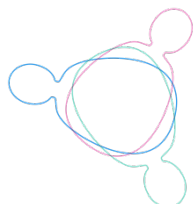


**INCLIVA | VLC**  
Instituto de Investigación Sanitaria

**Título: Espacio intercelular: Bioimagen microscópica**

**IP: NOGUERA SALVÁ ROSA**

**DATOS DEL INVESTIGADOR/A PRINCIPAL**

<b>APELLIDOS</b> NOGUERA SALVÀ	<b>NOMBRE</b> ROSA	
<b>DNI/NIE:</b> 19884196Y	<b>FECHA NACIMIENTO (DD/MM/AAAA):</b> 25/03/1959	<b>SEXO (V/M):</b> M
<b>TELEFONO/S:</b> 963983948	<b>ORCID:</b> 0000-0003-4546-7459	

**FORMACION ACADEMICA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL**

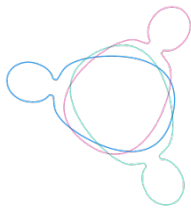
LICENCIATURA/INGENIERIA/GRADO	CENTRO	FECHA
Licenciada Medicina y Cirugía	Facultad de Medicina y Odontología Valencia	06/1982
DOCTORADO	CENTRO	FECHA
Doctora en Medicina	Facultad de Medicina y Odontología de Valencia	09/07/1990

**SITUACIÓN PROFESIONAL DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL**

<b>POSICION ACTUAL</b>	<b>FECHA INCORPORACION</b>
Catedrática de Universidad	31/05/2011
<b>ORGANISMO</b> Universidad de Valencia	
<b>CENTRO/FACULTAD/ESCUELA/INSTITUTO:</b>	
Facultad de Medicina y Odontología	
<b>DEPT./UNIDAD/SECC.:</b> Patología	
<b>CORREO/S ELECTRONICO/S:</b> moguera@uv.es	
<b>VINCULACIÓN LABORAL</b>	
<input checked="" type="radio"/> FUNCIONARIO/A	
<input type="radio"/> ESTATUTARIO/A	
<input type="radio"/> LABORAL FIJO O INDEFINIDO	
<input type="radio"/> LABORAL TEMPORAL	
<input type="radio"/> EMÉRITO	

**ACTIVIDADES ANTERIORES DE CARÁCTER CIENTÍFICO O PROFESIONAL**

AÑOS INICIO-FINAL	PUESTO	INSTITUCIÓN
01/01/1986-31/12/1987	Becaria Comité Hispan-USA	Lab Patología NCI/NIH Bethesda USA
01/01/1988-31/09/1991	Becaria FIS	Facultad Medicina/Universitat Valencia
01/10/1991-22/08/1996	Prof. Ayudante LRU	Facultad Medicina/Universitat Valencia
23/08/1996-30/05/2011	Prof. Titular de Universidad	Facultad Medicina/Universitat Valencia

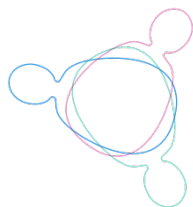


## RESUMEN DEL TRABAJO PROPUESTO

**Contexto del estado actual.** A pesar de que se han logrado mejoras notables en la supervivencia de niños y adolescentes, considerando toda la enfermedad neuroblástica como un único grupo, esto es engañoso para el amplio grupo de pacientes, aproximadamente el 50%, con neuroblastoma agresivo, debido al pronóstico extremadamente heterogéneo fundamentado en la edad, el estadio y las características biológicas. Así, investigar las relaciones estructura-función mecánica o biotensegridad a todos los niveles de organización del tejido tumoral, mediante el análisis digital microscópico de las biopsias, es un reto importante que sin duda mejorará la predicción pronóstica del neuroblastoma, facilitará el seguimiento de los efectos secundarios del tratamiento y, lo que es imprescindible, definirá dianas terapéuticas mecanotrasductoras útiles para los pacientes con neuroblastoma agresivo.

La tensión mecánica que existe en el tejido tumoral es recogida por la matriz extracelular, transmitida al interior de las células a través de integrinas y otros canales, distribuida a través de su sistema de tensegridad, el citoesqueleto, traducida en señales químicas y en estímulos mecánico y conducida hasta el núcleo. Para caracterizarla, se necesita realizar estudios morfométricos de todas estas estructuras presentes en la biopsia. No obstante, a pesar del desarrollo progresivo de técnicas novedosas de cuantificación aplicadas a la Patología digital, es escasa la traslación clínica y oncológica de los resultados de investigación sobre los elementos biotensérgicos tumorales, empleando el análisis digital microscópico.,

La evaluación diagnóstica del neuroblastoma requiere tejido tumoral para conocer todos los datos biológicos y poder asignar un grupo de riesgo y definir la estratificación posterior del tratamiento. La obtención de la biopsia del tejido es, pues, un requisito absoluto para determinar la clasificación histopatológica mediante la International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC), establecer el número de copias de *MYCN*, el índice de ADN y la presencia de anomalías cromosómicas segmentarias. Nuestro grupo, al ser centro de referencia nacional de estudios histopatológicos y genéticos desde 1992, ha almacenado y analizado gran cantidad de tejido tumoral. Caracterizar los sistemas tensérgicos tumorales, incluidos unos dentro de otros, mediante el estudio de imagen microscópica de los elementos que actúan como fuerzas opuestas, es un desafío que llevamos a cabo desde hace una década. Hemos analizado aproximadamente unos 400 tumores neuroblásticos utilizando técnicas de imagen, de forma que, mediante algoritmos de segmentación automática computarizada aplicadas a las imágenes histológicas, se han podido caracterizar elementos de la MEC (fibras de reticulina, fibras de colágeno y sustancia fundamental), así como la trama vascular y el infiltrado celular inmune y de células madre, para establecer las relaciones estructura-función mecánica de los mismos. Estos estudios, unidos a parámetros clínicos, histopatológicos y genéticos conocidos y almacenados en nuestra base de datos, nos han permitido proponer su incorporación para la mejora de la estratificación terapéutica y nos está permitiendo desarrollar patrones matemáticos que puedan ser utilizados para determinar nuevas dianas terapéuticas.

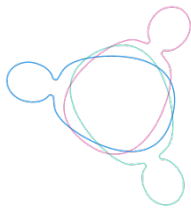


**El objetivo central de este proyecto** es la obtención e inclusión de datos de elementos tenségricos nucleares, para continuar con el análisis del sistema de biotensegridad MEC-citoplasma-núcleo de 160 casos de neuroblastoma elegidos por su grado de inestabilidad genética.

**La estrategia experimental** consistirá en diseñar algoritmos de segmentación automática computarizada aplicados a imágenes histológicas tumorales para la cuantificación y caracterización de la forma, tamaño y distribución de las alteraciones morfológicas de: 1) la membrana nuclear, que puede conllevar pleomorfismo de forma y tamaño nuclear, presencia de inclusiones intracitoplasmáticas, invaginaciones, pliegues, deformidad, presencia de convoluciones o de aneurismas, fragmentación y polilobulación nuclear, micronúcleos, así como diferencias en el tamaño del nucleolo y del grado de densidad cromatínica; 2) la elongación telomérica que puede comportar al establecimiento de gran heterogeneidad clonal con distintas longitudes teloméricas por núcleo; y 3) del espacio perinucleolar, que puede verse reflejado en un amplio pleomorfismo de tamaño y forma. La información obtenida de los 160 casos de neuroblastoma, junto a sus datos genómicos de asociación y datos clínicos del paciente, serán utilizados para ampliar y optimizar el modelo predictivo y apoyar la mecanoterapia en neuroblastoma.

**La oportunidad del presente estudio** por la complementariedad de los proyectos ya realizados y en marcha del grupo es muy apropiada y propicio para obtener un gran provecho y cumplir con los objetivos concretos.

**La relevancia biomédica/clínica** radica en la transferibilidad a la práctica clínica. Las técnicas innovadoras de diagnóstico tisular basadas en bioimagen suponen un nuevo enfoque para la mejora en la toma de decisiones pronósticas y detección de efectos secundarios terapéuticos así como para la determinación de nuevas dianas moleculares y el desarrollo de estrategias terapéuticas aplicables no sólo en neuroblastoma, sino en otros tipos tumorales.



## ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

### 1.- ¿Qué es la biotensegridad?

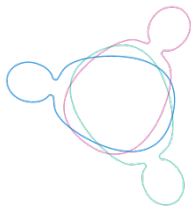
El término y concepto de tensegridad, del que surge el de biotensegridad, fue acuñado por los arquitectos Fuller y Snelson en la década de los 60 como concepto de integridad tensional. Una estructura tensegórica es referida como un conjunto de elementos de compresión suspendidos en una red de cables de tensión. Las estructuras de tensegridad son intrínsecamente autoestabilizadas, característica que les confiere equilibrio y flexibilidad, minimizando el daño provocado ante una fuerza y permitiendo el regreso a su forma original.

La tensegridad aplicada a sistemas biológicos, o biotensegridad, explica la relación estructura-función mecánica en todas las escalas del cuerpo humano, tratándose de una estructura construida enteramente por sistemas tensegóricos incluidos unos dentro de otros. Así, en el organismo, los elementos de compresión (por ejemplo, en el sistema locomotor, los huesos) flotan de una forma estable en una red tensora (las fascias, ligamentos y músculos). A nivel tisular, cada órgano está compuesto por células (elementos de tensión o tracción continua) que están conectadas sí, gracias a las integrinas que anclan el citoesqueleto celular a los componentes fibrosos, glicoproteínas y proteoglicanos de la MEC, que actúa como elemento discontinuo de compresión. La red molecular del citoesqueleto está constituida por microfilamentos de actina, microtúbulos de tubulina y filamentos intermedios, específicos de cada tipo celular. En el interior de la célula, los microtúbulos constituyen las estructuras discontinuas de compresión, mientras que los filamentos de actina, estrechamente asociados a los de miosina, constituyen las estructuras de tensión continua. De esta forma, la tensión mecánica generada por el movimiento músculo-esquelético se transmite por presión a los órganos internos, que recogen el estímulo en la MEC, siendo transferido el movimiento al interior de la célula a través de las integrinas, entre otros canales, que distribuye la fuerza tensional a través de su sistema de tensegridad, el citoesqueleto. Este traduce dichas fuerzas en señales químicas y en estímulos mecánicos, que son conducidos hasta el núcleo, que igualmente dispone de su propio sistema de tensegridad (como son las fuerzas de atracción y repulsión que se establecen como fuerzas continuas de tensión y la doble hélice de ADN así como las cadenas alfa y láminas beta de proteínas nucleares como fuerzas de compresión), activando la respuesta al estímulo recibido en forma de activación de genes y secreción de proteínas. El circuito descrito pone en marcha, a través de estímulos mecánicos o mecanotransducción, la proliferación, el metabolismo celular, la diferenciación o la apoptosis [1].

### 2.- Biotensegridad y neuroblastoma

En un órgano o tejido enfermo, incluido cualquier tejido neoplásico, también existen los elementos biotensegóricos, aunque su estudio y la traslación a la clínica oncológica para interceptar los cambios biotensegóricos, son escasos.

En los últimos años, la aparición de técnicas cuantitativas novedosas aplicadas a la imagen médica microscópica está conllevando la caracterización de los elementos tensegóricos en



cáncer. En NB ya se han desarrollado ciertos sistemas de clasificación automática histopatológica mediante técnicas morfométricas aplicadas a imagen microscópica [2, 3]. En proyectos previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación (FIS2010/00015 y FIS2014/01008) se han analizado 400 tumores neuroblásticos utilizando técnicas morfométricas (ver más abajo).

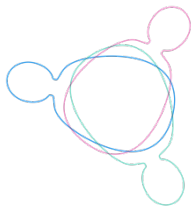
El NB es un tumor altamente heterogéneo que deriva de las células primitivas procedentes de la cresta neural, por lo que pueden desarrollarse a cualquier nivel del sistema nervioso simpático. Es el tumor sólido extracraneal más común en la infancia, suponiendo el 15% de las muertes por cáncer en niños, a pesar de que la supervivencia ha aumentado drásticamente en los últimos años. Puede remitir de forma espontánea o madurar sin necesidad de tratamiento quimioterápico, y de forma contraria puede presentar una alta capacidad invasiva y generar metástasis con baja respuesta a tratamientos citotóxicos agresivos.

El diagnóstico definitivo de NB se basa en la presencia de una serie de características histopatológicas del tejido tumoral (presencia de células tumorales de estirpe neuroblástica en diversos grados de diferenciación celular con un estroma rico o pobre), normalmente acompañado de una concentración elevada de catecolaminas en orina. Siguiendo el sistema de clasificación de la International Neuroblastoma Risk Group (INRG) [4], los pacientes se clasifican en distintos grupos basados en características clínicas (estadio y edad), histopatológicas y genéticas (estado del gen *MYCN*, de la región cromosómica 11q y del índice de ADN)

### **3.- Elementos biotensérgicos de la matriz extracelular en neuroblastoma**

La cuantificación y caracterización global del componente estromal y celular (caracterización histopatológica) y el grado de diferenciación neuroblástica, características que se utilizan como factores pronósticos independientes en la clasificación de la INRG, no se utilizan para definir la relación estructura-función mecánica o biotensegridad.

Nuestro grupo, a partir del estudio de elementos de matriz extracelular teñidos con técnicas histoquímicas (HQ) e inmunohistoquímicas (IHQ), ha llevado a cabo aplicaciones biotensérgicas. Mediante el análisis de imagen microscópica digitalizada, con algoritmos de segmentación automática computarizada en 23.100 bioimágenes histológicas almacenadas en el biobanco de imágenes DPUV-INCLIVA, junto con sus máscaras asociadas, unido a parámetros clínicos, histopatológicos y genéticos, se generó un modelo matemático para predecir, en tumores primarios y no primarios, el pronóstico del paciente [1]. Así, se describió que una matriz extracelular rígida pobre en glicosaminglicanos y en grandes haces de colágeno tipo I, y rica en redes de fibras de reticulina entrecruzadas, desordenadas e irregulares estaba asociada a mal pronóstico. Además, ciertas características morfológicas de las redes de fibras de reticulina podían ser empleadas para definir un subgrupo de pacientes con muy alto riesgo de mal pronóstico, dentro del subgrupo clasificado como de alto riesgo por la INRG [5-7]. Estos resultados remarcan el beneficio que aporta a la práctica clínica la combinación de marcadores

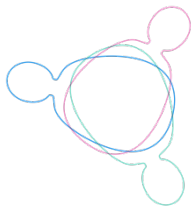


clínico-biológicos pronósticos con la nueva tecnología de imagen microscópica y genética computacional en esta amplia cohorte de pacientes.

#### **4.- Elementos biotensérgicos nucleares de los neuroblastos**

En cuanto al componente nuclear, las variaciones en el número de copias de genes y/o cromosomas determina la estrategia terapéutica en el NB, sin tener en cuenta su biotensegridad. La amplificación del oncogén *NMYC* es un factor pronóstico independiente asociado con la progresión tumoral y su estado, detectado obligatoriamente por FISH, es utilizado para la estratificación terapéutica desde hace más de dos décadas [8]. El estatus del cromosoma 11 se ha incorporado más recientemente en la INRG [9, 10]. Las técnicas pangenómicas están adquiriendo un papel diagnóstico central en la actualidad, dado que la presencia de una o más alteraciones cromosómicas segmentarias (SCA) típicas o frecuentes en NB (deleción de 1p, 3p, 4p, 11q y ganancia de 1q, 2p y 17q) se ha relacionado con la agresividad tumoral [11-13]. Basándose en estas observaciones, definir el perfil genómico tumoral se considera actualmente como una herramienta importante para modular la actuación terapéutica. La técnica de aSNP aplicada al diagnóstico en NB identifica los cambios en el número de copias y provee información sobre la pérdida de heterocigosidad, que se ha descrito en diversos cánceres [14], incluido el NB, como un posible mecanismo de inactivación de genes supresores de tumor [15]. Mediante las plataformas de Illumina (HumanCytoSNP-12 DNA Analysis BeadChip) y Affymetrix (CytoScan HD, OncoScan) hemos obtenido los perfiles pangenómicos de más de 400 tumores.

La aplicación de técnicas de secuenciación de nueva generación está proporcionando información útil para la delimitación de nuevos subgrupos moleculares, respecto a los genes *ALK*, *TERT*, *ATRX* y *TP53*. El gen *ALK* (2p23.2) se encuentra mutado (8-10%) y amplificado (2%) en NB esporádico siendo responsable de la mayoría de casos de NB familiar [16]. Las mutaciones se asocian con una enfermedad más agresiva y parecen tener un papel en la oncogénesis del NB [16, 17]. No obstante, se encuentra mutado tanto en el grupo de alto riesgo como en el de bajo riesgo, y en casos con y sin amplificación del *MYCN* y se han observado mutaciones emergentes en la recaída, por lo que se recomienda su evaluación en la enfermedad neuroblástica recurrente. Otro gen que se encuentra alterado en NB, en concreto en un 23% de los NB de estadios 3 y 4, es *TERT* (5p15.33) [18]. *TERT* codifica para la telomerasa transcriptasa inversa siendo un componente esencial del complejo enzimático de la telomerasa. Las células malignas mantienen la longitud de los telómeros mediante la actividad telomerasa o mediante el alargamiento alternativo de los telómeros (ALT) y por tanto no se activa la vía de senescencia o apoptosis dependiente de p53. ALT es un mecanismo independiente de telomerasa, asociado con la inactivación del gen *ATRX* (Xq21.1) en NB [19]. Ambas vías están activas de forma diferencial en los grupos de alto riesgo de NB [20-22]. De hecho, estudios recientes demuestran que mientras los mecanismos de mantenimiento de los telómeros pueden estar inactivos en los NB de bajo riesgo, la actividad de la telomerasa se asocia con reordenamientos de *TERT* en un grupo mayoritario de NB de alto riesgo. En un grupo minoritario de pacientes de alto riesgo sin alteraciones génicas en *TERT*, se ha descrito la actividad del mecanismo de ALT mayoritariamente causada por la inactivación del gen *ATRX*



[18]. Las alteraciones del gen remodelador de la cromatina, *ATRX*, y de su expresión proteica parecen definir un subtipo molecular de tumores en pacientes adolescentes o adultos con estadios avanzados, sin amplificación de *MYCN* en sus tumores y con enfermedad indolente pero que en último término experimentan progresión [19, 23-26]. De esta forma las alteraciones de los genes *TERT* y *ATRX* y la amplificación de *MYCN* son prácticamente excluyentes en los casos de NB de muy alto riesgo. La inactivación del gen supresor de tumor p53 (*TP53*, 17p13.1), es esencial en la proliferación de las células cancerosas. Se ha descrito en líneas celulares de NB que presentan ALT y pérdida de función de *ATRX* y en las que la pérdida de la función de p53 permite la recombinación homóloga propia de la vía de ALT [24, 27].

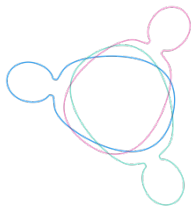
Estos cambios génicos y/o cromosómicos que reflejan la inestabilidad genética del NB agresivo, podrían tener un reflejo en la morfología nuclear como consecuencia de las alteraciones de su sistema tensérgico que podrían ser detectados con la tecnología digital. Estos cambios del sistema tensérgico nuclear, a su vez, estarían relacionados con los estímulos mecánicos y los cambios del sistema tensérgico citoplásmico y de la MEC. De hecho, recientemente se ha descrito la presencia de alteraciones morfológicas de la envoltura nuclear en tumores con inestabilidad cromosómica, como el pleomorfismo de tamaño y forma, deformidad nuclear, presencia de hendiduras o pliegues, de inclusiones o de micronúcleos [28]. En NB aparecen fenómenos de alta inestabilidad cromosómica, como la presencia de múltiples amplificaciones genéticas a lo largo de todo el genoma o del mecanismo de cromotripsis, definido por secuenciación genómica y análisis bioinformático como la presencia de decenas a cientos de reordenamientos genómicos adquiridos en un suceso catastrófico, y que está presente en el 18% de NBs de estadio avanzado [26, 29]. De la misma forma, la alteración en la longitud telomérica produce inestabilidad genómica debido a la acumulación de cambios genéticos como son las deleciones, traslocaciones desequilibradas y amplificaciones en células neoplásicas, y está asociado al pronóstico clínico. En NB son frecuentes los fenómenos de alta inestabilidad cromosómica asociados a la alteración en la longitud telomérica, y se ha demostrado su relación con la supervivencia. En concreto, el aumento en el número de repeticiones teloméricas a través de la vía ALT, tal y como se ha descrito más arriba) está asociado a mal pronóstico [22].

Así mismo, otra medida a nivel nuclear de la inestabilidad genómica es la detección del espacio perinucleolar (PNC), que recientemente se ha asociado a malignidad. Su detección en cáncer se correlaciona con la capacidad metastásica, por lo que se ha propuesto como potencial marcador tumoral en varios estudios [30-32].

##### **5.- Otros elementos biotensérgicos en neuroblastoma.**

En el nicho neuroblástico, además de los elementos de la MEC y neuroblastos, aparecen otros elementos que intervienen en el microambiente tumoral y que forman parte del sistema tensérgico del NB. En este sentido, nuestro grupo, mediante el análisis de imagen de tejido tumoral digitalizada y a través de algoritmos de segmentación automática, ha llevado a cabo el análisis de elementos de la trama vascular (CD31 y D2-40), biomarcadores de células del sistema inmune (CD4, CD8, CD20, CD45, CD11b, CD11c, CD7, CD68 y CD163) y biomarcadores de células





madre (OCT4, SOX2, CD133, CD105, S100A6). Precisamente, hemos publicado, en relación a la vascularización sanguínea, que una mayor presencia de vasos sinusoides (relacionados con una mayor capacidad invasiva) y una menor presencia de vasos capilares (relacionados con menor oxigenación tisular) implican peor pronóstico en el NB [33]. Así mismo, ciertos indicadores morfológicos de la trama vascular sanguínea permiten describir un subgrupo de pacientes de muy alto riesgo de progresión de la enfermedad [5]. En breve haremos pública la investigación sobre la biotensegridad de la trama vascular linfática con la nueva tecnología de imagen microscópica y genética computacional y la implicación de su estudio como diana terapéutica (manuscrito en preparación). Los estudios sobre el papel de las células del sistema inmune y células madre que infiltran el NB en la biotensegridad del NB están siendo llevados adelante en el contexto de dos tesis doctorales.

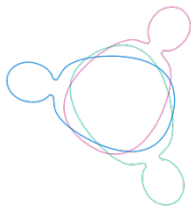
## **6.- Modelización matemática en neuroblastoma**

Categorizar un sistema biológico usando conceptos y lenguaje matemático, conteniendo distintos tipos de variables, se emplea cada vez más en oncología para entender y predecir el crecimiento tumoral, así como para anticipar los efectos de terapias dirigidas.

El modelo matemático basado en el organismo completo implica la correlación de datos clínicos del paciente, de las células tumorales y estromales y de la MEC. En estos estudios las células se entienden como sistemas moleculares auto-organizados y basados en la información que tienen y adquieren decisiones que regulan sus funciones internas y sus interacciones con el medioambiente [34].

Estos modelos tienen en cuenta dos niveles de variabilidad: la interindividual y la intra-individual, y proporcionan una respuesta media siempre y cuando exista una base de datos que contenga un gran número de casos similares al caso problema. Incluir toda la información procedente de la imagen morfológica microscópica (dimensiones, volumen, densidad, intensidad, e interconexión entre otras variables tisulares celulares y no celulares) y la procedente de estudios de genética computacional, puede usarse en los modelos matemáticos, para su enriquecimiento. Existen numerosas técnicas de análisis multivariante aplicadas a la clasificación de tumores [35-37], que alcanzan una importante sensibilidad y especificidad con tamaños muestrales histológicos suficientemente grandes.

En NB, existen diversos modelos matemáticos de interacciones de proteínas, de rutas bioquímicas y de funciones celulares [38, 39]. En el modelo matemático previamente referido (FIS2010/0015 y FIS2014/01008) toda una batería de nuevos marcadores definidos por imagen, junto con los parámetros clínicos, histopatológicos y genéticos permitió predecir, en tumores primarios y no primarios, el pronóstico del paciente [1]. Se remarca, pues, el beneficio que podría aportar a la práctica clínica la combinación de marcadores clínico-biológicos pronósticos con la nueva tecnología de imagen microscópica y genética computacional de una amplia cohorte de pacientes.

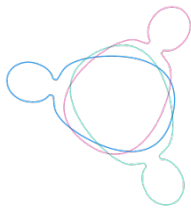


## HIPÓTESIS

Con los datos derivados del análisis de bioimagen microscópica de la matriz y envoltura nuclear obtendremos un modelo predictivo que aportará información clave para la aplicación de la mecanoterapia molecular en neuroblastoma, poniendo de manifiesto los elementos relevantes de las interacciones físicas de las células con la MEC.

Esta hipótesis se compone de las siguientes ideas:

1. Procesando numerosos datos genéticos y morfométricos nucleares, podremos definir patrones nucleares asociados a diferentes perfiles de inestabilidad genómica.
2. Estableciendo clasificaciones automáticas de las imágenes microscópicas mediante patrones algorítmicos relacionando morfologías, texturas, ubicación y conexiones entre células tumorales con distinto grado de inestabilidad genética y los elementos celulares y acelulares de su estroma, pretendemos determinar los cambios estructurales de las matrices nucleares, citoplásmicas e intercelulares y las modulaciones derivadas de sus interacciones.
3. El modelo predictivo que se espera formular usando conjuntamente los datos matemáticos procedentes del análisis de las imágenes microscópicas, los genómicos de asociación y los datos clínicos del paciente, se relacionará con el estrés físico tisular de los elementos constituyentes, con la intención de encontrar nuevas moléculas dianas de mecanoterapia.



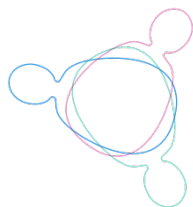
## OBJETIVOS

### Objetivos generales:

1. Cuantificación y caracterización de las alteraciones nucleares en las células neuroblásticas malignas, utilizando imágenes histológicas digitalizadas.
2. Asociación de los parámetros y variables derivados del análisis de bioimagen microscópica nuclear con los datos genéticos albergados en la base de datos NeuPat.
3. Modelización predictiva matemática de los datos morfométricos y genéticos tumorales y los datos clínicos de los pacientes. Los modelos obtenidos se compararán en base a su capacidad predictiva y su habilidad para identificar dianas moleculares mecanotransductoras.
4. Realización de estudios de simulación en cohortes de NB con diversa inestabilidad genómica, empleando el modelo predictivo obtenido.
5. Constatar el importante papel de la firmeza de la matriz extracelular en relación con el patrón de agresividad nuclear de las células tumorales.

### Objetivos concretos:

- Selección de casos de interés por grado de inestabilidad genómica.
- Construcción de TMAs.  
Tinción de HE y Feulgen en cortes completos y TMAs.
- Realización técnica de FISH para detección de telómeros en cortes completos y TMAs.
- Realización de inmunohistoquímica para la detección del PNC en cortes completos y TMAs.
- Valoración subjetiva de cortes completos de todos los elementos.
- Diseño de algoritmos de análisis de imagen específicos para cuantificar objetivamente los elementos de interés.
- Caracterización automática de los elementos estudiados en TMAs.
- Realización de estudios de asociación con características clínicas y biológicas de los pacientes y con otros elementos celulares y de la MEC del neuroblastoma.
- Definición de patrones de agresividad nuclear.
- Diseñar medicamentos que inhiban las fuerzas mecánicas que facilita la interacción entre los receptores y medios de unión celulares y que generan la inestabilidad genética evidenciada con patrones de agresividad nuclear.



## **METODOLOGÍA**

Para el estudio de la biotensegridad tumoral en neuroblastoma, seleccionaremos 160 muestras tumorales con diversa inestabilidad genómica procedentes del biobanco DPUV-INCLIVA, que se incluirán en micromatrices de tejido (TMAs) seleccionando 2 cilindros tisulares de 1 milímetro de diámetro por tumor, así como de al menos un tejido no patológico como control en cada TMA. Es por tanto una investigación sobre tejidos tumorales que no requiere nuevo material ya que se utilizarán tejidos tumorales parafinados y/o congelados de la colección asistencial de NB (material restante tras el diagnóstico de los factores biológicos de estratificación de INRG, solicitado por los oncopediatras) con consentimientos informados por parte de las familias o tutores legales en los hospitales de origen. De las 160 muestras especialmente seleccionadas, 40 casos muy inusuales serán los de alta inestabilidad genética (presencia de cromotripsis y/o más de 3 amplificaciones génicas) y 120 casos serán los que presenten menor inestabilidad (media y baja: perfiles pangenómicos con ganancias y/o pérdidas segmentarias cromosómicas - SCA- y muy baja: perfiles pangenómicos con ganancias y/o pérdidas completas cromosómicas - NCA-), determinada por aSNP.

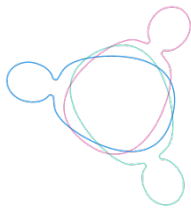
### **-ANÁLISIS DE LA ENVOLTURA NUCLEAR**

Para la caracterización de las alteraciones morfológicas nucleares asociadas a inestabilidad genómica, se llevará a cabo un primer análisis subjetivo al microscopio a partir de secciones completas de tinciones de Hematoxilina-Eosina y Feulgen, tras lo que se diseñarán algoritmos de cuantificación utilizando imágenes microscópicas digitalizadas mediante el escáner Panoramic Midi o Aperio ScanScope XT.

Las características morfológicas de la envoltura nuclear a medir serán: pleomorfismo de forma y tamaño, presencia de inclusiones intracitoplasmáticas, invaginaciones, pliegues, deformidad, presencia de convoluciones o de aneurismas, fragmentación y polilobulación nuclear, así como también se analizará el tamaño del nucleolo y el grado de densidad cromatínica. Se tendrán en cuenta, para cada una de las características nucleares, aquellos aspectos susceptibles de ser cuantificados, estableciendo los parámetros que definan a cada variable. Para ello, se hará una búsqueda bibliográfica previa de aquellas alteraciones nucleares que puedan ser características de ciertos tipos tumorales, para posteriormente analizarlas en muestras tumorales almacenadas en el biobanco DPUV-INCLIVA.

### **-ANÁLISIS DE LOS TELÓMEROS Y DEL ESPACIO PERINUCLEOLAR**

De cada una de las muestras teñidas con Hematoxilina-Eosina y Feulgen, en cortes completos y en TMAs, se llevará a cabo la técnica de FISH cuantitativa (Q-FISH) utilizando una sonda telomérica (DAKO, Glostrup, Dinamarca). El análisis subjetivo se llevará a cabo 24 horas después de la realización de la técnica, según recomendaciones previas [40]. Para ello, se tendrán en cuenta el número de señales por núcleo así como su tamaño e intensidad, de forma que se hará una primera selección de aquellos casos que presenten una alta heterogeneidad en tamaño e



intensidad intracelular, asociados a una alta inestabilidad genómica [22]. En aquellos casos que presenten células con zonas con una alta acumulación de señales, indistinguibles entre sí al microscopio de fluorescencia, al objetivo de 100X, se valorará el análisis conjunto con sondas para el reconocimiento de cuerpos nucleares de leucemia promielocítica (PML *bodies*), que suelen estar asociados a estas señales teloméricas y que son características del ALT [41].

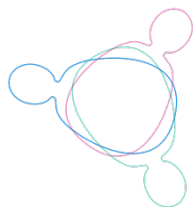
- Por otra parte, se llevará a cabo el estudio del PNC mediante el análisis inmunohistoquímico, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-SH54 (Merck Millipore, Molsheim, France), proteína presente en el PNC. Se hará un primer análisis subjetivo para determinar aquellas muestras que presenten positividad. Se calculará la prevalencia, definida como el porcentaje de células con al menos un PNC, este porcentaje podrá estar asociado a la agresividad tumoral. Para la cuantificación objetiva de esta variable se digitalizarán las TMAs y se diseñará un algoritmo matemático para la cuantificación de la prevalencia de PNC en cada muestra tumoral, definiéndose los parámetros de tamaño e intensidad.

#### **-ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN**

Los datos matemáticos derivados de la cuantificación de las variables nucleares serán asociados a los datos genéticos albergados en la base de datos NeuPat, obtenidos en la rutina diagnóstica del laboratorio desde 1996, tanto de FISH, array CGH, MLPA, aSNP y citometría estática para analizar el contenido de ADN. En concreto el análisis pangenómico mediante distintas plataformas de aSNP (Illumina y Affymetrix) ha permitido la obtención del perfil cromosómico completo de las muestras, a partir del cual se han podido establecer los diferentes niveles de inestabilidad genómica.

Se seleccionarán, de las imágenes microscópicas almacenadas de los biomarcadores de redes críticas morfológicas celulares y de MEC de los 400 NB analizados previamente, las correspondientes a los 160 NB analizados. De esta forma, los datos genéticos se asociarán a los datos matemáticos de componentes de la MEC, compartimento vascular e infiltrado de células inmunes y células madre. Se completarán los casos que por razones técnicas hayan sido excluidos de los análisis previos. Se llevará a cabo una ampliación en el diseño de algoritmos para realizar la colocalización y se aplicará la Teoría de Grafos a dichas imágenes para el análisis topológico.

Para la asociación de datos y la construcción de modelos predictivos contaremos con la experiencia, material y datos obtenidos de dos proyectos en ejecución (FIS2014/01008 "Estudio de la Biotensegridad en los tumores neuroblásticos" IP: R. Noguera y CIBERONC CB16/12/00484 Identification and validation of new (targeted and immune) therapies, preclinical models and markers of therapeutic response in pediatric solid (development) tumours IP: R. Noguera) así como de un proyecto ya finalizado (FIS2010/0015 "Modelo *in silico* de la hiperestructura de los tumores neuroblásticos. Integración génica, microscópica y clínica" IP: R. Noguera), que han permitido la creación de un biobanco de

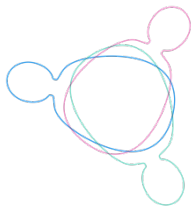


imágenes microscópicas de NB con más de 23.000 imágenes y una amplia base de datos genéticos tumorales asociados a datos clínico-biológicos de los NB.

Respecto a los estudios matemáticos necesarios para la obtención del modelo predictivo, trabajaremos con un elevado número de variables. En este contexto, es necesario incorporar técnicas de selección de variables. En este trabajo, al igual que en trabajos anteriores, se explorarán dos aproximaciones, en primer lugar, una estrategia en dos pasos, que implica selección de variables en un contexto univariante, evaluando la asociación de cada variable predictiva con la respuesta de manera independiente, y la posterior incorporación de las variables seleccionadas para ajustar un modelo de regresión logística multivariante. En segundo lugar, aplicamos un método de regresión penalizada. Los modelos obtenidos se compararán en base a su capacidad predictiva y su habilidad para identificar variables causales. Finalmente, una vez establecido el modelo predictivo realizaremos estudios de simulación en diferentes cohortes de NB con diversa inestabilidad genómica.

#### **ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Se realizarán todos los estudios previamente mencionados de la envoltura y la matriz nuclear con material tumoral procedente de inoculación ortotópica (en glándula suprarrenal) de líneas celulares de NB en ratones Rag inmunodeficientes. Este material procederá del proyecto de la Función de la Asociación Española contra el Cáncer (Cáncer Infantil 2015 IP: R. Noguera).



## PLANIFICACIÓN TEMPORAL

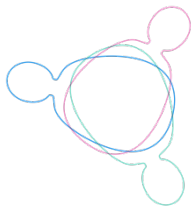
El plan de trabajo aquí presentado está ajustado a dos anualidades por solicitud expresa de la Fundación Neuroblastoma. La consecución de los objetivos es segura con la planificación del trabajo en cuatro anualidades.

### Plan de trabajo primera anualidad

1. Caracterización y cuantificación al microscopio óptico (análisis subjetivos) de las alteraciones de la envoltura nuclear presentes en las células malignas de tumores neuroblásticos en cortes completos.
2. Diseño de TMAs de los 160 casos de NB.
3. Caracterización y cuantificación al microscopio fluorescente (análisis subjetivos) de las alteraciones de la matriz nuclear relacionadas con la elongación de telómeros presentes en las células malignas de tumores neuroblásticos en TMAs.
4. Análisis de las proteínas de agresividad tumoral PTB del compartimento perinucleolar (PNC) al microscopio óptico (análisis subjetivos) presentes en las células malignas de tumores neuroblásticos en TMAs.
5. Caracterización y cuantificación en imágenes digitales (análisis objetivo) de las alteraciones de la envoltura nuclear en cortes completos y en TMAs.
6. Caracterización y cuantificación en imágenes digitales (análisis objetivo) obtenidas con el microscopio fluorescente de las alteraciones de la matriz nuclear relacionadas con la elongación de telómeros en TMAs.
7. Caracterización y cuantificación en imágenes digitales (análisis objetivo) de las alteraciones de la matriz nuclear relacionadas con proteínas de agresividad tumoral PTB del compartimento perinucleolar (PNC) en TMAs.

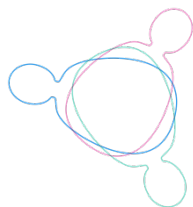
### Plan de trabajo segunda anualidad

1. Validación subjetiva de los hallazgos en TMAs de ALT y PNC en cortes completos.
2. Cribado de imágenes microscópicas almacenadas de los biomarcadores de redes críticas morfológicas celulares y de MEC de los 400 NB analizados previamente, y selección de las correspondientes a los 160 NB. Los datos genéticos se asociarán a los datos matemáticos de los componentes de la MEC, compartimento vascular e infiltrado de células inmunes y células madre.
3. Combinaciones de imágenes. Diseño y aplicación de software de colocalización según patrones nucleares y de la MEC aplicándose la Teoría de Grafos a dichas imágenes.



4. Asociación de los parámetros y variables derivadas del análisis de bioimagen microscópica nuclear a los datos genéticos albergados en la base de datos NeuPat y ArrayMap, de forma que los datos nucleares queden vinculados a los datos genéticos derivados del análisis por FISH, aCGH, MLPA, aSNP e índice de ADN por citometría estática.
5. Creación de un modelo matemático predictivo a partir de los datos morfométricos de la MEC, sistema vascular, de células madre, células del sistema inmune y alteraciones nucleares, junto a los datos genómicos de asociación y los datos clínicos de los pacientes. Los modelos obtenidos se compararán en base a su capacidad predictiva y su habilidad para identificar dianas terapéuticas mecanotransductoras.
6. Estudios de simulación en cohortes de neuroblastoma con diversa inestabilidad genómica, empleando el modelo predictivo obtenido.



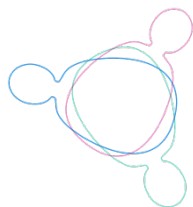


### EXPERIENCIA DEL EQUIPO

El grupo de investigación traslacional en tumores sólidos pediátricos del DP-UV/INCLIVA se consolidó hace 25 años y es el Centro Nacional de Referencia de Estudios de NB cuyos esfuerzos están dedicados, de forma muy activa, a la investigación traslacional en histopatología y genética. En relación con el diagnóstico e investigación colaborativa nacional de biomarcadores diagnósticos y pronósticos en NB y otros tumores sólidos pediátricos, nuestro grupo ha establecido unas fuertes relaciones de colaboración con la Sociedad Española de Oncología Pediátrica (SEHOP), desde 1992. En un primer momento, se proporcionaron los resultados de la evaluación histopatológica siguiendo la clasificación de Shimada. Más tarde, incorporamos factores pronósticos genéticos como el estado del oncogén MYCN y el de los brazos cromosómicos 1p, 11q y 17q, primero mediante la técnica de FISH, más tarde por métodos semigenómicos y pangenómicos y, actualmente, mediante aSNP de alta resolución. Paralelamente, en 2003, nuestro grupo se incorporó a la primera red española de Investigación sobre el Cáncer (RTIC-G03), apoyada por el ISCIII (Madrid), que se prolongó durante las redes sucesivas (RD06/0020 y RD012/0036). Actualmente, formamos parte del CIBERONC, Programa: "Tissue biomarkers, oncoimmunology and lower prevalence tumors" (Grupo CB16/12/00484 IP: R Noguera).

Respecto al enfoque propuesto en este proyecto, que pretende identificar cambios morfológicos y genéticos relacionados con la física, el grupo posee experiencia en:

**Patología digital / análisis de imagen microscópica.** La experiencia del grupo se basa en el estudio, durante los últimos 8 años, de diversos elementos implicados en la tensesidad del tumor, incluyendo elementos de andamiaje fibroso, vascularización sanguínea y linfática y sustancia fundamental de la MEC, en aproximadamente 500 tumores neuroblásticos. El grupo mantiene colaboraciones con el grupo de la Dra. Gloria Bueno (VISILAB, Grupo de Visión y Sistemas Inteligentes, Universidad de Castilla La Mancha), con el Dr. Luis Alfaro del centro de oftalmología médica, FOM (FISABIO, Valencia), con el Prof. Luis María Escudero (grupo IBIS, Universidad de Sevilla), y con Marcial García-Rojo (Hospital de Jerez de la Frontera), expertos, todos ellos en análisis de imagen. Para el análisis de esta cohorte de casos, se han desarrollado, además, algoritmos que permiten el análisis de la implicación de las células de la respuesta inmune y células madre tumorales, con la colaboración del Dr. Tomás Álvaro (Dpto. Anatomía Patológica, Hospital Verge de la Cinta, Tortosa) y del Dr. Isidro Machado (Instituto Valenciano de Oncología), expertos en inmunopatología. Parte de los resultados están comprendidos en dos tesis doctorales (una ya defendida en 2015 por la Dra. Irene Tadeo y otra que se encuentra en su última fase de preparación para ser defendida por el doctorando Víctor Zúñiga) y han dado lugar a diversas publicaciones científicas.



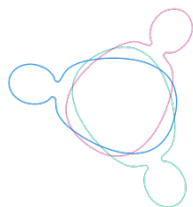
**Caracterización genética de subgrupos de tumores neuroblásticos.** La interdisciplinariedad del equipo ha permitido la detección y caracterización genética, tanto concreta como general, de ciertos subtipos de NB y de otros tumores pediátricos inusuales que poseen una baja frecuencia y/o presentan genotipos/fenotipos atípicos. Por ejemplo, el grupo ha estudiado la presencia simultánea de MNA y la delección del brazo largo del cromosoma 11; el estado del gen *ATRX* y su expresión IHQ; el análisis de los perfiles pangenómicos en pacientes adolescentes y adultos; el estudio comparativo de las alteraciones genéticas presentes en tumores con amplificación heterogénea del gen *MYCN*; el conjunto de tumores neuroblásticos con gran inestabilidad genética; o la presencia de mutaciones y la expresión IHQ del gen *ALK*. Todos estos trabajos han resultado en varias publicaciones, contribuciones a reuniones internacionales y la realización de diversas tesis doctorales (Octavio Burgués, Carmen Mejías, Marta Piqueras y Ana Berbegall). De forma prospectiva se realizan todos estos análisis como parte de estudios europeos, que entre otras acciones persiguen mejorar la estratificación terapéutica en base a la genética tumoral al diagnóstico.

**Biopsia líquida.** El equipo tiene puesta a punto la técnica de biopsia líquida centrada en la caracterización genética del ADN tumoral circulante en muestras de plasma de pacientes afectos de NB. En este sentido, el equipo está centrado en la utilidad de la biopsia líquida como herramienta en la oncología pediátrica dentro del consorcio CIBERONC. El presente equipo colabora con el grupo de los profesores F. Speleman y J. Vandesompele en la obtención de firmas de miRNA desde suero de pacientes españoles con NB.

**Experimentación *in vitro* e *in vivo*.** El equipo trabaja con xenotranplantes de tumores neuroblásticos humanos en ratones inmunodeficientes y ratones deficientes para ciertos elementos de la MEC susceptibles de ser dianas terapéuticas. Realizamos colaboraciones relacionadas con análisis genéticos de biopsias tumorales sólidas, así como la caracterización de los elementos de la MEC, con los métodos de Patología digital basada en análisis de imagen microscópica, con el grupo de Sven Pahlman y de Daniel Bexel (Lund, Suecia).

**Manejo, gestión y diseño de base de datos y bancos de muestras.** El grupo tiene experiencia en el tratamiento de datos clínico-biológicos, materiales tumorales y derivados, procedente de pacientes españoles afectos de NB. Estos vienen siendo custodiados desde 1992 y adecuadamente almacenados en biobancos diversos y en una base de datos diseñada para tal fin, Neupat.

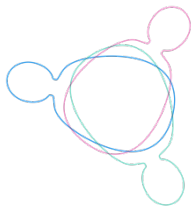
**Participación como miembros de los subcomités de Estudios de Patología y Estudios de Biología de la Sociedad Europea de Oncología Pediátrica desde 1996.** Elaboración y estandarización de la nomenclatura diagnóstica adaptada a las nuevas necesidades y avances de las nuevas tecnologías. Contribución en relación al desarrollo y aplicación de nuevas terapias personalizadas en el contexto internacional del grupo Europeo.



## Medios disponibles

Como Centro de referencia de estudios histopatológicos y genéticos desde 1992 disponemos de:

- Extenso banco de muestras de tejidos tumorales congeladas y parafinadas.
- Amplio banco de material derivado de las muestras de tejido tumoral: cultivos celulares, ADN yARN.
- Gran banco de imágenes microscópicas de tumores infantiles con formatos aptos para análisis digital.
- Instrumentación para el procesado de muestras tisulares incluido para la construcción de TMAs.
- Fotomicroscopios ópticos y de fluorescencia.
- Licencia de software de análisis de imagen Image Pro-plus v. 6. y de los visores ImageScope de Aperio y Panoramic Viewer de 3D Histech.
- Programa de análisis de imagen de acceso gratuito, TFL-Telo y Telometer (ImageJ).
- Programa de análisis estadístico SPSS v. 22.
- Acceso a varios digitalizadores de preparaciones.
- Experiencia y metodología desarrollada en proyectos previos.
- Personal especializado.



## Resultados esperables

Basándonos en el conocimiento de que los fenómenos de inestabilidad genómica en cáncer pueden verse reflejados en cambios en la morfología nuclear, y que estas alteraciones pueden observarse al microscopio, aunque en ocasiones pasan desapercibidas, esperamos:

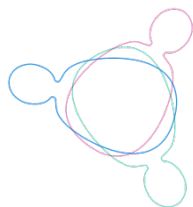
1.-Detectar, mediante la observación al microscopio óptico de secciones completas teñidas por técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, alteraciones de la envoltura nuclear asociadas a los distintos grados de inestabilidad genómica que han sido descritas previamente en otros tipos tumorales. Para conseguir caracterizarlas subjetivamente y diseñar algoritmos de cuantificación automática vamos a utilizar como grupo diana 40 muestras que representan uno de los fenómenos más inusuales de alta inestabilidad genómica en neuroblastoma, la presencia de cromotripsis o de varias amplificaciones génicas. En las muestras que presenten estos fenómenos esperamos observar un gran número de micronúcleos, un alto grado de pleomorfismo de forma y tamaño, así como una presencia notable de inclusiones intracitoplasmáticas, invaginaciones, pliegues, deformidad, presencia de convoluciones o de aneurismas, fragmentación y polilobulación nuclear, así como también agrandamiento del nucleolo y una distribución heterogénea y anómala de la cromatina condensada. Este hecho facilitará la detección de la inestabilidad genética asociada a las alteraciones de la envoltura nuclear en otras muestras tumorales cuya presencia sea menos evidente o únicamente esté presente en un pequeño porcentaje celular.

2. Evidenciar la alta heterogeneidad tisular y celular respecto a la elongación telomérica, tras utilizar la técnica de FISH con la sonda adecuada y analizar las muestras al microscopio de fluorescencia. En el NB está descrita la presencia de ALT y esperamos encontrar, sobre todo en aquellas muestras con alta inestabilidad genómica, una heterogeneidad intra-tumoral de la longitud telomérica evidente empleando métodos de análisis digital que nos permita caracterizar y conocer la importancia de los distintos tamaños e intensidades de las señales teloméricas.

3. Proponer como factor de mal pronóstico una alta prevalencia de los espacios perinucleares (PNC) en aquellas muestras con alta inestabilidad genómica y asociadas a una gran agresividad, tal y como se ha establecido en otros tipos tumorales. Buscar nuevas dianas terapéuticas en las proteínas de agresividad tumoral PTB del compartimento perinucleolar.

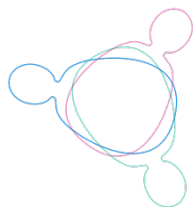
4.-Generar, una vez obtenidos los datos matemáticos derivados de la cuantificación automática, patrones nucleares de agresividad mediante la asociación a los datos genómicos, de otras estructuras tisulares y características clínicas de los pacientes. Los resultados a corto plazo serán la clasificación de los tumores de los niños diagnosticados en España en función del análisis mediante imagen microscópica del sistema de biotensegridad MEC-citoplasma-núcleo.

5. Ser capaces, mediante la digitalización de las imágenes microscópicas y la generación de algoritmos matemáticos, de cuantificar y caracterizar la forma, el tamaño y la topología de las diferentes alteraciones nucleares de forma automática y de adecuada validación para obtener como resultados a medio plazo dianas terapéuticas basadas en el comportamiento mecánico y que actúen sobre las fuerzas físicas que intervienen en la matriz extracelular.



**INCLIVA | VLC**  
Instituto de Investigación Sanitaria

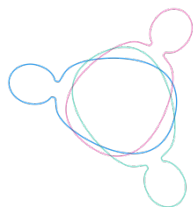
Concluimos que este proyecto tiene un alto potencial en cuanto a la traslación clínica de sus resultados. La contribución al avance del conocimiento que se espera realizar a lo largo de este proyecto de investigación es la caracterización de la biotensegridad que pueda servir como factor pronóstico, junto a los establecidos hasta ahora en la estratificación del neuroblastoma. Las variables de los patrones que se obtengan servirán como dianas moleculares para la generación de futuras estrategias terapéuticas.



## **Razones e interés científico médico del tema de investigación propuesto**

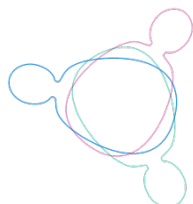
El interés de la actividad científica que va a desarrollarse en este proyecto se basa principalmente en su transferibilidad a la práctica clínica, ya que previsiblemente va a permitir descubrir nuevas dianas moleculares que permitirán el desarrollo futuro de nuevas estrategias terapéuticas. En concreto, el análisis de los cambios físicos de la MEC y matriz celular detectados por técnicas histomorfométricas cuantitativas y topográficas unidos a la heterogeneidad genética y clínica serán utilizados para determinar los mecanosensores diana a utilizar en mecanoterapia molecular aplicable al NB agresivo. Las células neoplásicas sienten y responden a los cambios de la matriz extracelular constituyendo un sistema dinámico tensegrico que puede ser manipulado por intervenciones mecanoterapéuticas. No solo juega un papel importante la firmeza de las matrices extracelulares tumorales sino también la firmeza de las propias células (nuclear y citoplásmica) y su biotensegridad. Por otro lado, las técnicas innovadoras de imagen microscópica, que permitirán para determinar dianas terapéuticas podrán ser extrapoladas a todo tipo de muestras tumorales primarias y metastásicas.

Otro punto clave del proyecto es la innovación en procedimientos diagnósticos, ya que permitirá la extracción de información paramétrica característica tisular que podrá ser utilizada para la toma de decisiones diagnósticas y mejoras de la guía predictiva en los niños con neuroblastoma de alto riesgo. Se enmarca en la prioridad temática del uso de las tecnologías "ómicas" y la imagen médica del Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica e Innovación. Para abordar el objetivo de transferencia contamos con financiación, experiencia, material y resultados preliminares.



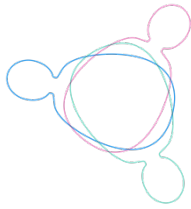
## Bibliografía

1. Tadeo, I., et al., *Biotensegrity of the extracellular matrix: physiology, dynamic mechanical balance, and implications in oncology and mechanotherapy*. *Front Oncol*, 2014. **4**: p. 39.
2. Shimada, H., et al., *The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system)*. *Cancer*, 1999. **86**(2): p. 364-72.
3. Shimada, H., et al., *Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee*. *Cancer*, 1999. **86**(2): p. 349-63.
4. Ambros, P.F., et al., *International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee*. *Br J Cancer*, 2009. **100**(9): p. 1471-82.
5. Tadeo, I., et al., *Extracellular matrix composition defines an ultra-high-risk group of neuroblastoma within the high-risk patient cohort*. *Br J Cancer*, 2016. **115**(4): p. 480-9.
6. Tadeo, I., et al., *A stiff extracellular matrix is associated with malignancy in peripheral neuroblastic tumors*. *Pediatr Blood Cancer*, 2017.
7. Tadeo, I., et al., *Quantitative modeling of clinical, cellular, and extracellular matrix variables suggest prognostic indicators in cancer: a model in neuroblastoma*. *Pediatr Res*, 2014. **75**(2): p. 302-14.
8. Brodeur, G.M., *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(3): p. 203-16.
9. Cohn, S.L., et al., *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(2): p. 289-97.
10. Caren, H., et al., *High-risk neuroblastoma tumors with 11q-deletion display a poor prognostic, chromosome instability phenotype with later onset*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(9): p. 4323-8.
11. Coco, S., et al., *Age-dependent accumulation of genomic aberrations and deregulation of cell cycle and telomerase genes in metastatic neuroblastoma*. *Int J Cancer*, 2012. **131**(7): p. 1591-600.
12. Schleiermacher, G., et al., *Accumulation of segmental alterations determines progression in neuroblastoma*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(19): p. 3122-30.
13. Janoueix-Lerosey, I., et al., *Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(7): p. 1026-33.
14. Tuna, M., S. Knuutila, and G.B. Mills, *Uniparental disomy in cancer*. *Trends Mol Med*, 2009. **15**(3): p. 120-8.
15. Caren, H., et al., *High-resolution array copy number analyses for detection of deletion, gain, amplification and copy-neutral LOH in primary neuroblastoma tumors: four cases of homozygous deletions of the CDKN2A gene*. *BMC Genomics*, 2008. **9**: p. 353.
16. Mosse, Y.P., et al., *Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene*. *Nature*, 2008. **455**(7215): p. 930-5.
17. Chen, Y., et al., *Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma*. *Nature*, 2008. **455**(7215): p. 971-4.
18. Valentijn, L.J., et al., *TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors*. *Nat Genet*, 2015. **47**(12): p. 1411-4.

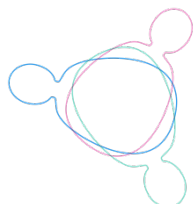


19. Cheung, N.K., et al., *Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma*. JAMA, 2012. **307**(10): p. 1062-71.
20. Heaphy, C.M., et al., *Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations*. Science, 2011. **333**(6041): p. 425.
21. Hertwig, F., M. Peifer, and M. Fischer, *Telomere maintenance is pivotal for high-risk neuroblastoma*. Cell Cycle, 2016. **15**(3): p. 311-2.
22. Lundberg, G., et al., *Alternative lengthening of telomeres--an enhanced chromosomal instability in aggressive non-MYCN amplified and telomere elongated neuroblastomas*. Genes Chromosomes Cancer, 2011. **50**(4): p. 250-62.
23. Berbegall, A.P., et al., *Neuroblastoma after childhood: prognostic relevance of segmental chromosome aberrations, ATRX protein status, and immune cell infiltration*. Neoplasia, 2014. **16**(6): p. 471-80.
24. Farooqi, A.S., et al., *Alternative lengthening of telomeres in neuroblastoma cell lines is associated with a lack of MYCN genomic amplification and with p53 pathway aberrations*. J Neurooncol, 2014. **119**(1): p. 17-26.
25. Pugh, T.J., et al., *The genetic landscape of high-risk neuroblastoma*. Nat Genet, 2013. **45**(3): p. 279-84.
26. Molenaar, J.J., et al., *Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes*. Nature, 2012. **483**(7391): p. 589-93.
27. Van Maerken, T., et al., *Functional analysis of the p53 pathway in neuroblastoma cells using the small-molecule MDM2 antagonist nutlin-3*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(6): p. 983-93.
28. Fischer, A.H., *The diagnostic pathology of the nuclear envelope in human cancers*. Adv Exp Med Biol, 2014. **773**: p. 49-75.
29. Stephens, P.J., et al., *Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development*. Cell, 2011. **144**(1): p. 27-40.
30. Pollock, C. and S. Huang, *The perinucleolar compartment*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(2): p. a000679.
31. Norton, J.T., et al., *Perinucleolar compartment prevalence is a phenotypic pancancer marker of malignancy*. Cancer, 2008. **113**(4): p. 861-9.
32. Kamath, R.V., et al., *Perinucleolar compartment prevalence has an independent prognostic value for breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(1): p. 246-53.
33. Tadeo, I., et al., *Vascular patterns provide therapeutic targets in aggressive neuroblastic tumors*. Oncotarget, 2016. **7**(15): p. 19935-47.
34. Mann, S., *Life as a nanoscale phenomenon*. Angew Chem Int Ed Engl, 2008. **47**(29): p. 5306-20.
35. Dudoit, S. and T.P. Speed, *A score test for the linkage analysis of qualitative and quantitative traits based on identity by descent data from sib-pairs*. Biostatistics, 2000. **1**(1): p. 1-26.
36. Van Gestel, T., et al., *Bayesian framework for least-squares support vector machine classifiers, gaussian processes, and kernel Fisher discriminant analysis*. Neural Comput, 2002. **14**(5): p. 1115-47.
37. Bishop, C.M., et al., *Development of metabolic enzyme activity in locomotor and cardiac muscles of the migratory barnacle goose*. Am J Physiol, 1995. **269**(1 Pt 2): p. R64-72.
38. De Preter, K., et al., *Accurate outcome prediction in neuroblastoma across independent data sets using a multigene signature*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(5): p. 1532-41.
39. Salazar, B.M., et al., *Neuroblastoma, a Paradigm for Big Data Science in Pediatric Oncology*. Int J Mol Sci, 2016. **18**(1).





40. Narath, R., et al., *Automatic quantification of gene amplification in clinical samples by IQ-FISH*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2004. **57**(1): p. 15-22.
41. Chung, I., et al., *PML body meets telomere: the beginning of an ALternate ending?* *Nucleus*, 2012. **3**(3): p. 263-75.



## Presupuesto solicitado

### Primera anualidad

Gastos de Personal (Costes de contratación ajustadas a las tablas salariales del ISCIII 2016):

Técnico superior a tiempo parcial (15hrs/semana): 11.000 €

Gastos de Ejecución

A) Adquisición de bienes: 5.500 €

Anticuerpo SH54 2.000 €

Telomere kit 3.500 €

B) Contratación de servicios 0

c) Otros gastos 500 €

Viajes a congreso/reunión científica 500 €

Costes Indirectos 15% 3.000 €

**Total: 20.000 €**

### Segunda anualidad

Gastos de Personal (Costes de contratación ajustadas a las tablas salariales del ISCIII 2016):

Técnico superior a tiempo parcial (20hrs/semana): 14.750 €

Gastos de Ejecución

A) Adquisición de bienes: 0 €

B) Contratación de servicios 8.250 €

c) Otros gastos 2.500 €

Viajes a congreso/reunión científica 500 €

Publicaciones 2000

Costes Indirectos 15% 4.500 €

**Total: 30.000 €**