ligandos en la superficie celular. Demaría et al, Nature Reviews, 2015.

Otra ventaja inmunológica de la radioterapia, derivada de la producción de este rechazo antitumoral basado en una respuesta citotóxica inmuno-mediada, consiste en su capacidad para liberar una reacción específica y sistémica a través del llamado efecto abscopal o también denominado *'out-of-the-field'* según el cual la respuesta clínica de la radioterapia es capaz de manifestarse a través de sus componentes celulares en lesiones localizadas a distancia de la zona radiada manteniendo la misma efectividad y especificidad de la respuesta iniciada localmente (100, 101)

Sin embargo, dicha capacidad de la radioterapia para inducir una activación de células del sistema inmune con acción antitumoral específica se encuentra limitada a su vez por la

INTRODUCCIÓN

interacción de diversos factores que pueden comportarse como señales reguladoras inhibitorias:

- En primer lugar, la producción de la propia muerte celular inmunogénica, la cual depende de los diferentes fenotipos inmunes de cada paciente y la preexistencia de un microambiente tumoral resistente determinado el cual puede limitar la presentación antigénica.
- En segundo lugar, la radioterapia puede favorecer la infiltración del microambiente tumoral por células (T reg ó MDSC) o bien factores (PD-L1 ó TGF β) los cuales inducen señales inhibitorias y pueden favorecer la inmunosupresión.
- Por último, tanto la dosis como el fraccionamiento de la radioterapia administrada pueden influir en la presentación antigénica y el reclutamiento de células T. Por ejemplo, se ha demostrado que las dosis por encima de 8-10 Gy administradas en una sola sesión presentan un mayor riesgo de producir una necrosis endotelial e hipoxia secundaria las cuales dificultarían la libre circulación linfocitaria (102).

En resumen, la radioterapia ejerce un efecto global complejo sobre el microambiente tumoral regulado a su vez por señales activadoras e inhibitorias las cuales deben ser tenidas en cuenta a la hora de generar una terapia inmunogénica (94, 101) (Figura 8).

INTRODUCCIÓN

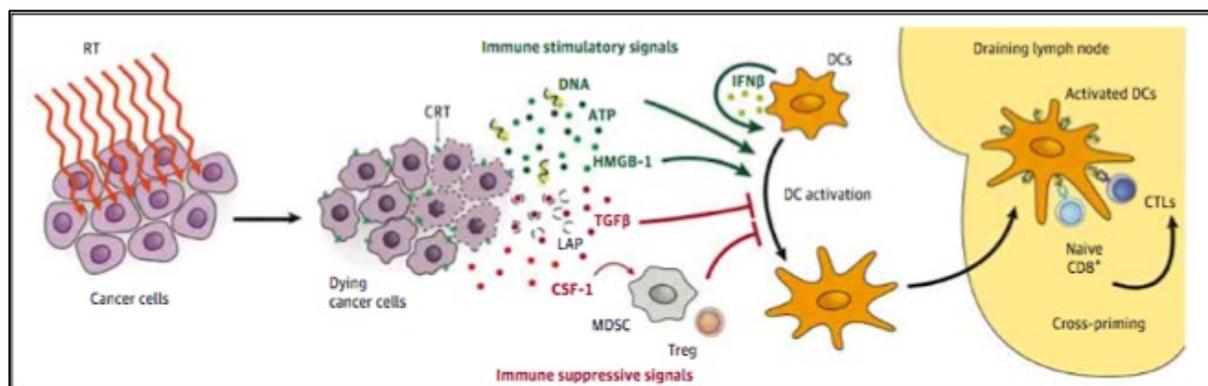


Figura 8. Esquema que ilustra el efecto local que la radioterapia ejerce sobre el microambiente tumoral a través de la muerte celular inmunogénica y la generación de células T específicas de tumor. El desarrollo de una respuesta inmune eficaz depende del balance entre las señales reguladoras positivas (indicadas en verde), las cuales tienen como objetivo la activación de CD y la presentación antigénica tumoral a los linfocitos T CD 8 +, y las señales inhibitorias procedentes del microambiente tumoral mediadas por componentes T reg y MDSC, indicadas en color rojo. Demaría et al, Nature Reviews, 2015.

La respuesta inmune antitumoral se encuentra por tanto condicionada por varios factores: presentación antigénica por CPA, la presentación mediada por los MHC a células T regulada por señales moduladoras positivas y/o negativas y por último la producción de células efectoras circulantes y linfocitos T memoria. La inmunoterapia y la radioterapia actúan en varios de estos pasos potenciando la respuesta inmune antitumoral por lo que ambas estrategias pueden beneficiarse de una administración conjunta produciendo un efecto sinérgico de rechazo antitumoral.

Por el momento las pautas de fraccionamiento y secuencia de administración de la radioterapia y los moduladores del sistema inmune no se han estudiado en profundidad, por lo que no existe actualmente un consenso sobre cuál debe ser el esquema más eficaz en relación con la dosis y el orden de administración de cada uno de ellos (103).

Existen en la actualidad multitud de ensayos clínicos que combinan distintos esquemas de administración de radioterapia con alguno de los fármacos inmunomoduladores previamente mencionados para pacientes con GBM de novo o en recidivas tumorales aunque su utilidad en el campo de los tumores pediátricos de protuberancia se encuentra muy poco explorado, siendo el ensayo fase II NCT01952769, actualmente en reclutamiento, el único que se encuentra evaluando la seguridad y eficacia derivada de la administración de un anticuerpo

INTRODUCCIÓN

anti-PD-1 en pacientes diagnosticados de DIPG tratados con radioterapia estándar (87, 95, 98, 104).

1.8.2 Papel del coestimulador 4-1BB como modulador de la supervivencia celular: vías de señalización y mecanismo de acción

Como se ha mencionado más arriba la homeostasis del sistema inmune requiere que la proliferación y supervivencia celulares se encuentren estrechamente controladas por distintos componentes y vías de señalización activadoras e inhibitorias. Se pueden distinguir tres grupos principales de moléculas que se comportan como receptores/ligandos con capacidad de unirse a las membranas celulares e influir en la capacidad de activación, división y supervivencia de las células del sistema inmune. Entre ellos se encuentra la superfamilia del TNFR (*tumor necrosis factor receptor*), la cual representa un grupo clave de estas moléculas y del que es miembro, como se ha descrito previamente, el factor coestimulador del sistema inmune 4-1BB ó CD 137 (105). De forma característica la expresión de 4-1BB o su ligando requiere de una estimulación celular previa; así como 4-1BBL se expresa en una gran variedad de CPAs incluidas CD, células B activadas y monocitos, 4-1BB es expresado principalmente en células T y NK (*natural killers*) activadas (106).

Por este motivo, la unión de 4-1BB bien con su ligando o con un anticuerpo específico anti-4-1BB proporcionan una señal coestimuladora muy potente en todos estos componentes del sistema inmune e incluso llegan a potenciar y expandir aquellas respuestas inmunológicas consideradas como débiles o subóptimas. A través de anti-4-1BB se desencadena una cascada de señalización que promueve la activación y crecimiento de células T a través de distintas vías de señalización que serán revisadas a continuación. Además, el tratamiento con el anticuerpo anti-4-1BB ó anti-CD137 ha demostrado su capacidad para potenciar la inmunidad antitumoral mediada por células T en distintos modelos preclínicos (92, 107-110).

INTRODUCCIÓN

- **Cascada de señalización mediada por 41BB para inducir la supervivencia de las células T**

4-1BB, como factor estimulador de la supervivencia de células T dentro del grupo de los TNFRs, lleva a cabo su vía de señalización a través de dos elementos adaptadores intracelulares denominados TRAFs (*TNFR-associated factors*). Las proteínas TRAF reclutadas son específicas para cada uno de los diferentes miembros de la superfamilia de TNFR. Tras la agregación con su ligando, 4-1BB se asocia de manera específica con TRAF1 y TRAF2 dando lugar a la activación de 4 vías: NF- κ B (*nuclear factor κ B*), ERK (*extracellular signal regulated kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) y p38 MAPK (*p38 mitogen-associated protein kinase*) (111) (Figura 9).

De forma esquemática, 4-1BB puede promover la supervivencia de células T a través de TRAF1 con la vía mediada por ERK la cual disminuye la producción de la molécula proapoptótica Bim, y por otro lado a través de TRAF2 mediado por la cascada del NF- κ B la cual promueve la activación de los componentes con acción antiapoptótica de la familia bcl-2, fundamentalmente Bfl-1 y Bcl-X_L (112).

INTRODUCCIÓN

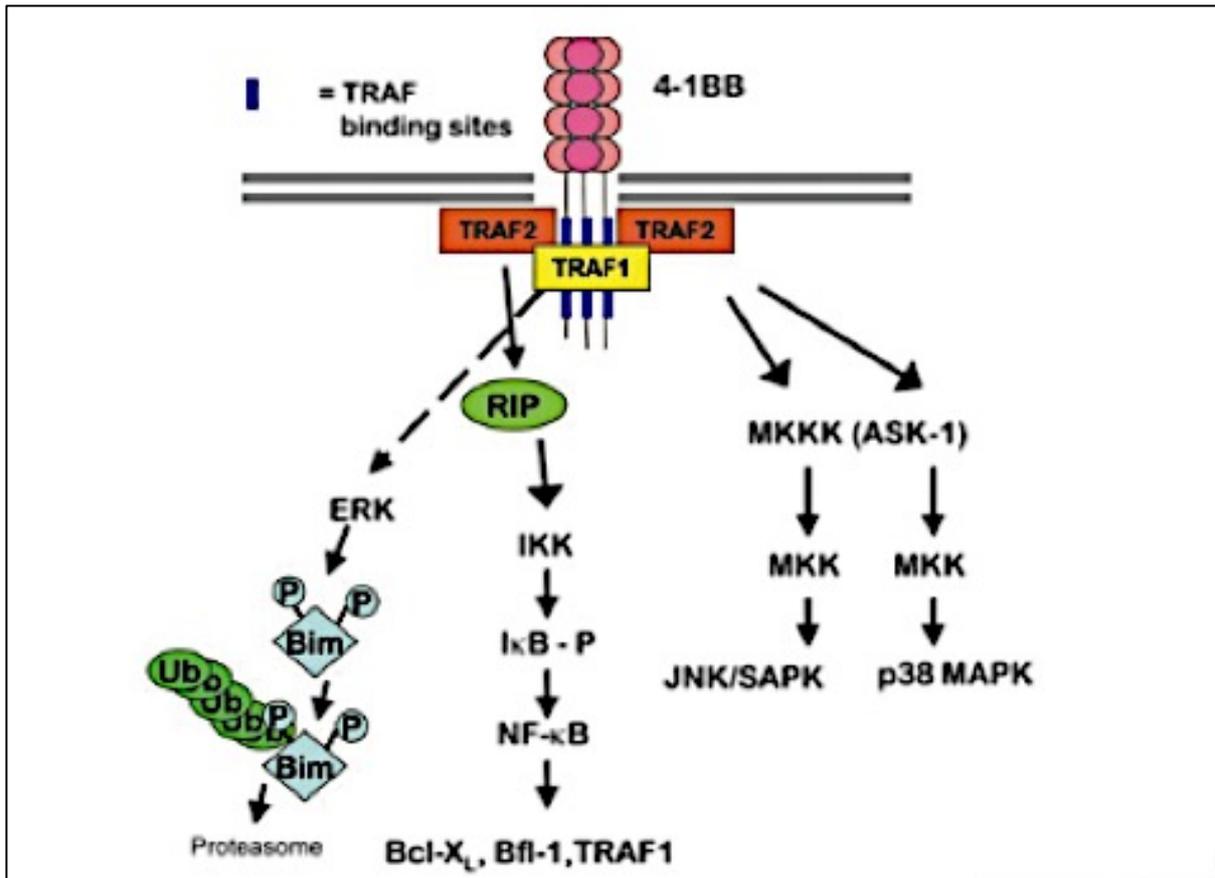


Figura 9. Transducción de señales mediadas por 4-1BB en células T. Tras la unión de 4-1BB con su ligando o tras activación con anticuerpo agonista en linfocitos T, TRAF1 y TRAF2 son reclutados y conducen a la activación de las distintas cascadas mediadas por NF-κB, ERK, JNK y MAPK. TRAF1 da lugar a una inhibición de la molécula proapoptótica Bim a través de ERK, mientras que TRAF2 es esencial en la activación de la vía NF-κB la cual se asocia con la activación de los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2. Wang et al, Immunological Reviews (2009).

• Tratamiento antitumoral con anticuerpos agonistas anti 4-1BB

Diversos estudios han demostrado que la estimulación del receptor de células T no es suficiente para una activación, expansión y producción de citocinas, elementos imprescindibles para una respuesta inmune eficaz. Diversas señales coestimuladoras adicionales son requeridas para evitar la anergia o apoptosis. Por este motivo el tratamiento con un anticuerpo anti-4-1BB a través de su mecanismo de acción desarrollado en cada uno de los niveles previamente mencionados representa una alternativa útil en la modulación de la respuesta inmune antitumoral dentro del microambiente de inmunoresistencia (110).

Para comprender el efecto que se pretende obtener con este inmunomodulador es necesario tener en cuenta, como se ha mencionado anteriormente, que 4-1BB se expresa en células T

INTRODUCCIÓN

CD 8+ y CD 4+ activadas y que tras su interacción, éste desencadena una potente señal coestimuladora de la que se deriva un proceso continuo de expansión y supervivencia de células T con un efecto predominante sobre los componentes CD 8 + respecto a los CD 4 + (110). Sin embargo, el mecanismo de acción de dicho anticuerpo se ve influenciado por el momento de la aplicación del mismo en relación con la presentación antigénica. De este modo se ha demostrado por varios estudios in vitro e in vivo que la administración del anticuerpo anti-4-1BB desarrolla una respuesta inmune mayor en aquellos modelos animales con un tumor ya establecido respecto a una administración demasiado precoz del anticuerpo cuando todavía no ha habido suficiente exposición antigénica en el microambiente tumoral y por tanto una adecuada activación de células T (113).

Por último, aunque la inmunidad antitumoral inducida por anti-4-1BB es llevada a cabo sobre todo a expensas de una mayor activación y proliferación de células T CD8+, se ha demostrado que los linfocitos T CD 4 + aunque no ejercen ninguna influencia en la inducción y proliferación de la respuesta inmune estimulada por 4-1BB, sí que juegan un papel importante en el mantenimiento de respuestas funcionales a través de células memoria del sistema inmune (106).

1.8.3 Asociación del anticuerpo anti-41BB y radioterapia como estrategia terapéutica en un nuevo modelo animal ortotópico de DIPG

El conocimiento cada vez mayor de los efectos sinérgicos entre radioterapia e inmunoterapia ha contribuido a explorar la eficacia de nuevas asociaciones como en este caso la interacción entre radioterapia y anticuerpo anti 4-1BB. En modelos animales portadores de tumores desarrollados con la línea GL261 a nivel supratentorial la asociación de radioterapia y anticuerpo anti 4-1BB presentaron un beneficio mayor en la supervivencia del grupo de tratamiento combinado respecto a los grupos de tratamiento en los que se administraron sólo

INTRODUCCIÓN

radioterapia o sólo anticuerpo y dicho beneficio se correlacionó con un aumento significativo de los linfocitos infiltrantes en el tumor (*tumor infiltrating lymphocytes* ó *TILs*) (114, 115).

Una vez desarrollado nuestro modelo de tumor difuso de protuberancia y tras comprobar su consistencia y reproducibilidad, el siguiente paso consiste en diseñar una nueva estrategia terapéutica basada en ambos tratamientos con potencial beneficio y aplicabilidad en la clínica si se demuestra su eficacia y ausencia de toxicidad a nivel preclínico.

Tal y como se ha demostrado en estudios exploratorios de la eficacia de radioterapia o inmunoterapia aplicados en modelos animales, ambos tratamientos por separado resultan insuficientes para alcanzar una respuesta inmune lo suficientemente resistente como para provocar la regresión tumoral debido a los numerosos mecanismos de inmunoresistencia presentes en el microambiente tumoral (94, 99).

Por este motivo para nuestro modelo de tumor difuso de protuberancia hipotetizamos que la administración de un anticuerpo activador principalmente de las células T CD8+, como es el anticuerpo anti-41BB, podría ser sinérgico con la aplicación de radioterapia.

2. Justificación, Hipótesis y Objetivos

2.1 Justificación

A pesar del avance significativo producido en el campo de la biología molecular de los DIPG en los últimos años, esta enfermedad continúa siendo refractaria a todos los tratamientos y no existe ninguna terapia dirigida. Por otro lado el grupo poblacional afectado constituye uno de los grupos más vulnerables dentro de la neurooncología debido a la edad de presentación, las consecuencias neurológicas y la letalidad de esta enfermedad. Esto hace que la investigación en modelos animales cobre si cabe mayor protagonismo para evaluar cómo se comportan estos tumores, qué patrones de crecimiento e invasividad presentan y por último qué terapias individualizadas pueden producir una regresión tumoral con un adecuado perfil de eficacia/tolerancia.

2.2 Hipótesis

Por todo lo expuesto anteriormente, nuestro grupo se ha planteado desarrollar un nuevo modelo ortotópico murino de tumor difuso de protuberancia a través de un sistema que a posteriori permita testar y evaluar la toxicidad de nuevos fármacos y compararlos con el tratamiento estándar en este momento que es la radioterapia.

Por otro lado, en caso de poder llevar a cabo el experimento de una forma consistente, reproduciendo el tumor de una manera similar a cómo se desarrolla en los pacientes pediátricos, podremos evaluar la respuesta a un tratamiento combinado de radioterapia e inmunoterapia de una manera sistematizada con el objetivo de poder aplicarlos de forma translacional al campo de la investigación clínica.

2.3 Objetivos

1. Desarrollo y validación de un nuevo modelo ortotópico animal de tumor difuso de protuberancia con un sistema de guía no basado en estereotaxia empleando líneas humanas de DIPG y murinas.
2. Valorar la eficacia y toxicidad de la radioterapia en nuestro modelo animal.
3. Evaluar la eficacia y seguridad de la administración combinada de radioterapia y un anticuerpo agonista de 4-1BB, el cual como se ha mencionado previamente, se encuentra implicado en la modificación de los mecanismos reguladores específicos de la vía de los checkpoints del sistema inmune.

3. Métodos

MÉTODOS

3.1 Descripción del sistema de inserción guiada por *bolt* o tornillo.

El sistema guiado por *bolt* fue desarrollado inicialmente por el grupo del laboratorio de tumores cerebrales del Dr Fred Lang (MD Anderson Cancer Center, Texas) para estudiar los efectos de la terapia génica en modelos supratentoriales de glioblastomas evitando el uso de la técnica de referencia guiada por estereotaxia. Nuestro sistema asistido por *bolt* está basado en este modelo descrito previamente para la creación de gliomas supratentoriales del adulto (116).

Este modelo consistía en un tornillo-guía también denominado *bolt* (Ref.#C212SG, Plastics One), una jeringa modelo Hamilton de 26 G y una aguja de insulina de 15 G. El tornillo o *bolt* presenta una longitud de 2.6 mm y contiene un orificio central de 0.5 mm, el cual es capaz de aceptar el paso del calibre de la jeringa Hamilton evitando un teórico desplazamiento durante la inserción.

De acuerdo con las referencias anatómicas del animal y siguiendo las coordenadas correspondientes a nivel del hueso occipital en la fosa posterior del roedor, es posible referenciar el *bolt* en superficie con al área de la protuberancia de acuerdo a unos parámetros de profundidad específicos.

Dicho *bolt* representa una referencia a través de la cual es posible acceder a la protuberancia con una aguja de inyección u otros tipos de técnicas invasivas o no invasivas con el fin de poder llevar a cabo distintos estudios que evalúen diversas estrategias terapéuticas susceptibles de investigación durante los experimentos preclínicos.

3.2 Líneas celulares empleadas

Para la elaboración de este trabajo de tesis doctoral hemos empleado 2 líneas celulares diferentes resultando en 2 modelos animales con propiedades distintas.

MÉTODOS

3.2.1 Línea celular para validación del modelo ortotópico de DIPG

Para el desarrollo y validación del modelo de tumor de tronco, empleamos la línea celular Tp54 procedente de una biopsia de un paciente con DIPG, proporcionada muy amablemente por el Dr Junier del Hospital Universitario Pierre y Marie Curie, administrada en ratones inmunodeprimidos de la cepa athymic nude. Dicha línea celular se caracterizaba por presentar alterada la vía del p53 y por la mutación a nivel de K27M de H3F3A. Estas células son expandidas en forma de neuroesferas en un medio específico libre de suero (NeuroCult™ NS-A Proliferation Kit, Human, #05751 Stem Cell Technologies) para células progenitoras y stem cells. Finalmente esta línea celular precisa de una atmósfera humidificada enriquecida al 5% con CO₂ a 37 °C.

3.2.2 Línea celular para evaluar el efecto combinado de radioterapia y anticuerpo anti-4-1BB con modelo de ratón inmunocompetente

Para los estudios de supervivencia y evaluación del efecto antitumoral de radioterapia e inmunoterapia, administramos células murinas GL261 en la protuberancia de ratones de su huésped específico representado por la cepa C57BL/6, estableciendo el modelo inmunocompetente. Dicha línea celular cuando se administra en esta cepa animal presenta un patrón de crecimiento rápido y agresivo con mutaciones conocidas en la vía del p53 y K-ras, las cuales constituyen un rasgo genético frecuente en los tumores cerebrales. Además, GL261 manifiesta una expresión basal elevada del MHC tipo I para el reconocimiento por las células T citotóxicas similar al microambiente tumoral objetivado originalmente en los tumores cerebrales. Por todo ello, la línea GL261 administrada en dicho huésped representa un modelo animal moderadamente inmunogénico muy útil para apoyar los estudios de inmunoterapia ya que es susceptible de ser modificado por el tratamiento como la

MÉTODOS

radioterapia, las terapias génicas así como por la administración de moléculas reguladoras del sistema inmune (117).

3.3 Animales del estudio

Tanto los ratones de la cepa athymic nude como los C57BL/6 fueron obtenidos de los laboratorios Harlan (Barcelona, España) y fueron mantenidos en el animalario del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA, Pamplona) de la Universidad de Navarra bajo condiciones que aseguraban el medio libre de agentes patógenos. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) bajo el número de protocolo CEEA/077-13 y CEEA/097-16. Todos los estudios animales fueron llevados a cabo en las instalaciones veterinarias del CIMA de acuerdo a las regulaciones legales y éticas de cuidado y experimentación animal correspondientes. Los animales se monitorizaron diariamente y fueron sacrificados cuando mostraban una alteración en el patrón de comportamiento habitual incluyendo inclinación cefálica, pérdida de fuerza, postura encorvada, tendencia a girar sobre sí mismos, incapacidad para acceder a agua/comida o pérdida de peso > al 20 % del peso inicial. Los animales fueron sacrificados a través de la inhalación de CO₂.

3.4 Tratamiento con radioterapia y anticuerpo anti-4-1BB

3.4.1 Diseño del protocolo de tratamiento con radioterapia: planificación y dosimetría

En primer lugar desarrollamos un protocolo de planificación y administración de radioterapia en ratones de la cepa C57BL/6. Con dicho objetivo los ratones fueron anestesiados según dosis estándar de ketamina/xilacina y colocados sobre un molde corporal adaptado para

MÉTODOS

asegurar una inmovilización adecuada y de este modo obtener una administración precisa e invariable del tratamiento centrado sobre la protuberancia de cada uno de los animales.

Planificación y dosimetría

Inicialmente se llevó a cabo por la unidad de Radiofísica y Radioterapia de la Clínica Universidad de Navarra un análisis dosimétrico y anatómico del tratamiento a través de la realización de un scanner de cuerpo entero de planificación previo (Somatom Emotion, Siemens).

A continuación y tras realizar una ampliación de las imágenes obtenidas sobre todo a nivel craneal y tras la posterior reconstrucción multiplanar que permite el software de planificación iPlan Rt de BrainLab (Feldkirchen, Alemania), se establecieron los cálculos apropiados para definir la relación entre la protuberancia del animal y la guía del tornillo a nivel craneal con el objetivo de dirigir el tratamiento de radioterapia de forma consistente y reproducible sobre dicha diana (Figura 10). De esta manera en los sucesivos tratamientos se utilizará esta referencia para la aplicación de la radioterapia.

MÉTODOS

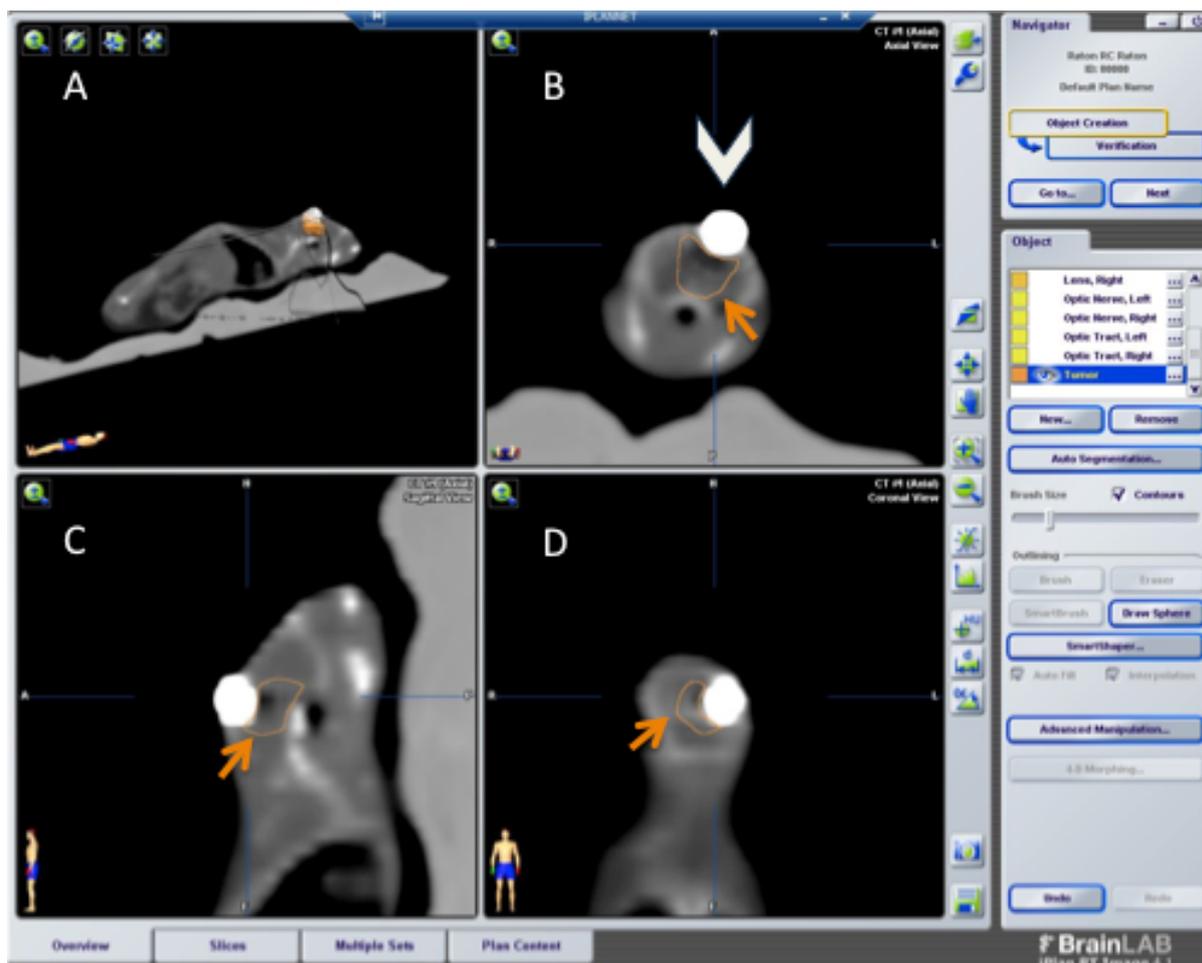


Figura 10. Software de planificación de radioterapia Iplan RT de BrainLab basado en la reconstrucción multiplanar en base a las referencias de un scanner previo A Reconstrucción tridimensional del animal en 3D sobre el molde corporal. B, C y D Proyecciones en planos coronal,sagital y axial respectivamente en los que se delimita el *bolt* (cabeza de flecha) y sobre los que se dibuja el volumen calculado que va a ocupar el campo de radiación y definido en color naranja (indicado por una flecha) y sobre el que el acelerador va a administrar posteriormente el tratamiento de acuerdo a dicha planificación.

La irradiación se llevó a cabo en un acelerador Elekta Versa HD (Stokholm,Sweden) con rayos X de 6MV (PDD2010=0.58 a SSD=100 cm) sin filtro aplanador. El campo se colimó usando un cono de 10 mm de diámetro con el isocentro a nivel del *bolt*. Con este haz al tumor se le administraba la dosis de radiación correspondiente medida en Grays (Gy) en el isocentro determinado de acuerdo a la planificación previa y con un tiempo estimado de administración de 5 minutos aproximadamente.

MÉTODOS

3.4.2 Anticuerpo anti-4-1BB

Para realizar los experimentos correspondientes al esquema combinado de anticuerpo y/o radioterapia, se empleó el anticuerpo monoclonal murino del isotipo Ig G1 dirigido contra el CD 137 (Ref BE0169, clon LOB12.3). El laboratorio distribuidor (BioXCell,USA) garantiza que el anticuerpo suministrado posee una concentración de < 0.002 UE/ μ de endotoxina y que posee una pureza > 95 %. El clon empleado, el anticuerpo monoclonal Ig G1 LOB12.3, produce una estimulación in vivo de la cascada mediada por 4-1BB. En total se emplearon 27.46 mg de anticuerpo en 4.4 ml a una concentración de 6.24 mg/ml. Los ratones que actuaban como controles en dicho experimento bien del grupo de radioterapia y/o anti-CD137 recibieron el anticuerpo monoclonal murino del isotipo control Ig G1 (anticuerpo antiperoxidasa Horseradish), el cual no se expresa en mamíferos.

3.5 Estudio de supervivencia

Los animales fueron estabulados en condiciones estándar y evaluados diariamente para detectar la aparición de síntomas neurológicos sugestivos de invasión tumoral. En ese momento, los animales fueron sacrificados registrando el día desde la inoculación celular, y sus cerebros fijados y almacenados para su estudio posterior al final del experimento. La supervivencia acumulada desde la inoculación de las células hasta que se sacrificaban los animales se llevó a cabo con el análisis estadístico de Kaplan-Meier y las diferencias estadísticas entre las curvas de cada grupo fueron comparadas con el método establecido de acuerdo al log rank test. Dichos análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el software GraphPad Prism y el software SPSS IBM 2.0.

3.6 Examen anatomopatológico y estudios inmunohistoquímicos

Después de objetivar, con cualquiera de las dos líneas celulares, la progresión tumoral sugerida por la presencia de síntomas neurológicos compatibles con invasión del tronco, los

MÉTODOS

animales se sacrificaban de acuerdo al protocolo ético establecido previamente. Tras practicar la necropsia, los cerebros murinos se conservaban en formaldeído al 10% y etanol al 70%. Una vez fijados, los cortes histopatológicos eran cortados y teñidos de acuerdo con la técnica estándar, con anticuerpos específicos para la línea celular procedente de DIPG con el objetivo de detectar la mutación de la histona 3 K27M ((#ABE419 Millipore, 1:500), detección por inmunohistoquímica de GFAP (Dako, Z0344 rabbit polyclonal, 1:500), Nestina (#ABD69 Millipore, 1:500), Olig2 (#AB9610 Millipore, 1:500), ki67 clone SP6 (Thermo Scientific, RM9106, 1:100) y Vimentina clone V9, (M0725, Dako Denmark A/S, 1:400).

En el caso de los tumores producidos por la línea GL261 y al ser una línea celular ya tipificada, todos los procedimientos histopatológicos fueron llevados a cabo según la técnica convencional de inmunohistoquímica correspondiente.

3.6.1 Estudio por inmunohistoquímica de la respuesta inmune inducida en el experimento que evaluaba la eficacia de la combinación de radioterapia y anticuerpo anti-4-1BB

Del mismo modo, cuando los animales del modelo inmunocompetente que empleaba la línea celular GL261 y que estudiaba la eficacia de la asociación de radioterapia y anti-4-1BB presentaron signos neurológicos de progresión tumoral, éstos eran sacrificados de acuerdo al protocolo ético correspondiente y sus cerebros extraídos para estudio inmunohistoquímico de la respuesta inmune inducida con dicho esquema terapéutico a través de la detección de CD3.

4. Resultados

4.1 Validación del modelo DIPG: proceso de inserción del *bolt* y desarrollo del tumor.

4.1.1 Establecimiento de las coordenadas del modelo DIPG

En primer lugar, tratamos de establecer las coordenadas de los tumores DIPG utilizando como referencia el atlas Allen de anatomía cerebral del ratón. Además, empleamos las referencias anatómicas para evitar el daño de estructuras nerviosas o vasculares importantes de la fosa posterior del animal durante la cirugía (118).

Identificamos nuestro punto de entrada 1.0 mm a la derecha de lambda y levemente posterior (aproximadamente 0.8 mm) a la sutura lambdoidea de tal manera que las grandes venas de drenaje del seno posterior del animal quedaran fuera de nuestra trayectoria.

A continuación, evaluamos la posibilidad de la colocación del tornillo empleando dichas coordenadas y si el sistema se mantenía adherido al hueso sin sufrir modificaciones fruto del desplazamiento del tornillo. Comprobamos que el sistema del *bolt* en dichas coordenadas se mantenía firme en su diana sin sufrir desplazamiento durante al menos 30 días. Finalmente, fue necesario establecer las coordenadas de la profundidad a la que había que insertar la jeringa hasta alcanzar la región derecha de la protuberancia. Para este fin, realizamos otro experimento en el que inyectamos una solución de tinta empleando la aguja con calibre de 26 G que presentaba un tope en la punta que limitaba el grado de penetración de la aguja, por lo que se comprobaron varias longitudes de profundidad desde 5 hasta 7 mm. Este experimento nos permitió definir las coordenadas definitivas hasta alcanzar la zona media de la protuberancia: punto de entrada a nivel craneal definido como 1 mm a la derecha y 0.8 mm por detrás de lambda con una profundidad de 6.5 mm de inserción (Figura 11).

RESULTADOS

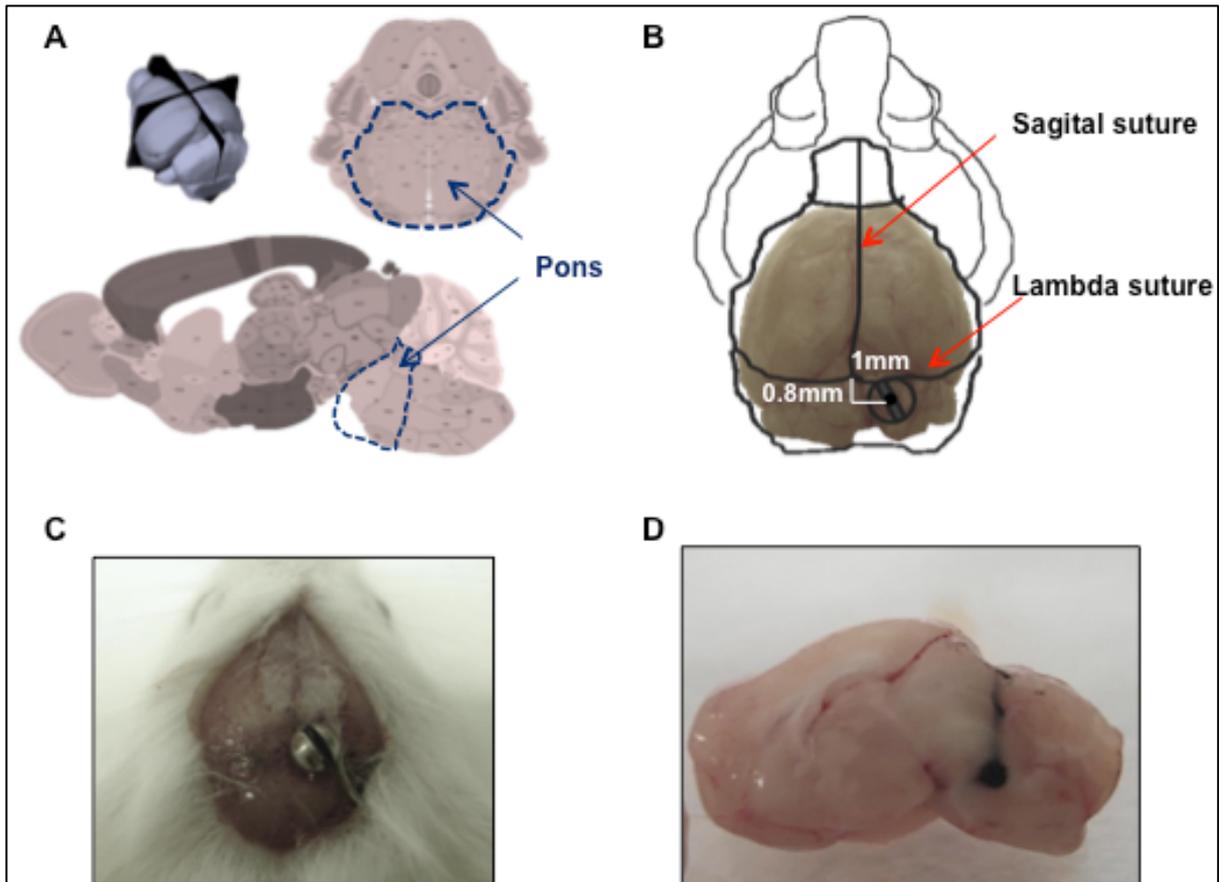


Figura 11. A Localización anatómica de la protuberancia en ratones según atlas Allen. B, C y D Determinación de las coordenadas de colocación del *bolt* así como validación de la profundidad de la diana con el experimento realizado con solución de tinta.

4.1.2 Técnica de inserción del tornillo

En condiciones de asepsia y con material quirúrgico estéril, ratones de 4 semanas de edad (cepa athymic nude) fueron anestesiados a través de la inyección intraperitoneal de una solución de ketamina/xilacina. La cabeza del animal se sujetaba con un par de gasas enrolladas a modo de cabezal de forma que cuando se insertara el tornillo, se minimizara la presión aplicada sobre la cabeza y el cuello del animal y el procedimiento fuera mejor tolerado.

A continuación y tras realizar limpieza cutánea con povidona iodada se realizaba una incisión longitudinal de 5 mm de longitud con bisturí del número 23 exponiendo ambas suturas sagital y lambdoidea. Tras la exposición de las referencias anatómicas, se realizaba una pequeña marca en el hueso occipital con una aguja de insulina que posteriormente era ampliada con

RESULTADOS

una broca manual (Ref. Drill HSS, #8J60 Plastics One) la cual penetraba el hueso hasta alcanzar la duramadre. En este punto, es esperable un sangrado transitorio procedente del plexo venoso epidural de esta localización, siendo controlado a través de una ligera presión constante con la que se realiza hemostasia. El siguiente paso consistía en introducir el tornillo con su destornillador específico aplicando una presión firme para introducir el *bolt* a través del trépano hasta que la cabeza del tornillo quedaba enrasada con la superficie craneal del animal. De esta manera la porción distal del *bolt* penetraba la duramadre unos pocos mm dentro del parénquima del tronco debido a la particular configuración de la anatomía del ratón que condiciona una disposición de la protuberancia en un plano horizontal respecto a los hemisferios cerebrales.

4.1.3 Preparación de las líneas celulares e implantación

Una vez que el *bolt* se encontraba insertado en el trépano, inmediatamente se procedía a la inoculación de las células tumorales durante el mismo acto anestésico. Se realizaban ambos procedimientos al mismo tiempo para ahorrar tiempo por experimento y por razones de confort del animal. Aproximadamente 10 minutos después de la colocación del *bolt*, la jeringa Hamilton se introducía cuidadosamente en el orificio del *bolt* hasta que el tope de la jeringa quedaba enrasada con la superficie del tornillo y se alcanzaba la profundidad planificada de 6.5 mm (Figura 12). Entonces la suspensión celular (10^6 células en 3μ /por animal) se administraba paulatinamente a través de una bomba de infusión (modelo Harvard Apparatus) durante 20 minutos en la región de la protuberancia. Con esta técnica de infusión lenta, controlada por bomba, la probabilidad de reflujo durante la inoculación se reducía de forma significativa. Al finalizar el procedimiento, la jeringa era lentamente retirada y la herida cerrada con pegamento quirúrgico (Hystoacryl #1050044, Braum Surgical) por lo que no se necesitaron puntos de sutura. Además, la recuperación del animal después del procedimiento quirúrgico fue más rápida y segura debido a que sólo se empleó una dosis de

RESULTADOS

anestésico para realizar tanto la cirugía como la infusión celular. Finalmente, se administraba al animal una dosis de morfina adecuada a su peso mientras se recuperaba de la anestesia sobre una manta de calor.

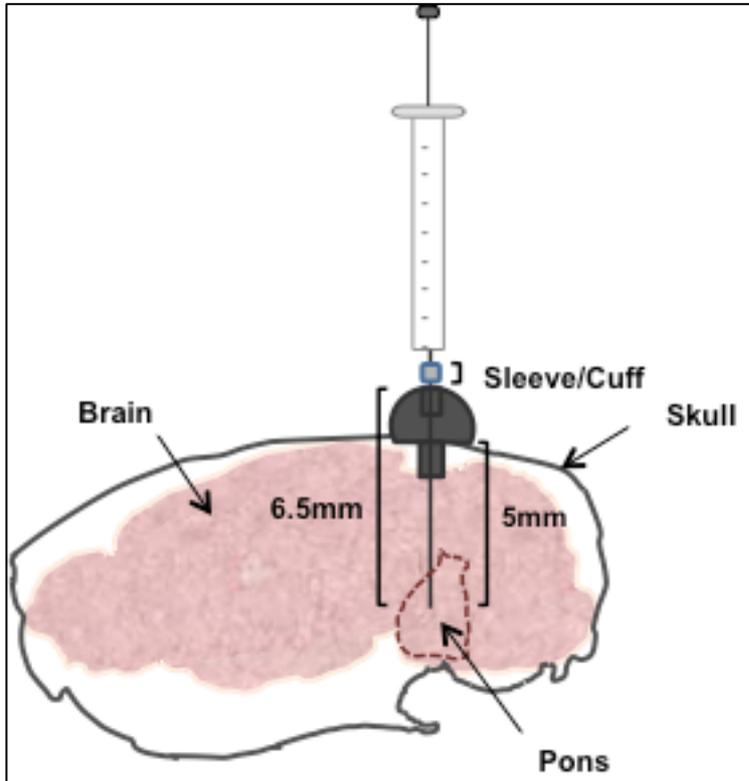


Figura 12. Posición final de la aguja Hamilton de infusión sobre el *bolt* colocado de acuerdo a las coordenadas previamente establecidas para administración de las células ó tratamientos sobre la parte ventral de la protuberancia.

4.1.4 Evolución después de la cirugía

Debido a que se trata de un procedimiento agresivo para los animales se les administraba analgesia subcutánea durante 2 días tras la intervención. Además y en relación con su condición física, asociada a una recuperación de un abordaje quirúrgico a la protuberancia, se les suministraba en el suelo de la jaula pienso y geles hidratantes con el objetivo de facilitar la ingesta y acelerar su recuperación. El retorno al estado basal previo de los animales se conseguía en torno a las 72 horas de la intervención sin signos visibles de déficits neurológicos provocados por el abordaje. De forma ocasional, algunos animales presentaban

RESULTADOS

alteraciones transitorias de la marcha durante los siguientes 2-3 días de los cuales se recuperaban espontáneamente. No se registró una pérdida de peso significativa tras la cirugía.

4.1.5 Desarrollo tumoral, seguimiento y supervivencia de los ratones de la cepa athymic portadores del injerto ortotópico de DIPG

Con el objetivo de validar nuestro modelo frameless para el desarrollo de tumores de protuberancia, inyectamos la línea celular Tp54 procedente de una biopsia de DIPG empleando nuestro sistema guiado por *bolt* en la protuberancia de 10 ratones de acuerdo a nuestro protocolo descrito previamente. Los animales fueron examinados periódicamente para evaluar la aparición de síntomas neurológicos. Inicialmente cada 2 días durante las primeras 4 semanas y posteriormente diariamente más allá del día 30 posterior a la administración de las células tumorales. Además, para descartar la posibilidad de lesión cerebral derivada del procedimiento, 15 días después de la cirugía se llevó a cabo una RM cerebral (3 Teslas Siemens Trio y Magnetom Skyra 3T) de forma aleatoria a 5 animales. Las imágenes de la resonancia no mostraban ningún signo compatible con lesión postprocedimiento ni tampoco crecimiento tumoral en este punto precoz tras la administración celular. Para establecer un seguimiento por imagen, repetimos este mismo estudio a los mismos animales cuando se observaban síntomas neurológicos compatibles con desarrollo tumoral a nivel de la protuberancia como realización de giros continuos sobre sí mismos, alteración de la marcha y/o pérdida de peso. En todos ellos se encontraron hallazgos radiológicos compatibles con crecimiento tumoral a nivel de la diana protuberancial. En concreto, en uno de estos animales además del tumor (T en Fig 13) las imágenes mostraban la presencia de una hidrocefalia asociada (H en Fig 13) secundaria a la obstrucción del acueducto provocada por el crecimiento tumoral (Fig 13).

RESULTADOS

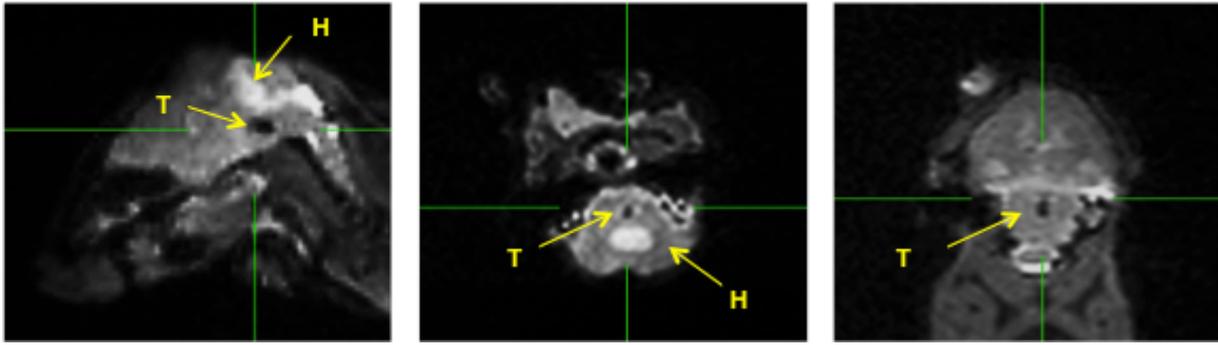


Figura 13. RM 3T de control realizada a uno de los animales cuando presentó síntomas sugestivos de afectación de tronco. La letra T señala la lesión tumoral hipointensa en secuencias potenciadas en T2 en la parte central y ventral de la protuberancia. La letra H identifica la presencia de hidrocefalia derivada de la compresión del acueducto por el tumor.

A través de esta técnica basada en la guía por *bolt*, todos los ratones (n=10) desarrollaron los tumores en la diana planificada lo que provocó la aparición de síntomas progresivos compatibles con la invasión de la protuberancia. Los animales a los que se les administró la línea Tp54 en el tronco presentaron una mediana de supervivencia de 95 días con un intervalo registrado comprendido desde 81 hasta 116 días (Gráfica A en Fig 14). Los cerebros de los animales fueron extraídos para su análisis histopatológico.

Los tumores de todos los individuos se apreciaban incluso de forma macroscópica en la parte derecha de la protuberancia confirmando la validez y fiabilidad de nuestro modelo tumoral (B en Fig 14).

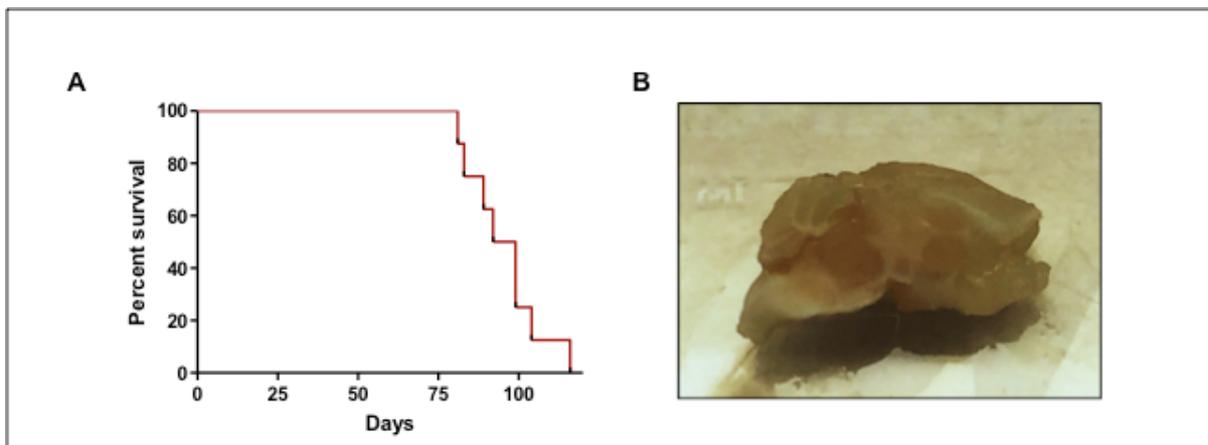


Figura 14. A Curva de supervivencia para la línea celular Tp 54 que muestra una mediana de 95 días (software GraphPad). B Aspecto macroscópico tras fijación y corte en plano sagital de uno de los cerebros de ratón,

RESULTADOS

identificando con claridad la presencia del tumor en la protuberancia y por tanto confirmando la validez de nuestro modelo.

4.1.6 Análisis anatomopatológico de los tumores de nuestro modelo ortotópico de DIPG con la línea Tp54

A continuación, llevamos a cabo el estudio histológico para caracterizar el tumor desarrollado con nuestro sistema. Los estudios de los cortes de los cerebros con la tinción de hematoxilina-eosina mostraban que los tumores se localizaban en la protuberancia de los animales. Algunos de los tumores mostraban una extensión hacia los pedúnculos cerebelosos. Los cortes teñidos con hematoxilina-eosina ponían de manifiesto la presencia de un tumor de alto contenido celular y escasamente diferenciado compuesto por células de morfología constante de gran tamaño y forma redondeada con núcleo de localización central y nucléolos prominentes. Frecuentes figuras mitóticas destacaban en las células. (A y B en Figura 15). No se registraron fenómenos de proliferación vascular así como necrosis en estos tumores. Se incluyó el estudio histológico de un cerebro sano como control para apreciar la diferente composición morfológica de la preparación (recuadro lado derecho en B, Figura 15).

Los estudios de inmunohistoquímica mostraban tinción positiva para la mutación H3K27M, que como se ha descrito previamente, está presente hasta en un 80 % de los tumores DIPG en la mayor parte de las células. De forma adicional, analizamos esta mutación por la técnica de western blot empleando el mismo anticuerpo y tal y como se esperaba se ratificó la mutación H3K27M por esta técnica en la línea celular Tp54 (C en Figura 15). Por otro lado las células tumorales mostraban un fenotipo glial como confirmaba la tinción de sus prolongaciones citoplasmáticas con GFAP. La tinción de los núcleos contra olig2 refuerza el origen glial de este tipo de tumores. (D y E respectivamente en Figura 15). Como se ha descrito anteriormente estas células tumorales pueden exhibir un perfil de expresión proneural con marcadores de células progenitoras como se muestra en nuestro análisis con la tinción de nestina y vimentina (F y G en Figura 15). Además, los tumores detectados mostraban una

RESULTADOS

intensa actividad proliferativa tal y como ponía de manifiesto la inmunorreactividad con Ki67. Como puede observarse en los cortes anatomopatológicos correspondientes, se registró inmunomarcaje de Ki67 en un 60-80 % de las células en función del área tumoral evaluada (H en Figura 15).

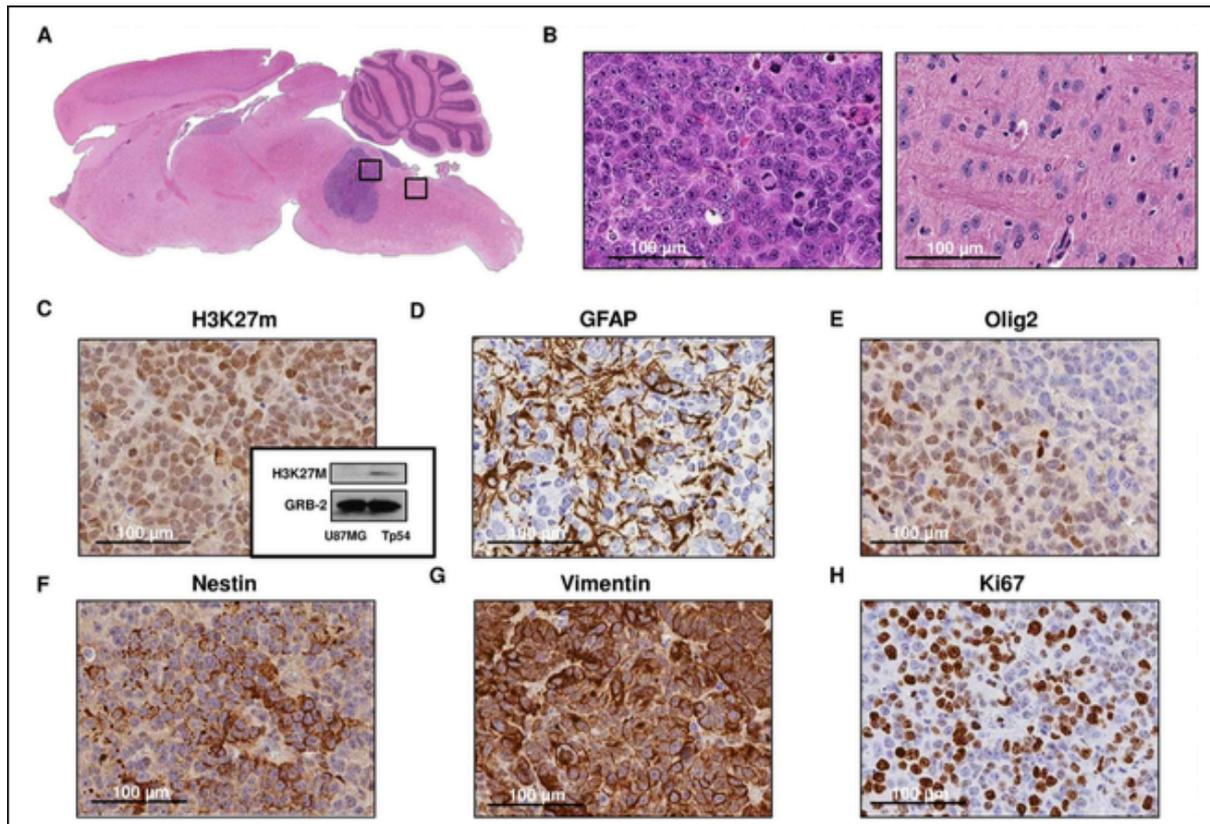


Figura 15. Cortes histopatológicos correspondientes al modelo tumoral de la línea Tp54. A Tinción con hematoxilina-eosina que confirma la presencia de tumor protuberancial con patrón densamente celular e indiferenciado (x50). **B izquierda** Detalle de la micrografía correspondiente al mismo corte de A pero ampliado (x400). **B derecha** Detalle de tejido cerebral murino normal (x400). **C** Inmunohistoquímica que confirma la positividad de la presencia de la mutación H3K27M y el mismo resultado por western blot. **D y E** Tinción con GFAP y Olig2 respectivamente que confirman el origen glial de las células tumorales. **F y G** Inmunohistoquímica positiva para los marcadores de nestina y vimentina que ponen de manifiesto el carácter proneural de las células tumorales implantadas. **H** Corte que ilustra el alto índice de proliferación celular exhibido por el tumor a través del anticuerpo Ki67.

Por tanto como se deduce de estos análisis, este nuevo modelo reproducible de DIPG permite una rápida evaluación de la tumorigenicidad con la que poder examinar además nuevos agentes terapéuticos administrados de forma fiable en la misma diana tumoral de las células.

4.2 Tratamiento con radioterapia del modelo inmunocompetente C57BL/6 con la línea celular GL261. Evaluación de la eficacia del anticuerpo anti-4-1BB in vivo.

4.2.1 Tratamiento con radioterapia estándar en monoterapia: escalada de dosis

Con el objetivo de determinar el régimen apropiado respecto a la dosis, eficacia y toxicidad de la radioterapia en nuestro modelo de tumor de protuberancia, realizamos un experimento inicial que incluyó 4 grupos de animales. El grupo A (n = 7) constituía el grupo control, al que sólo se le administraron las células tumorales en el mismo día que al resto de los animales pertenecientes a los grupos de tratamiento B (n = 3), C (n = 3) y D (n = 2) a los que se les iba a someter a distintas dosis de tratamiento en gradación creciente: 6 Gy, 8 Gy y 12 Gy respectivamente.

Para ello se aplicó en primer lugar el procedimiento arriba descrito para la inserción del *bolt* en la fosa posterior de ratones C57BL/6 a los que se les administraron células de la línea GL261 de acuerdo a las coordenadas de nuestro modelo validado de tumor de protuberancia (119). La línea celular GL261 al ser una línea tipificada presenta una cinética tumoral conocida más rápida respecto al modelo con la línea Tp54 por lo que era esperable un crecimiento tumoral dentro de la primera semana de administración. Por este motivo a los 7 días de la inoculación de las células los animales fueron trasladados a la Sección de Radioterapia con su unidad de estabulación para animales de experimentación de la Universidad de Navarra para administrar la radioterapia.

En el momento de llevar a cabo el tratamiento, los animales (n= 8) fueron anestesiados según la técnica estándar y crotados de forma aleatoria para establecer y registrar su pertenencia a cada grupo de dosis correspondiente. Debido al número reducido de ratones asignados al tratamiento, 3 animales quedaron asignados a cada uno de los grupos de 6 Gy y 8 Gy y

RESULTADOS

solamente 2 al grupo de 12 Gy. A continuación, los animales fueron depositados sobre el acelerador en el molde corporal específico que aseguraba una inmovilización adecuada y por tanto una administración homogénea de las dosis correspondientes 6 Gy, 8 Gy y 12 Gy en función del grupo asignado tal y como se ha indicado previamente (Figura 16). La duración del tratamiento fue de 5 minutos por animal de forma aproximada con un tiempo total algo mayor en aquellos grupos de mayor dosis (8 Gy y 12 Gy). Posteriormente los animales permanecieron estabulados junto con el grupo que no había recibido el tratamiento para control de los síntomas y evaluar la eficacia, tolerancia y toxicidad de las distintas dosimetrías entre sí y con el grupo que no había sido sometido a radioterapia.

Los animales recibieron un seguimiento diario para evaluar la aparición de síntomas neurológicos sugestivos de afectación de tronco, como alteración de la marcha por pérdida de fuerza o inestabilidad y giro continuo sobre sí mismos.

Cuando los animales presentaban dichos síntomas se sacrificaban de acuerdo al protocolo ético establecido, se registraban los días transcurridos desde la inoculación de las células para el estudio de supervivencia y por último se extraían los cerebros de los animales para su fijado histológico y estudio posterior en caso necesario.

RESULTADOS

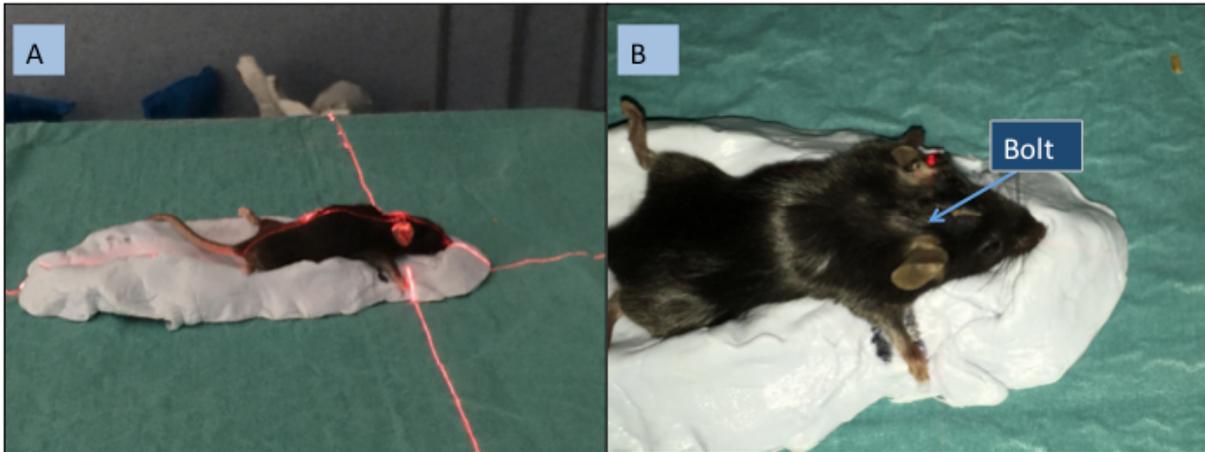


Figura 16. **A** Imagen que ilustra la posición final del animal sobre el molde corporal con el láser del acelerador lineal que marca el punto de irradiación centrado sobre el *bolt* antes de la aplicación del tratamiento. **B** Detalle del proceso de selección de la diana centrandó el punto medio del láser directamente sobre el *bolt* que queda subcutáneo, facilitando el proceso y acortando la duración del tratamiento por cada animal.

De este modo se obtuvo una mediana de supervivencia en el grupo control de 14 días (± 3.64 Desviaciones Estándar, DE, IC 95 % entre 13-17 días). Las medianas de supervivencia de los grupos de tratamiento correspondientes a las dosis de 6, 8 y 12 Gy fueron de 33 días (± 9.81 DE, IC 95 % entre 33-50 días), 63 (± 17.03 DE, IC 95 % entre 44-78) y 74 días (± 5.65 DE, IC 95 % entre 70-78 días) en cada grupo respectivamente.

No se registraron efectos adversos derivados de la administración de radioterapia en ninguno de los grupos, ni siquiera en el grupo que recibió las dosis más altas. Las curvas de supervivencia de cada grupo se representan en la figura 17.

Por tanto en base a estos datos se comprueba que a igual tolerancia, se observa una tendencia a una mejor respuesta del tumor cuanto mayor sea la dosis de radioterapia administrada.

RESULTADOS

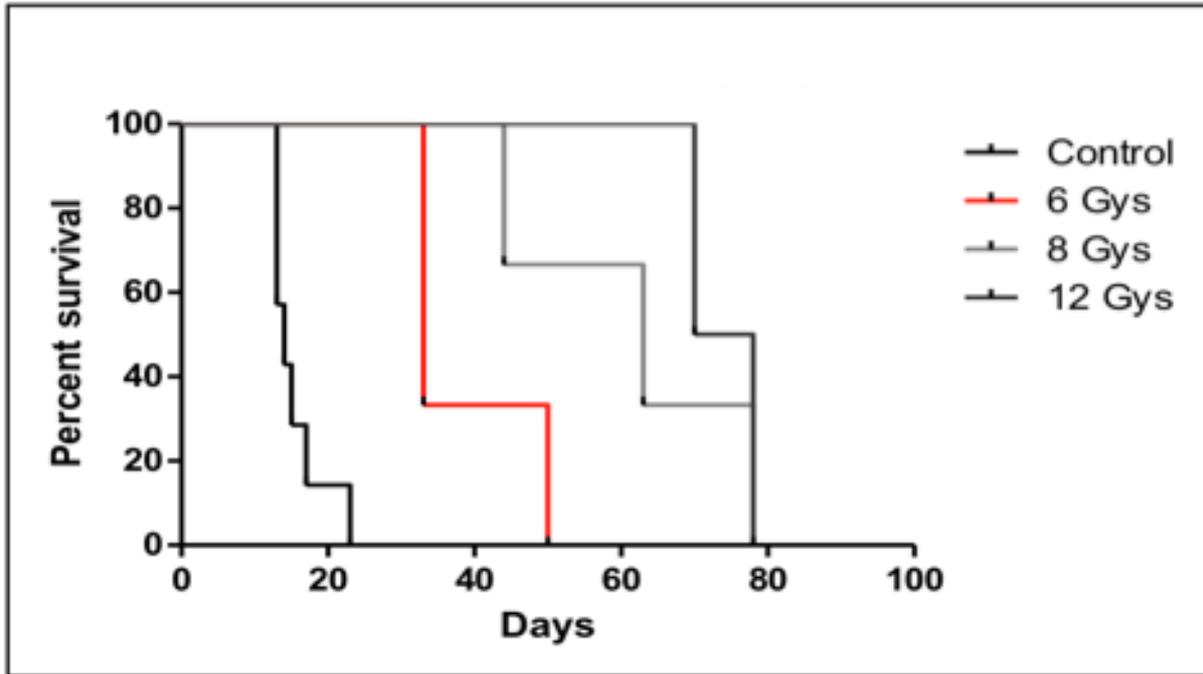


Figura 17. Estudio de supervivencia del experimento que evaluaba la eficacia y toxicidad de las distintas dosimetrías con el modelo tumoral de la línea GL261. Se identificaron las medianas de supervivencia de cada uno de los grupos: control 14 días, grupo de 6 Gy 33 días, grupo de 8 Gy 63 días y grupo de dosis máxima de 12 Gy 74 días. Estos resultados confirman que a igual tolerancia y en ausencia de toxicidad, cuanto mayor es la dosis de radioterapia administrada, mayor es la supervivencia obtenida entre los distintos grupos.

4.2.2 Evaluación del impacto de la asociación de radioterapia y el anticuerpo 4-1BB en el modelo DIPG

Una vez establecido el estudio de la dosis de radioterapia que nos proporcionaba la ventana terapéutica lo suficientemente amplia como para controlar el tumor sin obtener una regresión del mismo, situación que se da en los pacientes con DIPG, procedimos a evaluar la combinación de radioterapia (6Gy) con un anticuerpo inmunomodulador (anti-4-1BB). Este experimento incluyó 40 ratones distribuidos en 4 grupos de 10 animales cada uno. A todos los animales se les realizó la cirugía para inserción del *bolt* e inoculación de la línea celular GL261 para desarrollar el tumor de la protuberancia el mismo día. Dentro de las primeras 48 horas de la intervención, 2 ratones de los 40 inicialmente intervenidos presentaron síntomas neurológicos severos con alteración de la marcha y pérdida de fuerza por lo que fueron sacrificados antes de la creación de los brazos de tratamiento y se consideró un deterioro en relación con el abordaje quirúrgico.

RESULTADOS

El resto de los ratones del experimento ,38, se recuperaron favorablemente de la cirugía. A continuación, los 38 animales fueron asignados de forma aleatoria a cada uno de los grupos de tratamiento en base al crotal de referencia que identificaba a cada animal como perteneciente a un brazo determinado del mismo. Finalmente los grupos quedaron distribuidos del siguiente modo:

El grupo A (n=10) correspondía a los controles a los que sólo se les administraron las células tumorales. El grupo B (n=9) correspondía al conjunto de animales a los que se les administró sólo el anticuerpo agonista 4-1BB: primero intratumoralmente a través del *bolt* (30 µg/5 µl/ratón) el día 3 postinoculación de las células y en los siguientes 3 ciclos 200 µg del fármaco administrado sistémicamente por vía intraperitoneal según protocolo establecido los días 10, 12 y 14 respectivamente tras la inoculación de las células. El grupo C estaba compuesto por 10 animales a los que se les iba a administrar una dosis de 6 Gy sobre la región del *bolt* el día 7 tras la introducción de las células, de acuerdo con la planificación y dosimetría obtenidas del experimento anterior.

Finalmente, el grupo de tratamiento D (n=9) recibió el anticuerpo intratumoral el día 3 postcirugía, radioterapia el día 7 tras la administración de las células tumorales, y sucesivamente anticuerpo 41BB por vía sistémica los días 10 ,12 y 14 tras la primera intervención. Dicho experimento puede resumirse de acuerdo al siguiente esquema (Figura 18).

RESULTADOS

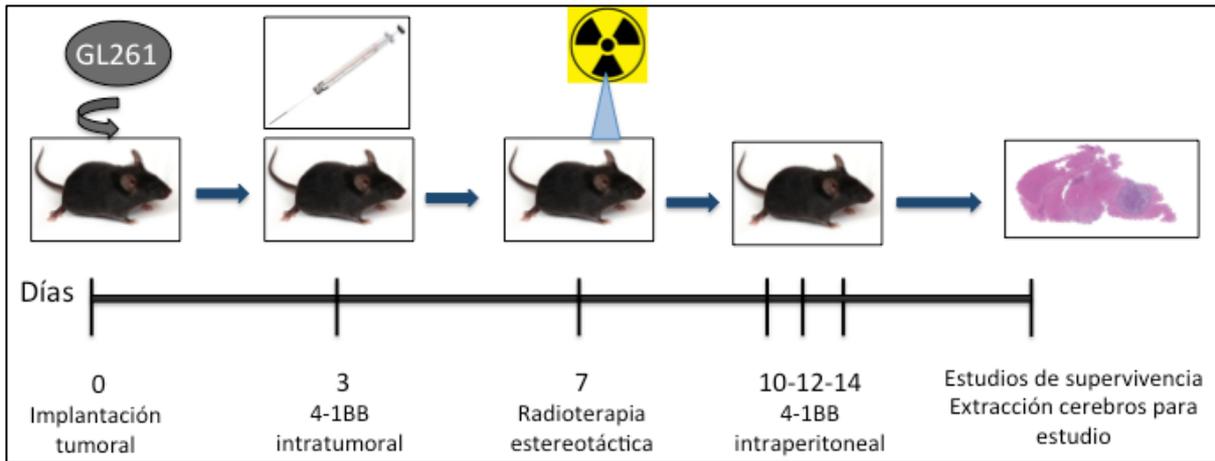


Figura 18. Esquema del protocolo de tratamiento que estudia la seguridad y eficacia de la administración conjunta del anticuerpo agonista 4-1BB y radioterapia.

Los animales pertenecientes a los grupos de radioterapia en monoterapia y radioterapia junto con anti-4-1BB recibieron además el anticuerpo murino correspondiente al isotipo control Ig G1 (anticuerpo antiperoxidasa Horseradish) del anticuerpo anti-4-1BB.

De forma similar al experimento anterior, cuando los animales presentaban síntomas de afectación de la protuberancia se sacrificaban, registrando los datos de supervivencia como días tras la inoculación y se fijaban y guardaban los cerebros para su estudio posterior.

Los controles presentaron una mediana de supervivencia de 19 ± 2.90 días DE (IC 95 % entre 19-21.50 días). El grupo de tratamiento con el anticuerpo en monoterapia (grupo B) presentó una mediana de 26 ± 2.53 días DE (IC 95 % 21-26). Los animales del grupo C, a los que se les administró radioterapia (6Gy) centrada sobre el campo delimitado por el *bolt*, presentaron una mediana de supervivencia discretamente superior que los grupos A y B de 32 ± 8.48 días DE (IC 95 % 29-38) y en la línea de la eficacia que mostraba la radioterapia en monoterapia con 6 Gy evaluada en el experimento anterior (mediana de supervivencia de 33 días). Finalmente el grupo de tratamiento combinado presentó los mejores resultados con una mediana de supervivencia de 35 ± 31.57 días DE (IC 95 % 35-100) (Tabla 1).

Estadísticos descriptivos

| Grupos | Mediana (días) | Desv. Típica | Intervalo de confianza al 95% del valor de la mediana | |
|-----------------|----------------|--------------|---|-----------------|
| | | | Límite inferior | Límite superior |
| Control | 19.00 | 2.906 | 18.00 | 21.50 |
| Ac 4-1BB | 26.00 | 8.025 | 21.00 | 26.00 |
| Rt (6Gy) | 32.00 | 8.485 | 29.00 | 38.00 |
| Rt-4-1BB | 35.00 | 32.205 | 34.50 | 100.00 |

Tabla 1. Valores estadísticos descriptivos de las medianas de supervivencia con sus desviaciones típicas y los intervalos de confianza calculados al 95 % para los distintos grupos de tratamiento arrojados por el programa estadístico SPSS 2.0 IBM.

Es importante señalar que dentro del grupo de tratamiento que recibió la asociación de anti-4-1BB y radioterapia, 4 de los 9 animales presentaron una supervivencia superior a 60 días muy por encima de la mediana de supervivencia alcanzada por el grupo control, 19 días. Además, 3 ratones de este grupo presentaron una supervivencia mediana mayor de 100 días y continuaron vivos al final del estudio. Es por esto que la mediana de este grupo, aun siendo superior a la de los demás brazos de tratamiento, presentaba unos valores correspondientes al intervalo de confianza mucho más amplios que lo señalado por el propio valor de la mediana, reflejando así el impacto estadístico alcanzado por la combinación del tratamiento en este grupo. Por este motivo consideramos el punto de corte de 100 días como el final del período de seguimiento alcanzado en este estudio de supervivencia y los tres ratones que permanecieron vivos al final del mismo y que presentaron una supervivencia superior a este valor constituyeron un subgrupo de largos supervivientes.

RESULTADOS

Además de dicho impacto en la supervivencia, el análisis de los cortes histopatológicos de los 4 grupos confirmó una tendencia a desarrollar un menor volumen tumoral sobre todo en aquellos grupos que recibieron radioterapia en monoterapia o la combinación de radioterapia y anticuerpo al compararlos con el grupo control y el grupo que recibió sólo anticuerpo (Figura 19).

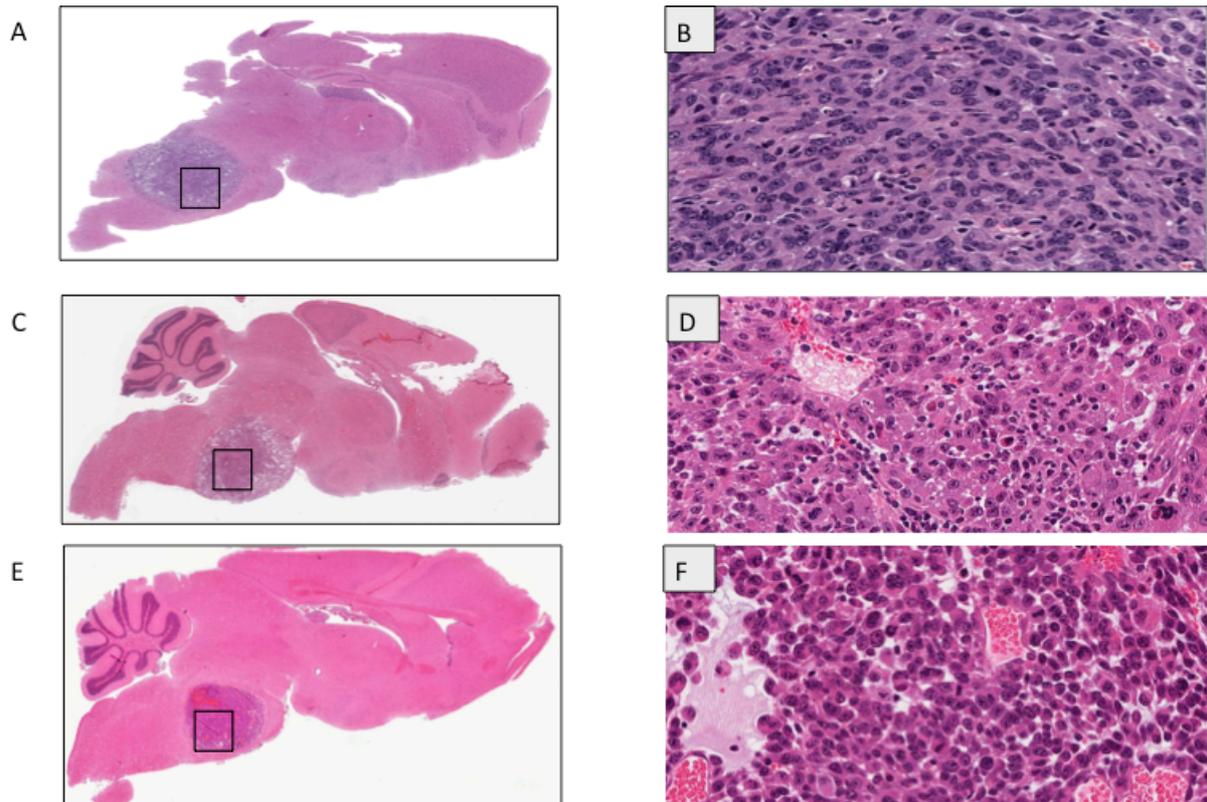


Figura 19. A y B corresponden a los cortes histopatológicos de un control y el recuadro corresponde a una ampliación x20 del mismo. C y D Las imágenes corresponden al grupo que recibió radioterapia en monoterapia donde se aprecia una reducción de la densidad celular respecto al estudio control. Finalmente E y F ilustran el efecto que sobre el volumen tumoral total ejerce la combinación de ambas terapias lo que contribuye a un aumento de supervivencia que se correlaciona con un mayor control sobre la población celular tumoral.

Posteriormente se calcularon las curvas de supervivencia con el método de Kaplan-Meier proporcionado por el software de GraphPad Prism y por el programa SPSS IBM 2.0 con el que además se compararon sus resultados con el test de log rank. La curva correspondiente al grupo de tratamiento que recibió la radioterapia en combinación con el anticuerpo anti-4-1BB arrojó unos resultados estadísticamente superiores ($p < 0.0001$) respecto al grupo control y los grupos con el anticuerpo y la radioterapia en monoterapia (Figura 20 y tabla 2). Además,

RESULTADOS

al llevar a cabo la comparación de cada una de las curvas con el grupo de mayor beneficio (combinación de radioterapia y anticuerpo), se mantuvo la significación estadística observada en el análisis general (Tabla 3).

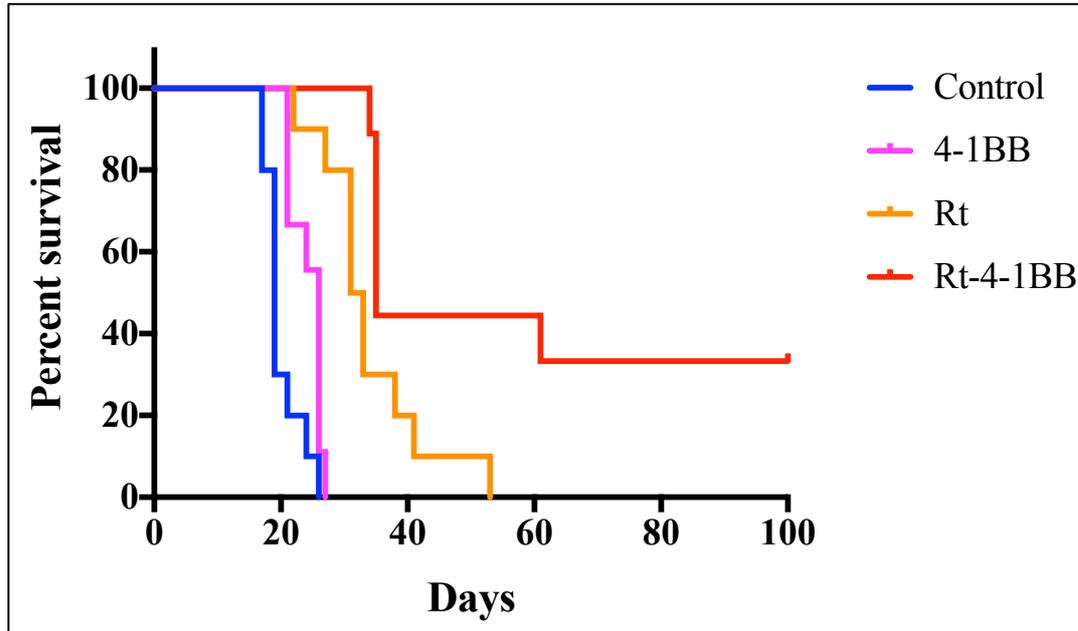


Figura 20. Curvas de supervivencia obtenidas con el programa GraphPad Prism correspondientes al experimento que evaluaba la eficacia del tratamiento combinado de radioterapia y anticuerpo 4-1BB.

| Comparaciones globales | | | |
|---|--------------|----|-------|
| | Chi-cuadrado | gl | Sig. |
| Log Rank (Mantel-Cox) | 49.135 | 3 | 0.000 |
| Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de Grupo: 1 Control, 2 4-1BB, 3 Rt, 4 Rt-4-1BB. | | | |

Tabla 2. Resultados del test log rank que refleja las diferencias estadísticamente significativas encontradas al realizar la comparación entre las distintas curvas de de supervivencia.

RESULTADOS

| Supervivencia comparativa entre distintos brazos de tratamiento | | |
|--|--------------------|--|
| Sup. comparativa | Mediana sup (días) | Test de Log rank (Mantel-Cox) |
| Grupo Rt | 32.00 | Valor Chi-cuadrado (1gl) 7.009 Sig. 0.0081 |
| Grupo Rt+Ac | 35.00 | |
| Grupo Ac | 26.00 | Valor Chi-cuadrado (1gl) 18.28 Sig. 0.0001 |
| Grupo Rt+Ac | 35.00 | |
| Grupo Ac | 26.00 | Valor Chi-cuadrado (1gl) 13.35 Sig. 0.0003 |
| Grupo Rt | 32.00 | |

Tabla 3. Al confrontar las curvas de supervivencia de los brazos de tratamiento de anticuerpo y radioterapia en monoterapia y compararlas por separado con el grupo combinado se confirma la significación estadística. La radioterapia en monoterapia supone un beneficio estadísticamente significativo al compararlo con el grupo de anticuerpo pero superado por el impacto en supervivencia que supone la administración del tratamiento combinado.

Para comprobar si existía una correlación entre el aumento de la supervivencia observada entre cada uno de los grupos y la presencia de una respuesta inmune antitumoral, llevamos a cabo una determinación de CD3 mediante inmunohistoquímica en cada uno de los cerebros extraídos precedentes de los cuatro grupos. Los cerebros fijados y estudiados, cuyas muestras representativas se exponen a continuación, correspondían a los animales de los grupos control y anticuerpo, ambos sacrificados a los 26 días, y radioterapia y combinación, que presentaron síntomas de invasión de tronco a los 31 y 35 días respectivamente. A pesar de no disponer de una cuantificación exacta del propio CD3, puesto que además de las limitaciones de la técnica hay que considerar el tiempo transcurrido desde la inducción y amplificación de la respuesta inmune y las diferentes curvas de supervivencia de cada grupo, es posible observar una tendencia a mantener una presencia de CD3 incluso en el grupo de tratamiento combinado que presentó una mayor supervivencia. Dichas diferencias en este último grupo son más evidentes al compararlas con la inmunohistoquímica del grupo control (Figura 21).

RESULTADOS

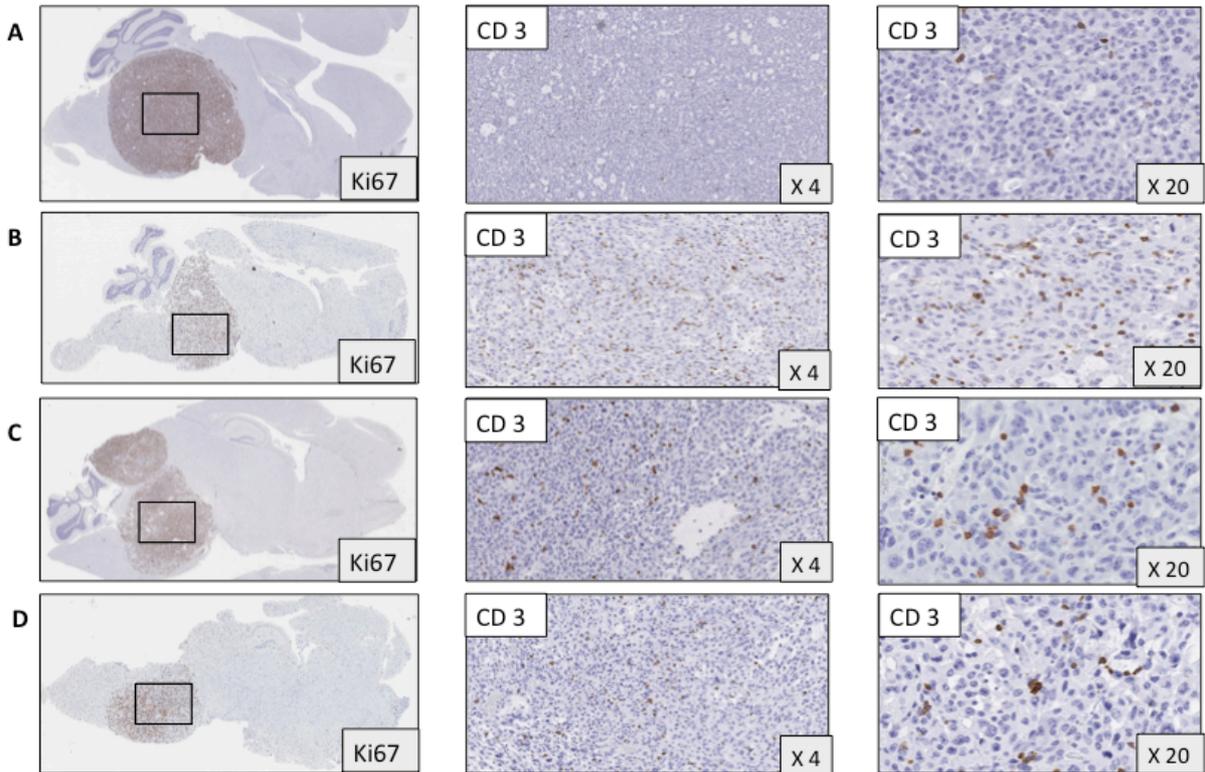


Figura 21. Mediante las letras A, B, C y D se identifican los cortes correspondientes a los cerebros de los grupos control, anticuerpo, radioterapia y la combinación de ambos, marcados según su actividad proliferativa determinada por ki67. En las columnas sucesivas, columna central ampliación del recuadro y columna de la derecha detalle del mismo x 20, se puede comprobar una tendencia constante de la presencia de CD3 incluso en aquellos animales sacrificados a los 35 días como es el caso del grupo de radioterapia y anti-4-1BB, sobre todo al compararlos con el grupo control.

4.2.3 Estudio del efecto de la estimulación inmune antitumoral en ratones de larga supervivencia

Para evaluar si el grupo de ratones de larga supervivencia ($n=3$) que presentaron una supervivencia superior a 100 días, había desarrollado una memoria inmune antitumoral, se sometió a los 3 ratones a un nuevo experimento en el que se volvieron a inocular células GL261 (10×10^3 células/5 μ l/ratón) en la misma diana de implantación tumoral arriba mencionada. Tal y como se ha descrito previamente uno de los beneficios de esta técnica es la seguridad de que el investigador administra de nuevo las células en la misma diana tumoral de acuerdo a la referencia que supone el *bolt*. Para ello se realizó reapertura y exposición del mismo y se administraron a mano las células tumorales utilizando una jeringa de Hamilton sobre la guía del tornillo. A continuación se estableció un registro temporal de acuerdo al

RESULTADOS

protocolo establecido en experimentos anteriores para evaluar la aparición de síntomas neurológicos.

Los 3 ratones alcanzaron una supervivencia superior a 60 días permaneciendo libres de síntomas a pesar de la readministración de las células tumorales en la misma diana quirúrgica inicial.

5. Discusión

5.1 Relevancia traslacional de este nuevo modelo ortotópico de DIPG

Hasta hace relativamente poco tiempo, la obtención de muestras histológicas procedentes de biopsias de pacientes con DIPG no se consideraba necesario ni tampoco posible, debido a las altas tasas de morbi-mortalidad que habían presentado las series de biopsias de estos pacientes. Con ello el campo de obtención de muestras biológicas, aunque potenciado en otros campos de la neurooncología, permanecía inalterado y por tanto estático, en el caso de los DIPG. La escasez de alternativas terapéuticas y los pobres resultados en el cuidado de estos pacientes, provocó un cambio en los protocolos diagnósticos por parte de varios centros multidisciplinares. Gracias a este nuevo esfuerzo, se implementaron nuevas mejoras diagnósticas y terapéuticas de los principales centros pediátricos de referencia con el objetivo de comprender mejor las vías moleculares que regulan el proceso oncogénico de estos tumores. Afortunadamente, con la llegada de las mejoras en la técnica quirúrgica, se establecieron nuevos protocolos para realizar biopsias en la región de la protuberancia de una forma segura y a la vez precisa. Como consecuencia, se establecieron además esfuerzos colaborativos multicéntricos para desarrollar líneas celulares tumorales. Finalmente, el paradigma del tumor DIPG, aunque todavía incurable, ha cambiado significativamente y nuevos proyectos de investigación traslacional se están llevando a cabo actualmente. Una de las líneas sobre las que se está estudiando el comportamiento y eficacia de nuevos fármacos son los modelos animales de DIPG (13, 120, 121).

Nuestro grupo se ha focalizado en el desarrollo de nuevas terapias mediadas por el sistema inmune como el tratamiento con virus oncolíticos o los fármacos reguladores del sistema inmune en el campo de los tumores cerebrales pediátricos así como particularmente en el caso del DIPG. Por tanto, necesitábamos una técnica reproducible a la vez que dinámica que nos permitiera no sólo un desarrollo consistente del tumor a partir de las líneas celulares correspondientes, si no también un sistema que posteriormente nos permitiera la aplicación

DISCUSIÓN

directa de nuevas terapias en la misma región tumoral. Los sistemas desarrollados hasta la fecha basados en estereotaxia han demostrado su fiabilidad y seguridad a la hora de desarrollar los modelos preclínicos de DIPG. De hecho, distintos grupos han permitido la validación de los primeros modelos ortotópicos de DIPG que reproducen la biología y el fenotipo de esta entidad (83, 84, 122, 123).

Sin embargo, en el caso de estudios de supervivencia y eficacia se necesita un gran número de animales por experimento debido a que se evalúan simultáneamente una gran variedad de esquemas de tratamiento y combinaciones de los mismos. Asimismo, en ciertos casos como en nuestro modelo de supervivencia, también se estudia la eficacia de administración intratumoral de los agentes terapéuticos correspondientes. Para la aplicación de todos estos experimentos, el sistema de estereotaxia es complejo y requiere de mucho tiempo además de que este método, aunque preciso en cuanto a coordenadas, no permite adaptar una aguja con la que poder administrar intratumoralmente los fármacos que se quieran testar por esta vía. Con estas limitaciones, el sistema desarrollado por el Dr Lang en el laboratorio de tumores cerebrales del centro MD Anderson, en la división encargada del estudio con pequeños animales, nos proporcionó la técnica idónea para la administración secuencial de distintos tratamientos de una manera constante en la misma diana de todos los individuos del estudio (116).

Por tanto, utilizando el sistema guiado por *bolt*, extrapolamos el modelo previamente descrito con la idea de desarrollar uno nuevo aplicado a los tumores de tronco con el que poder desarrollar nuestro modelo de DIPG.

La principal ventaja de utilizar este sistema basado en un tornillo subaracnoideo o *bolt*, introducido en las coordenadas de la fosa posterior de los animales que reproducen la localización original del DIPG, consiste en la administración celular controlada dentro de la misma diana tumoral sin necesidad de un marco de estereotaxia. Este método permite un

DISCUSIÓN

mayor aprovechamiento del tiempo y de los recursos de laboratorio sin comprometer la reproducibilidad anatómica y biológica al mismo tiempo que no afecta al bien estar del animal. Además, facilita la aplicación de agentes terapéuticos cuya eficacia no se ha demostrado todavía en estos tumores y que pueden administrarse intratumoralmente salvando en parte la resistencia innata a los tratamientos del DIPG. Entre dichas terapias destaca la posibilidad de aplicar adenovirus oncolíticos o incluso fármacos reguladores de los componentes activadores o inhibidores del sistema inmune sin necesidad de repetir una nueva cirugía. Como resultado, este método permitirá la estandarización de futuros experimentos donde varios grupos de tratamientos son estudiados al mismo tiempo y permitirá valorar la eficacia derivada de nuevos agentes administrados intratumoralmente.

5.2 Inmunoterapia contra el DIPG: Aplicación de la radioterapia como punto de partida de las respuestas mediadas por el sistema inmune.

Los DIPG constituyen actualmente un reto dentro de la neurooncología debido a que no existe ningún tratamiento que haya demostrado eficacia o al menos cierta capacidad para obtener un control local de la enfermedad como sucede con otros tumores malignos cerebrales pediátricos, los cuales pueden beneficiarse de distintos regímenes multidisciplinares basados en el tratamiento quirúrgico, radioterapia y/o quimioterapia (14). En el caso concreto del DIPG y debido a sus particularidades anatómicas y biológicas, la radioterapia es la única herramienta que ha obtenido un relativo control transitorio de la carga celular tumoral (13). El papel de la radioterapia como tratamiento oncológico va más allá de sus efectos citolítico y citotóxico directo sobre una diana tumoral concreta. Recientemente, nuevos experimentos *in vitro* e *in vivo* han permitido explorar mejor el papel ejercido por la radioterapia en el microambiente tumoral desde el punto de vista de la regulación de la respuesta inmune antitumoral (94). Por este motivo, consideramos que el abordaje de estos tumores debe llevarse a cabo a partir del beneficio inicial obtenido por la radioterapia,

DISCUSIÓN

ampliando el rol que ésta mantiene actualmente a través de la inducción y promoción de una respuesta antitumoral robusta. Esto es posible debido a que la muerte celular producida tras la administración de la radioterapia (ICD) libera una gran cantidad de neoantígenos tumorales e induce la modulación de diversas cascadas de señalización las cuales se comportan como vías activadoras clave que facilitan la presentación antigénica, contribuyendo finalmente a la activación de linfocitos T citotóxicos. Este proceso da lugar a un rechazo tumoral mediado por el sistema inmune (94, 104).

Sin embargo existen numerosos factores que contribuyen a limitar la respuesta inmune asociada a la radiación. El fraccionamiento y la dosis de la radioterapia pueden influir en las respuestas inmunes dentro del microambiente del tumor, además de la mayor resistencia a la radiación de células inhibitorias (células T reg y MDSC) o la expresión de factores inhibitorios por las células tumorales (PD-L1 y TGF β). Además, debemos tener en cuenta los propios bloqueos derivados del tumor que contribuyen a la evasión del sistema inmune en un paciente concreto por lo que la radioterapia por sí sola es insuficiente para generar una respuesta efectora mantenida en el tiempo y que sea específica tanto a nivel local como a distancia (101). La escasa experiencia preclínica de inmunoterapia aplicada a los tumores cerebrales se reduce a unos pocos trabajos que han evaluado los resultados de la asociación de radioterapia y fármacos inmunomoduladores con distinto mecanismo de acción con resultados prometedores (87, 114, 115).

Otro factor a tener en cuenta es que existe muy poca experiencia en la aplicación de esta aproximación terapéutica en los tumores pediátricos, por lo que en el caso concreto de los tumores de protuberancia encontramos un reto terapéutico importante. Por este motivo y tras disponer de un modelo validado por nuestro grupo de un tumor ortotópico que reproduce las características originales del tumor, hipotetizamos que la asociación de la radioterapia y un

DISCUSIÓN

anticuerpo que promueve la activación de los linfocitos T citotóxicos ,como el anti-4-1BB, podrían suponer una ventaja terapéutica en el manejo de estos tumores.

5.2.1 Eficacia de la administración de radioterapia en monoterapia

En primer lugar llevamos a cabo un experimento que evaluara la eficacia y toxicidad derivada de la administración de radioterapia en dosis crecientes en nuestro modelo animal ortotópico de DIPG con ratones de la cepa inmunocompetente C57BL/6 y la línea celular GL261. Este experimento exploratorio es hasta la fecha uno de los pocos estudios preclínicos que ha evaluado la posibilidad de administrar radioterapia en la protuberancia como tratamiento basal para estudiar futuras combinaciones de tratamiento. Nuestro objetivo consistía en establecer la dosimetría más apropiada sobre la que posteriormente estudiar el efecto asociado de la inmunoterapia de este modelo de DIPG ya que la dosis y planificación de la radioterapia administrada puede influir en la respuesta inmune desencadenada y por tanto en su eficacia clínica. Otro de los factores importantes a tener en cuenta es la toxicidad asociada, ya que además de la carga tumoral presente, es posible que debido a una reacción inflamatoria y edema post-tratamiento los animales puedan llegar a sufrir en algunos casos efectos secundarios severos a nivel del tronco.

Las dosis de radioterapia por debajo de 8-10 Gys contribuyen a producir una liberación antigénica suficiente como para inducir una activación de células efectoras pero sin llegar a provocar una lesión endotelial asociada dentro del campo de radiación la cual puede dificultar la circulación y el reclutamiento de los linfocitos T hacia el microambiente tumoral (94). La mayor parte de estudios animales que han evaluado la aplicación de radioterapia en modelos supratentoriales con la línea GL261, administraban entre 8-10 Gy.

En nuestro experimento se confirma una tendencia creciente en la mediana de supervivencia de cada grupo de 6, 8 y 12 Gy (33, 63 y 74 días respectivamente) comparados con el grupo control (14 días), sin presentar efectos adversos neurológicos derivados del tratamiento en

DISCUSIÓN

ninguno de los grupos. Además de la eficacia, resulta destacable que incluso en el grupo que recibió la dosis mayor, 12 Gy, la tolerancia fue muy buena alcanzando una mediana de supervivencia por encima del resto de los grupos. En el resto de los brazos de tratamiento de 6 y 8 Gy, las medianas de supervivencia alcanzadas (33 y 63 días respectivamente), son ligeramente superiores a las medianas de los subgrupos de tratamiento que evaluaron también la eficacia de la radioterapia en monoterapia aplicada a modelos supratentoriales con la misma línea celular (33 y 63 días en los grupos de 6 y 8 Gy respecto a 23 y 37 días con 10 y 4 Gy aplicado en dos días respectivamente (114, 115).

Estos resultados confirman la eficacia de la aplicación de radioterapia en nuestro modelo de tumor difuso de protuberancia, de manera análoga a la que obtiene en los pacientes con DIPG, sin conllevar asociado ningún efecto adverso en relación con la administración del tratamiento. Para el siguiente experimento que evaluaría la eficacia del tratamiento combinado, escogimos la dosis basal de 6 Gy por dos motivos. En primer lugar, la capacidad para inducir un rechazo tumoral mediado por el sistema inmune se puede alcanzar con dosis inferiores a 8 Gy sin llegar a administrar dosis mayores a 8-10 Gy, las cuales han demostrado además que pueden resultar tóxicas para las células no sólo del sistema inmune si no también del parénquima circundante sobre todo en una región anatómica como la protuberancia donde es imprescindible limitar la dosis y el campo de radiación (95). En segundo lugar, esta dosimetría aplicada a nuestro modelo, y aunque empleando una serie muy pequeña de animales en cada grupo, ha demostrado alcanzar un impacto claro y significativo en la supervivencia similar a la que presentan los estudios que empleaban dosis mayores de hasta 10 Gy en otros modelos supratentoriales (115).

De este modo cualquier diferencia en supervivencia obtenida en un futuro experimento al comparar un tratamiento combinado de radioterapia y anticuerpo anti-4-1BB contribuiría a apoyar el beneficio de la combinación de ambos tratamientos sobre el beneficio estándar de

DISCUSIÓN

cada uno de ellos por separado. Por otro lado, la existencia del *bolt* como referencia a nivel craneal supone una ventaja técnica a la hora de comparar varios grupos de tratamiento de forma simultánea, avance técnico significativo que facilita la elaboración de experimentos preclínicos y el análisis posterior de los distintos brazos de tratamiento.

5.3 Asociación de radioterapia y anticuerpo anti-4-1BB

Nuestro modelo representa uno de los primeros trabajos que basándose en un modelo murino ortotópico de DIPG, evalúa la eficacia de la radioterapia y el inmunomodulador anti-4-1BB. En los últimos años ha quedado patente la evidencia acerca del papel destacado de la radioinmunoterapia como tratamiento del cáncer. Actualmente se ha redefinido el papel de la radioterapia como promotor de una reacción inmune antitumoral tanto a nivel local, en la zona irradiada, como a nivel sistémico debido a su función de reconocimiento a distancia o efecto *abscopal* (100). Sin embargo, la radioterapia como agente inmunomodulador, puede promover bien señales estimuladoras, las cuales contribuyen a desarrollar una muerte celular inmunogénica, pero también otras inhibitorias de esa misma respuesta antitumoral. Por tanto, se ha postulado que el equilibrio entre dichas señales puede desempeñar un papel importante en la eficacia última de las respuestas iniciadas con la radioterapia. De este modo, la combinación de la radioterapia con fármacos inmunomoduladores destinados a potenciar las respuestas innatas y adaptativas iniciadas por la radioterapia constituyen una estrategia fundamental para desarrollar un rechazo antitumoral eficaz con potencial impacto en la supervivencia (94, 98).

En relación al papel del anticuerpo anti-4-1BB, es importante recordar que en condiciones normales las células T reciben diversas señales co-estimuladoras junto con la señal principal producida por la exposición antigénica correspondiente. La ausencia de esa segunda señal coestimuladora puede llevar a la anergia o apoptosis de estas células del sistema inmune, dando lugar a una autoregulación de la activación/inhibición de los componentes del sistema

DISCUSIÓN

inmune (106). Además, la eficacia de una determinada molécula puede verse condicionada por el tipo de célula tumoral original y por su localización anatómica, reflejando de nuevo las particularidades de la actividad inmune a nivel del SNC y sobre todo a nivel de la protuberancia (92). En este contexto, una de las muchas alternativas que actualmente se encuentran en fase de evaluación para reclutar y activar células T que actúen a nivel del microambiente tumoral es el receptor 4-1BB. Hasta ahora su función como inmunomodulador y eficacia se encuentran limitados a los resultados obtenidos en modelos animales supratentoriales de GBM y otros modelos tumorales de metástasis cerebrales (106, 115). 4-1BB representa una diana atractiva puesto que se expresa en células T CD4 + y CD 8 + aproximadamente 48 horas después de su activación siendo responsable como se ha revisado anteriormente de la amplificación y mantenimiento de una respuesta ya iniciada en el contexto de una respuesta primaria al crecimiento tumoral, el cual representa un umbral antigénico mínimo como para iniciar dicha respuesta (92, 106). Además, diferentes modelos animales en los que se ha testado la eficacia de dicho fármaco, llegaron a la conclusión de que la administración de un anticuerpo anti-4-1BB inmediatamente tras la implantación de las células tumorales, no obtuvo el mismo beneficio en respuesta antitumoral como la aplicación del mismo tratamiento en las mismas dosis pero en un momento más tardío, es decir una vez que las células tumorales se han establecido en el lecho de administración y han generado una respuesta inicial. Éste es, además, el escenario más probable del sistema inmune de un paciente que se enfrenta a un tumor cerebral difuso en la protuberancia debido a su patrón de crecimiento infiltrante y progresivo. Por este motivo, en nuestro modelo administramos la primera dosis del anticuerpo a nivel intratumoral a las 72 horas de la inoculación de las células tumorales y posteriormente en 3 aplicaciones sistémicas sucesivas en los días 10, 12 y 14.

DISCUSIÓN

Además de la administración intraperitoneal, en nuestro modelo aplicamos un nuevo esquema terapéutico en el que la administración sistémica en 3 días sucesivos iba precedida de una administración intratumoral debido a 2 razones principales. En primer lugar y basándonos en modelos animales previos (94, 112), es reconocido el potencial beneficio derivado de una respuesta amplificada producida por el efecto que sobre el sistema inmune ejerce el anticuerpo al administrarlo a nivel local sobre el lecho de implantación tumoral. En segundo lugar, la presencia del *bolt* en nuestro modelo proporciona una herramienta sencilla que asegura la administración directa de la molécula elegida directamente sobre dicho microambiente tumoral.

Respecto al esquema de combinación de radioterapia y anti-4-1BB, es conveniente optimizar las ventajas inmunológicas que proporciona cada aproximación terapéutica por separado de forma que no sean herramientas antagónicas si no sinérgicas. Hasta la fecha no se ha definido cómo debe ser la secuencia de administración más eficaz. Sin embargo y debido a que en nuestro modelo hemos testado el anticuerpo anti-4-1BB, los mejores resultados parecen los derivados de la aplicación de radioterapia en primer lugar, como factor iniciador de la activación de las células del sistema inmune a través de sus efectos inmunoreguladores y en segundo lugar y de forma secuencial, administrar el anticuerpo anti-4-1BB una vez que la activación ya ha sido iniciada y de esta manera contribuir al sostenimiento de su expansión.

5.3.1 Impacto traslacional derivado del tratamiento combinado

En primer lugar, de los resultados de nuestro experimento se puede concluir que la administración del anti-4-1BB por separado no presenta ninguna ventaja en supervivencia al compararlo con el grupo control (26 versus 19 días de mediana de supervivencia respectivamente), confirmando así en este modelo de tumor de protuberancia la tendencia observada en otros tumores generados a nivel supratentorial (114, 115). Esta tendencia hacia un efecto discreto en monoterapia puede deberse a que el anticuerpo anti-4-1BB presenta un

DISCUSIÓN

perfil de acción a nivel del microambiente tumoral diferente respecto al mecanismo de acción de otras moléculas más exploradas como los anticuerpos anti-CTLA-4 o PD1/PDL-1(115). Éstas últimas han demostrado una mayor eficacia en su asociación concomitante con la radioterapia y aunque actúan a distintos niveles de la modulación de la respuesta inmune, su efecto es independiente de la secuencia temporal de administración. Sin embargo, el efecto derivado de la administración del anticuerpo anti-4-1BB se concentra después de la activación de las células T y una vez que han recibido una señal activadora principal, actuando por tanto como moléculas coestimuladoras promotoras de la expansión y no de la inducción de la respuesta inmune. Por otro lado, hipotetizamos que los mecanismos de resistencia anatómicos y moleculares presentes en la protuberancia del animal pueden asemejarse a la dificultad observada en el tratamiento de los tumores de pacientes diagnosticados de DIPG y por tanto con respuestas diferentes respecto a la localización hemisférica de los tumores cerebrales.

En segundo lugar, los hallazgos obtenidos en el grupo tratado con radioterapia en monoterapia se corresponden con los resultados significativos y ampliamente descritos con anterioridad obtenidos con la aplicación de la radiación ionizante en múltiples modelos que reproducen tumores cerebrales primarios y metastásicos (114). A pesar de que en nuestro modelo no se ha estudiado ni descrito en detalle las consecuencias a nivel celular y molecular producidas sobre el sistema inmune de los animales tratados y a que la determinación de CD3 corresponde hasta cierto punto a un marcador general y poco específico de la respuesta inducida, es previsible que gran parte del éxito de este tratamiento en un tumor tan característico que no se ha beneficiado de ningún debulking quirúrgico, se deba en gran medida a las modificaciones inmunológicas inducidas por la radiación y apoyadas posteriormente por la administración pre y post del anti-4-1BB en un tumor confinado en la protuberancia. Las conclusiones de dicho planteamiento quedan reforzadas además a la luz de

DISCUSIÓN

la presencia de la inmunotinción para CD3, observada en cada uno de los grupos, pero también en aquellos animales que presentaron el mayor beneficio en la supervivencia lo cual puede contribuir también a dificultar la detección de los distintos componentes de la respuesta inmune en una fase tan tardía.

Finalmente de entre cada uno de los grupos aleatorizados a recibir los distintos brazos del tratamiento, el grupo que obtuvo un mayor beneficio de supervivencia fue la combinación de radioterapia y anti-4-1BB con una supervivencia mediana de 35 días que supuso una diferencia estadísticamente significativa entre todas las curvas de supervivencia. A pesar de alcanzar la significación estadística, la amplitud de la diferencia alcanzada por este grupo se entiende mejor al revisar los resultados de los intervalos de confianza para cada grupo. El intervalo al 95 % para el grupo de tratamiento combinado se encuentra entre 35-100 días, resaltando de este modo el beneficio obtenido en 4 de los 9 animales (44.5%) que alcanzaron una supervivencia superior a 60 días. Si revisamos los datos desde el otro extremo, encontramos además que el animal del grupo de tratamiento combinado que comenzó a presentar síntomas neurológicos severos de forma más precoz alcanzó una supervivencia de 34 días respecto a la mediana del grupo de radioterapia (32 días). A la luz de estos resultados se puede concluir que el efecto del anti-4-1BB supone una ventaja terapéutica robusta y consistente en aquellos animales en los que se aplicó además la radioterapia y en base a su mecanismo de acción es muy probable que esta diferencia de efecto que alcanza la significación estadística se encuentre sustentada en la ventaja inmunológica derivada de la suma de ambas estrategias terapéuticas.

Además, la consistencia de estos resultados queda reforzada por la presencia de 3 ratones del grupo combinado que presentaron una supervivencia extendida (> 100 días tras la primera inoculación celular con ausencia de síntomas) y a los que se les volvió a administrar nuevamente la misma línea celular en la diana previa. Este pequeño grupo permaneció libre

DISCUSIÓN

de síntomas 60 días después de la segunda inoculación celular tumoral. Aunque se trata de un número de animales muy reducido y del que no disponemos un análisis histopatológico del estado del tumor en dicho período, estos animales han presentado una tendencia a rechazar de nuevo el tumor administrado probablemente al haber desarrollado una respuesta inmune antitumoral memoria. Sin embargo, se requieren nuevos experimentos que puedan confirmar mediante estudios más exhaustivos esta tendencia observada.

Por tanto, con el objetivo de trasladar estos resultados al campo de la aplicación clínica, consideramos que existe evidencia preclínica suficiente para apoyar que una de los posibles herramientas terapéuticas de estos pacientes pueda establecerse a partir de la combinación de la radioterapia y una molécula inmunomoduladora para generar una respuesta antitumoral apropiada, mantenida y eficaz.

Sin embargo aunque el futuro parece más cercano, todavía se desconoce el tratamiento de estos tumores y la investigación futura deberá dirigirse no sólo hacia una mejor definición de su origen genético, si no también a sus mecanismos de defensa inmunológicos con el objetivo de determinar la combinación terapéutica más eficaz y mejor tolerada en estos pacientes.

6. Conclusiones

1. El estudio histopatológico confirmó la presencia de tumor a nivel de la protuberancia en todos los animales a los que se les administraron las células según la guía del *bolt*, validando nuestro modelo ortotópico de tumor difuso de protuberancia.
2. Esta técnica basada en el desarrollo de un tumor de protuberancia a través de la guía del *bolt* supone una ventaja instrumental para facilitar el desarrollo de futuros experimentos en DIPG al tratarse de una técnica reproducible y consistente.
3. Debido a la referencia externa que supone el *bolt* y al estar directamente centrado sobre la protuberancia en profundidad, es posible aplicar y evaluar nuevas aproximaciones terapéuticas tanto invasivas como no invasivas al estar selectivamente administrados o dirigidos sobre la zona de implatación celular tumoral.
4. La aplicación de radioterapia sobre nuestro modelo guiado con tornillo constituye una técnica rápida y robusta al referenciar las coordenadas del tratamiento sobre el *bolt*. El rango de dosis de radioterapia que ha demostrado en nuestro modelo animal inmunocompetente un mayor beneficio en supervivencia sin toxicidad asociada se encuentra entre 4 y 12 Gy.
5. La combinación de radioterapia y anticuerpo anti-4-1BB ha demostrado en nuestro modelo un impacto estadísticamente significativo en cuanto a supervivencia y beneficio clínico al compararlo con el resto de grupos de tratamiento y el grupo control. Además, entre dicho grupo de tratamiento combinado se diferenció un subgrupo de largos supervivientes (n=3), los cuales no desarrollaron ningún signo neurológico sugestivo de invasión tumoral del tronco al final del estudio, referenciado en 100 días tras la administración inicial de las células tumorales.
6. A pesar de la ausencia de detección de marcadores específicos de la respuesta inmune generada, la aplicación conjunta y secuencial de los tratamiento de radioterapia y anticuerpo anti-4-1BB orientan a un mecanismo regulado por el sistema inmune de dicha respuesta clínica generada. La identificación de inmunomarcaje con CD3 en las muestras de los cerebros de ratones que presentaron una mediana de supervivencia superior a 35 días, sobre todo al compararlas con el grupo control, podría apoyar dicha hipótesis.

7. Bibliografía

1. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-oncology*. 2015;17 Suppl 4:iv1-iv62.
2. Warren KE. Diffuse intrinsic pontine glioma: poised for progress. *Frontiers in oncology*. 2012;2:205.
3. Stiller CA, Kroll ME, Pritchard-Jones K. Population survival from childhood cancer in Britain during 1978-2005 by eras of entry to clinical trials. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2012;23(9):2464-9.
4. Harris W. A Case of Pontine Glioma, with Special Reference to the Paths of Gustatory Sensation. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. 1926;19(Neurol Sect):1-5.
5. Epstein F, Wisoff JH. Intrinsic brainstem tumors in childhood: surgical indications. *Journal of neuro-oncology*. 1988;6(4):309-17.
6. Epstein FJ, Farmer JP. Brain-stem glioma growth patterns. *Journal of neurosurgery*. 1993;78(3):408-12.
7. Rubin G, Michowitz S, Horev G, Herscovici Z, Cohen IJ, Shuper A, et al. Pediatric brain stem gliomas: an update. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 1998;14(4-5):167-73.
8. Fangusaro J, Finlay J, Sposto R, Ji L, Saly M, Zacharoulis S, et al. Intensive chemotherapy followed by consolidative myeloablative chemotherapy with autologous hematopoietic cell rescue (AuHCR) in young children with newly diagnosed supratentorial primitive neuroectodermal tumors (sPNETs): report of the Head Start I and II experience. *Pediatric blood & cancer*. 2008;50(2):312-8.
9. Angelini P, Hawkins C, Laperriere N, Bouffet E, Bartels U. Post mortem examinations in diffuse intrinsic pontine glioma: challenges and chances. *Journal of neuro-oncology*. 2011;101(1):75-81.
10. Stroink AR, Hoffman HJ, Hendrick EB, Humphreys RP. Diagnosis and management of pediatric brain-stem gliomas. *Journal of neurosurgery*. 1986;65(6):745-50.
11. Pollack IF, Hoffman HJ, Humphreys RP, Becker L. The long-term outcome after surgical treatment of dorsally exophytic brain-stem gliomas. *Journal of neurosurgery*. 1993;78(6):859-63.
12. Grimm SA, Chamberlain MC. Brainstem glioma: a review. *Current neurology and neuroscience reports*. 2013;13(5):346.
13. Hennika T, Becher OJ. Diffuse Intrinsic Pontine Glioma: Time for Cautious Optimism. *Journal of child neurology*. 2016;31(12):1377-85.
14. Vanan MI, Eisenstat DD. DIPG in Children - What Can We Learn from the Past? *Frontiers in oncology*. 2015;5:237.
15. Lassiter KR, Alexander E, Jr., Davis CH, Jr., Kelly DL, Jr. Surgical treatment of brain stem gliomas. *Journal of neurosurgery*. 1971;34(6):719-25.
16. Lassman LP, Arjona VE. Pontine gliomas of childhood. *Lancet (London, England)*. 1967;1(7496):913-5.

BIBLIOGRAFÍA

17. Robison NJ, Kieran MW. Diffuse intrinsic pontine glioma: a reassessment. *Journal of neuro-oncology*. 2014;119(1):7-15.
18. Soler D, Borzyskowski M. Lower urinary tract dysfunction in children with central nervous system tumours. *Archives of disease in childhood*. 1998;79(4):344-7.
19. Hargrave D, Bartels U, Bouffet E. Diffuse brainstem glioma in children: critical review of clinical trials. *The Lancet Oncology*. 2006;7(3):241-8.
20. Bradley KA, Zhou T, McNall-Knapp RY, Jakacki RI, Levy AS, Vezina G, et al. Motexafin-gadolinium and involved field radiation therapy for intrinsic pontine glioma of childhood: a children's oncology group phase 2 study. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2013;85(1):e55-60.
21. Jackson S, Patay Z, Howarth R, Pai Panandiker AS, Onar-Thomas A, Gajjar A, et al. Clinico-radiologic characteristics of long-term survivors of diffuse intrinsic pontine glioma. *Journal of neuro-oncology*. 2013;114(3):339-44.
22. Albright AL, Packer RJ, Zimmerman R, Rorke LB, Boyett J, Hammond GD. Magnetic resonance scans should replace biopsies for the diagnosis of diffuse brain stem gliomas: a report from the Children's Cancer Group. *Neurosurgery*. 1993;33(6):1026-9; discussion 9-30.
23. Yoshimura J, Onda K, Tanaka R, Takahashi H. Clinicopathological study of diffuse type brainstem gliomas: analysis of 40 autopsy cases. *Neurologia medico-chirurgica*. 2003;43(8):375-82; discussion 82.
24. Caretti V, Bugiani M, Freret M, Schellen P, Jansen M, van Vuurden D, et al. Subventricular spread of diffuse intrinsic pontine glioma. *Acta neuropathologica*. 2014;128(4):605-7.
25. Steffen-Smith EA, Shih JH, Hipp SJ, Bent R, Warren KE. Proton magnetic resonance spectroscopy predicts survival in children with diffuse intrinsic pontine glioma. *Journal of neuro-oncology*. 2011;105(2):365-73.
26. Prabhu SP, Ng S, Vajapeyam S, Kieran MW, Pollack IF, Geyer R, et al. DTI assessment of the brainstem white matter tracts in pediatric BSG before and after therapy: a report from the Pediatric Brain Tumor Consortium. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2011;27(1):11-8.
27. Zukotynski KA, Fahey FH, Kocak M, Alavi A, Wong TZ, Treves ST, et al. Evaluation of 18F-FDG PET and MRI associations in pediatric diffuse intrinsic brain stem glioma: a report from the Pediatric Brain Tumor Consortium. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2011;52(2):188-95.
28. Hargrave D, Chuang N, Bouffet E. Conventional MRI cannot predict survival in childhood diffuse intrinsic pontine glioma. *Journal of neuro-oncology*. 2008;86(3):313-9.
29. Poussaint TY, Kocak M, Vajapeyam S, Packer RI, Robertson RL, Geyer R, et al. MRI as a central component of clinical trials analysis in brainstem glioma: a report from the Pediatric Brain Tumor Consortium (PBTC). *Neuro-oncology*. 2011;13(4):417-27.
30. Packer RJ, Boyett JM, Zimmerman RA, Albright AL, Kaplan AM, Rorke LB, et al. Outcome of children with brain stem gliomas after treatment with 7800 cGy of hyperfractionated radiotherapy. A Childrens Cancer Group Phase I/II Trial. *Cancer*. 1994;74(6):1827-34.
31. Jansen MH, van Vuurden DG, Vandertop WP, Kaspers GJ. Diffuse intrinsic pontine gliomas: a systematic update on clinical trials and biology. *Cancer treatment reviews*. 2012;38(1):27-35.

BIBLIOGRAFÍA

32. Mandell LR, Kadota R, Freeman C, Douglass EC, Fontanesi J, Cohen ME, et al. There is no role for hyperfractionated radiotherapy in the management of children with newly diagnosed diffuse intrinsic brainstem tumors: results of a Pediatric Oncology Group phase III trial comparing conventional vs. hyperfractionated radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1999;43(5):959-64.
33. Janssens GO, Gidding CE, Van Lindert EJ, Oldenburger FR, Erasmus CE, Schouten-Meeteren AY, et al. The role of hypofractionation radiotherapy for diffuse intrinsic brainstem glioma in children: a pilot study. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;73(3):722-6.
34. Janssens GO, Jansen MH, Lauwers SJ, Nowak PJ, Oldenburger FR, Bouffet E, et al. Hypofractionation vs conventional radiation therapy for newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma: a matched-cohort analysis. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2013;85(2):315-20.
35. Zaghloul MS, Eldebawy E, Ahmed S, Mousa AG, Amin A, Refaat A, et al. Hypofractionated conformal radiotherapy for pediatric diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG): a randomized controlled trial. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2014;111(1):35-40.
36. Fontanilla HP, Pinnix CC, Ketonen LM, Woo SY, Vats TS, Rytting ME, et al. Palliative reirradiation for progressive diffuse intrinsic pontine glioma. *American journal of clinical oncology*. 2012;35(1):51-7.
37. Wolff JE, Rytting ME, Vats TS, Zage PE, Ater JL, Woo S, et al. Treatment of recurrent diffuse intrinsic pontine glioma: the MD Anderson Cancer Center experience. *Journal of neuro-oncology*. 2012;106(2):391-7.
38. Bouffet E, Raquin M, Doz F, Gentet JC, Rodary C, Demeocq F, et al. Radiotherapy followed by high dose busulfan and thiotepa: a prospective assessment of high dose chemotherapy in children with diffuse pontine gliomas. *Cancer*. 2000;88(3):685-92.
39. Korones DN, Fisher PG, Kretschmar C, Zhou T, Chen Z, Kepner J, et al. Treatment of children with diffuse intrinsic brain stem glioma with radiotherapy, vincristine and oral VP-16: a Children's Oncology Group phase II study. *Pediatric blood & cancer*. 2008;50(2):227-30.
40. Frazier JL, Lee J, Thomale UW, Noggle JC, Cohen KJ, Jallo GI. Treatment of diffuse intrinsic brainstem gliomas: failed approaches and future strategies. *Journal of neurosurgery Pediatrics*. 2009;3(4):259-69.
41. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*. 2005;352(10):987-96.
42. Cohen KJ, Heideman RL, Zhou T, Holmes EJ, Lavey RS, Bouffet E, et al. Temozolomide in the treatment of children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine gliomas: a report from the Children's Oncology Group. *Neuro-oncology*. 2011;13(4):410-6.
43. Fouladi M, Nicholson HS, Zhou T, Laningham F, Helton KJ, Holmes E, et al. A phase II study of the farnesyl transferase inhibitor, tipifarnib, in children with recurrent or progressive high-grade glioma, medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumor, or brainstem glioma: a Children's Oncology Group study. *Cancer*. 2007;110(11):2535-41.
44. Haas-Kogan DA, Banerjee A, Poussaint TY, Kocak M, Prados MD, Geyer JR, et al. Phase II trial of tipifarnib and radiation in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro-oncology*. 2011;13(3):298-306.

BIBLIOGRAFÍA

45. Gururangan S, Chi SN, Young Poussaint T, Onar-Thomas A, Gilbertson RJ, Vajapeyam S, et al. Lack of efficacy of bevacizumab plus irinotecan in children with recurrent malignant glioma and diffuse brainstem glioma: a Pediatric Brain Tumor Consortium study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(18):3069-75.
46. Massimino M, Biassoni V, Miceli R, Schiavello E, Warmuth-Metz M, Modena P, et al. Results of nimotuzumab and vinorelbine, radiation and re-irradiation for diffuse pontine glioma in childhood. *Journal of neuro-oncology*. 2014;118(2):305-12.
47. Georger B, Hargrave D, Thomas F, Ndiaye A, Frappaz D, Andreiuolo F, et al. Innovative Therapies for Children with Cancer pediatric phase I study of erlotinib in brainstem glioma and relapsing/refractory brain tumors. *Neuro-oncology*. 2011;13(1):109-18.
48. Pollack IF, Stewart CF, Kocak M, Poussaint TY, Broniscer A, Banerjee A, et al. A phase II study of gefitinib and irradiation in children with newly diagnosed brainstem gliomas: a report from the Pediatric Brain Tumor Consortium. *Neuro-oncology*. 2011;13(3):290-7.
49. Broniscer A, Baker SD, Wetmore C, Pai Panandiker AS, Huang J, Davidoff AM, et al. Phase I trial, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of vandetanib and dasatinib in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(11):3050-8.
50. Warren K, Bent R, Wolters PL, Prager A, Hanson R, Packer R, et al. A phase 2 study of pegylated interferon alpha-2b (PEG-Intron((R))) in children with diffuse intrinsic pontine glioma. *Cancer*. 2012;118(14):3607-13.
51. Walker DA, Liu J, Kieran M, Jabado N, Picton S, Packer R, et al. A multi-disciplinary consensus statement concerning surgical approaches to low-grade, high-grade astrocytomas and diffuse intrinsic pontine gliomas in childhood (CPN Paris 2011) using the Delphi method. *Neuro-oncology*. 2013;15(4):462-8.
52. Caretti V, Jansen MH, van Vuurden DG, Lagerweij T, Bugiani M, Horsman I, et al. Implementation of a multi-institutional diffuse intrinsic pontine glioma autopsy protocol and characterization of a primary cell culture. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2013;39(4):426-36.
53. Barrow J, Adamowicz-Brice M, Cartmill M, MacArthur D, Lowe J, Robson K, et al. Homozygous loss of ADAM3A revealed by genome-wide analysis of pediatric high-grade glioma and diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro-oncology*. 2011;13(2):212-22.
54. Paugh BS, Broniscer A, Qu C, Miller CP, Zhang J, Tatevossian RG, et al. Genome-wide analyses identify recurrent amplifications of receptor tyrosine kinases and cell-cycle regulatory genes in diffuse intrinsic pontine glioma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(30):3999-4006.
55. Taylor KR, Mackay A, Truffaux N, Butterfield YS, Morozova O, Philippe C, et al. Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nature genetics*. 2014;46(5):457-61.
56. Roujeau T, Machado G, Garnett MR, Miquel C, Puget S, Georger B, et al. Stereotactic biopsy of diffuse pontine lesions in children. *Journal of neurosurgery*. 2007;107(1 Suppl):1-4.
57. Puget S, Beccaria K, Blauwblomme T, Roujeau T, James S, Grill J, et al. Biopsy in a series of 130 pediatric diffuse intrinsic Pontine gliomas. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2015;31(10):1773-80.

BIBLIOGRAFÍA

58. Kieran MW. Time to rethink the unthinkable: upfront biopsy of children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG). *Pediatric blood & cancer*. 2015;62(1):3-4.
59. Cage TA, Samagh SP, Mueller S, Nicolaides T, Haas-Kogan D, Prados M, et al. Feasibility, safety, and indications for surgical biopsy of intrinsic brainstem tumors in children. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2013;29(8):1313-9.
60. Gleason CA, Wise BL, Feinstein B. Stereotactic localization (with computerized tomographic scanning), biopsy, and radiofrequency treatment of deep brain lesions. *Neurosurgery*. 1978;2(3):217-22.
61. Perez-Gomez JL, Rodriguez-Alvarez CA, Marhx-Bracho A, Rueda-Franco F. Stereotactic biopsy for brainstem tumors in pediatric patients. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*. 2010;26(1):29-34.
62. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica*. 2016;131(6):803-20.
63. Jones C, Baker SJ. Unique genetic and epigenetic mechanisms driving paediatric diffuse high-grade glioma. *Nature reviews Cancer*. 2014;14(10).
64. Wu G, Diaz AK, Paugh BS, Rankin SL, Ju B, Li Y, et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nature genetics*. 2014;46(5):444-50.
65. Bartels U, Hawkins C, Vezina G, Kun L, Souweidane M, Bouffet E. Proceedings of the diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG) Toronto Think Tank: advancing basic and translational research and cooperation in DIPG. *Journal of neuro-oncology*. 2011;105(1):119-25.
66. Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*. 2012;482(7384):226-31.
67. Puget S, Philippe C, Bax DA, Job B, Varlet P, Junier MP, et al. Mesenchymal transition and PDGFRA amplification/mutation are key distinct oncogenic events in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *PloS one*. 2012;7(2):e30313.
68. Schiffman JD, Hodgson JG, VandenBerg SR, Flaherty P, Polley MY, Yu M, et al. Oncogenic BRAF mutation with CDKN2A inactivation is characteristic of a subset of pediatric malignant astrocytomas. *Cancer research*. 2010;70(2):512-9.
69. Buczkowicz P, Hoeman C, Rakopoulos P, Pajovic S, Letourneau L, Dzamba M, et al. Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nature genetics*. 2014;46(5):451-6.
70. Fontebasso AM, Papillon-Cavanagh S, Schwartzenuber J, Nikbakht H, Gerges N, Fiset PO, et al. Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline high-grade astrocytoma. *Nature genetics*. 2014;46(5):462-6.
71. Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu XY, Fontebasso AM, Bouffet E, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta neuropathologica*. 2012;124(3):439-47.
72. Elsaesser SJ, Goldberg AD, Allis CD. New functions for an old variant: no substitute for histone H3.3. *Current opinion in genetics & development*. 2010;20(2):110-7.

BIBLIOGRAFÍA

73. Skene PJ, Henikoff S. Histone variants in pluripotency and disease. *Development* (Cambridge, England). 2013;140(12):2513-24.
74. Aoki Y, Hashizume R, Ozawa T, Banerjee A, Prados M, James CD, et al. An experimental xenograft mouse model of diffuse pontine glioma designed for therapeutic testing. *Journal of neuro-oncology*. 2012;108(1):29-35.
75. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer cell*. 2012;22(4):425-37.
76. Veringa SJ, Biesmans D, van Vuurden DG, Jansen MH, Wedekind LE, Horsman I, et al. In vitro drug response and efflux transporters associated with drug resistance in pediatric high grade glioma and diffuse intrinsic pontine glioma. *PloS one*. 2013;8(4):e61512.
77. Hojfeldt JW, Agger K, Helin K. Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nature reviews Drug discovery*. 2013;12(12):917-30.
78. Grasso CS, Tang Y, Truffaux N, Berlow NE, Liu L, Debily MA, et al. Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nature medicine*. 2015;21(6):555-9.
79. Hashizume R, Ozawa T, Gryaznov SM, Bollen AW, Lamborn KR, Frey WH, 2nd, et al. New therapeutic approach for brain tumors: Intranasal delivery of telomerase inhibitor GRN163. *Neuro-oncology*. 2008;10(2):112-20.
80. Barua NU, Lowis SP, Woolley M, O'Sullivan S, Harrison R, Gill SS. Robot-guided convection-enhanced delivery of carboplatin for advanced brainstem glioma. *Acta neurochirurgica*. 2013;155(8):1459-65.
81. Chittiboina P, Heiss JD, Warren KE, Lonser RR. Magnetic resonance imaging properties of convective delivery in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Journal of neurosurgery Pediatrics*. 2014;13(3):276-82.
82. Hashizume R, Ozawa T, Dinca EB, Banerjee A, Prados MD, James CD, et al. A human brainstem glioma xenograft model enabled for bioluminescence imaging. *Journal of neuro-oncology*. 2010;96(2):151-9.
83. Caretti V, Zondervan I, Meijer DH, Idema S, Vos W, Hamans B, et al. Monitoring of tumor growth and post-irradiation recurrence in a diffuse intrinsic pontine glioma mouse model. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2011;21(4):441-51.
84. Halvorson KG, Barton KL, Schroeder K, Misuraca KL, Hoeman C, Chung A, et al. A high-throughput in vitro drug screen in a genetically engineered mouse model of diffuse intrinsic pontine glioma identifies BMS-754807 as a promising therapeutic agent. *PloS one*. 2015;10(3):e0118926.
85. Ohtsuki S, Terasaki T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharmaceutical research*. 2007;24(9):1745-58.
86. Perng P, Lim M. Immunosuppressive Mechanisms of Malignant Gliomas: Parallels at Non-CNS Sites. *Frontiers in oncology*. 2015;5:153.
87. Kim ES, Kim JE, Patel MA, Mangraviti A, Ruzevick J, Lim M. Immune Checkpoint Modulators: An Emerging Antiglioma Armamentarium. *Journal of immunology research*. 2016;2016:4683607.
88. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4):252-64.
89. Fecci PE, Ochiai H, Mitchell DA, Grossi PM, Sweeney AE, Archer GE, et al. Systemic CTLA-4 blockade ameliorates glioma-induced changes to the CD4+ T cell compartment

BIBLIOGRAFÍA

without affecting regulatory T-cell function. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(7):2158-67.

90. Agarwalla P, Barnard Z, Fecci P, Dranoff G, Curry WT, Jr. Sequential immunotherapy by vaccination with GM-CSF-expressing glioma cells and CTLA-4 blockade effectively treats established murine intracranial tumors. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)*. 2012;35(5):385-9.
91. Zeng J, See AP, Phallen J, Jackson CM, Belcaid Z, Ruzevick J, et al. Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2013;86(2):343-9.
92. Kim JA, Averbook BJ, Chambers K, Rothchild K, Kjaergaard J, Papay R, et al. Divergent effects of 4-1BB antibodies on antitumor immunity and on tumor-reactive T-cell generation. *Cancer research*. 2001;61(5):2031-7.
93. Kong LY, Wei J, Fuller GN, Schrand B, Gabrusiewicz K, Zhou S, et al. Tipping a favorable CNS intratumoral immune response using immune stimulation combined with inhibition of tumor-mediated immune suppression. *Oncoimmunology*. 2016;5(5):e1117739.
94. Demaria S, Golden EB, Formenti SC. Role of Local Radiation Therapy in Cancer Immunotherapy. *JAMA oncology*. 2015;1(9):1325-32.
95. Kang J, Demaria S, Formenti S. Current clinical trials testing the combination of immunotherapy with radiotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2016;4:51.
96. Steel GG, McMillan TJ, Peacock JH. The 5Rs of radiobiology. *International journal of radiation biology*. 1989;56(6):1045-8.
97. Harrington K, Jankowska P, Hingorani M. Molecular biology for the radiation oncologist: the 5Rs of radiobiology meet the hallmarks of cancer. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*. 2007;19(8):561-71.
98. Weichselbaum RR, Liang H, Deng L, Fu YX. Radiotherapy and immunotherapy: a beneficial liaison? *Nature reviews Clinical oncology*. 2017.
99. Pilonis KA, Vanpouille-Box C, Demaria S. Combination of radiotherapy and immune checkpoint inhibitors. *Seminars in radiation oncology*. 2015;25(1):28-33.
100. Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, et al. Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2004;58(3):862-70.
101. Formenti SC, Demaria S. Systemic effects of local radiotherapy. *The Lancet Oncology*. 2009;10(7):718-26.
102. Hasnain M, Noman MZ, Messai Y, Bordereaux D, Gros G, Baud V, et al. Cutting edge: Hypoxia-induced Nanog favors the intratumoral infiltration of regulatory T cells and macrophages via direct regulation of TGF-beta1. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2013;191(12):5802-6.
103. Demaria S, Formenti SC. Radiation as an immunological adjuvant: current evidence on dose and fractionation. *Frontiers in oncology*. 2012;2:153.
104. Vacchelli E, Bloy N, Aranda F, Buque A, Cremer I, Demaria S, et al. Trial Watch: Immunotherapy plus radiation therapy for oncological indications. *Oncoimmunology*. 2016;5(9):e1214790.
105. Croft M. Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine & growth factor reviews*. 2003;14(3-4):265-73.
106. Lynch DH. The promise of 4-1BB (CD137)-mediated immunomodulation and the immunotherapy of cancer. *Immunological reviews*. 2008;222:277-86.

BIBLIOGRAFÍA

107. Melero I, Shuford WW, Newby SA, Aruffo A, Ledbetter JA, Hellstrom KE, et al. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nature medicine*. 1997;3(6):682-5.
108. Taraban VY, Rowley TF, O'Brien L, Chan HT, Haswell LE, Green MH, et al. Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses. *European journal of immunology*. 2002;32(12):3617-27.
109. Wilcox RA, Flies DB, Zhu G, Johnson AJ, Tamada K, Chapoval AI, et al. Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(5):651-9.
110. Shuford WW, Klussman K, Tritchler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, et al. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *The Journal of experimental medicine*. 1997;186(1):47-55.
111. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(9):745-56.
112. Wang C, Lin GH, McPherson AJ, Watts TH. Immune regulation by 4-1BB and 4-1BBL: complexities and challenges. *Immunological reviews*. 2009;229(1):192-215.
113. Miller RE, Jones J, Le T, Whitmore J, Boiani N, Gliniak B, et al. 4-1BB-specific monoclonal antibody promotes the generation of tumor-specific immune responses by direct activation of CD8 T cells in a CD40-dependent manner. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2002;169(4):1792-800.
114. Newcomb EW, Lukyanov Y, Kawashima N, Alonso-Basanta M, Wang SC, Liu M, et al. Radiotherapy enhances antitumor effect of anti-CD137 therapy in a mouse Glioma model. *Radiation research*. 2010;173(4):426-32.
115. Belcaid Z, Phallen JA, Zeng J, See AP, Mathios D, Gottschalk C, et al. Focal radiation therapy combined with 4-1BB activation and CTLA-4 blockade yields long-term survival and a protective antigen-specific memory response in a murine glioma model. *PloS one*. 2014;9(7):e101764.
116. Lal S, Lacroix M, Tofilon P, Fuller GN, Sawaya R, Lang FF. An implantable guide-screw system for brain tumor studies in small animals. *Journal of neurosurgery*. 2000;92(2):326-33.
117. Szatmari T, Lumniczky K, Desaknai S, Trajcevski S, Hidvegi EJ, Hamada H, et al. Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer science*. 2006;97(6):546-53.
118. Nowinski WL, Thaung TS, Chua BC, Yi SH, Ngai V, Yang Y, et al. Three-dimensional stereotactic atlas of the adult human skull correlated with the brain, cranial nerves, and intracranial vasculature. *Journal of neuroscience methods*. 2015;246:65-74.
119. Marigil M, Martinez-Velez N, Dominguez PD, Idoate MA, Xipell E, Patino-Garcia A, et al. Development of a DIPG Orthotopic Model in Mice Using an Implantable Guide-Screw System. *PloS one*. 2017;12(1):e0170501.
120. Schroeder KM, Hoeman CM, Becher OJ. Children are not just little adults: recent advances in understanding of diffuse intrinsic pontine glioma biology. *Pediatric research*. 2014;75(1-2):205-9.
121. Goodwin CR, Xu R, Iyer R, Sankey EW, Liu A, Abu-Bonsrah N, et al. Local delivery methods of therapeutic agents in the treatment of diffuse intrinsic brainstem gliomas. *Clinical neurology and neurosurgery*. 2016;142:120-7.

BIBLIOGRAFÍA

122. Becher OJ, Hambardzumyan D, Walker TR, Helmy K, Nazarian J, Albrecht S, et al. Preclinical evaluation of radiation and perfosine in a genetically and histologically accurate model of brainstem glioma. *Cancer research*. 2010;70(6):2548-57.
123. Misuraca KL, Hu G, Barton KL, Chung A, Becher OJ. A Novel Mouse Model of Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Initiated in Pax3-Expressing Cells. *Neoplasia* (New York, NY). 2016;18(1):60-70.