

Memoria científica y económica
Fundación Neuroblastoma
Junio: 2017–2018

Espacio intercelular: Bioimagen microscópica



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Título del proyecto: Espacio intercelular: Bioimagen microscópica

Investigador Principal: Rosa Noguera Salvá

Nombre del grupo: Grupo de Investigación Traslacional de Tumores Pediátricos de la Universidad de Valencia/INCLIVA

Institución solicitante: Instituto de Investigaciones Sanitarias INCLIVA

Ayuda solicitada: 50.000€

Ayuda concedida 2017: 20.000€

Ayuda prevista 2018: 30.000€

RESUMEN DEL PROYECTO

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 mecanotransductoras 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 del proyecto es la obtención e inclusión de datos de elementos tensérgicos 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.

RESULTADOS

Para el análisis de los elementos biotenségricos nucleares de la célula neuroblástica en relación con la MEC y citoplasma se ha puesto en marcha la caracterización y diseño de algoritmos de segmentación automática computarizada aplicada a imágenes histológicas y de hibridación in situ fluorescente (FISH), de 2 aspectos: alteraciones morfológicas de la envoltura nuclear y disfunción telomérica.

Alteraciones de la envoltura nuclear

Se llevó a cabo una extensa búsqueda bibliográfica para obtener información sobre la presencia de alteraciones de la envoltura nuclear (NE) en muestras histológicas tumorales:

- 1.-Alteraciones de forma y tamaño nuclear: pleomorfismo de forma y tamaño, presencia de micronúcleos, fragmentación nuclear, elevado ratio Nucleo/Citoplasma, deformidad (amoldamiento nuclear).
- 2.-Accidentes de la envoltura nuclear: inclusiones intracitoplasmáticas, pliegues, invaginaciones, protusiones, circunvoluciones, engrosamiento irregular de la envoltura nuclear.
- 4.-Patrones de condensación cromatínica: cromatina descondensada, núcleos en “sal y pimienta”, cromatina en finas o gruesas hebras, cromatina grumosa y cromatina “en manchas”.
- 5.-Presencia de nucleolos evidentes (agrandados)

La detección de alteraciones de la NE fue posible en 14 de los 16 tumores neuroblásticos con alta inestabilidad genómica incluidos en una micromatriz de tejido (TMA). Los otros dos casos resultaron anodinos. Las principales alteraciones morfológicas de la NE observadas fueron: inclusiones intracitoplasmáticas (4/16), micronúcleos (4/16), nucleolos evidentes (3/16), deformidad nuclear (3/16) y marcado pleomorfismo de forma (2/16). Se observaron diferentes patrones cromatínicos entremezclados dentro del mismo núcleo, con predominancia de cromatina en hebras gruesas y grumosas (4/16); y cromatina grumosa y “en manchas” (2/16). También se detectó la presencia de patrones homogéneos con predominancia de cromatina grumosa (2/16), “en manchas” (1/16) y en “sal y pimienta” (1/16). El resto de alteraciones descritas previamente no se detectaron al microscopio óptico.

En cuanto a la caracterización objetiva, no ha sido posible hasta el momento actual, la cuantificación automática correcta en imágenes digitales de la presencia de las alteraciones de la NE. Mediante el software Image Pro Plus se hizo una selección previa de aquellas herramientas de medida que podrían resultar útiles para la cuantificación de los núcleos: área, aspecto, textura, diámetro, longitudes de Feret, heterogeneidad de píxeles, número de “huecos” y su área, IOD (intensidad relativa al área) y perímetro ratio.

Utilizando este software se han realizado diversas pruebas con imágenes digitalizadas, tanto de cortes completos como de TMA, para seleccionar aquellas herramientas útiles para la medida de cada alteración nuclear, así como el ajuste de los parámetros que permitiera la creación de macros para una cuantificación automática posterior en imágenes digitales, tanto de las alteraciones de la envoltura nuclear como de las proteínas de agresividad PTB presentes en el espacio perinucleolar, propuesto para la tercera anualidad. Esto último ha resultado muy complicado y laborioso, sin haber podido obtener unos resultados óptimos, encontrándonos con una serie de problemas que paso a enumerar a continuación, y que han interferido en la consecución del análisis:

-Falta de homogeneidad en las tinciones de Hematoxilina-Eosina (HE) y PTB: a pesar de aumentar al máximo la rigurosidad en cuanto a tiempos de tinción, volumen de reactivos y fotografiado, la variabilidad intermuestra es suficientemente alta como para estandarizar la cuantificación con Image Pro Plus, basada en la selección de pixels según escala RGB.

-Resolución insuficiente de las imágenes y tamaño de los elementos intranucleares: El escáner Panoramic MIDI (3D Histech Ltd) permite escaneos a aumentos de 20X o 40X, insuficientes para la visualización y correcta cuantificación mediante el software Image ProPlus de las proteínas PTB acumuladas en el espacio perinucleolar. Para la visualización del PNC se requiere aumentos de 100X, por lo que el escaneo de TMA fue inservible. Se probó la cuantificación en imágenes fotografiadas a dicho aumento, sin embargo tampoco fue posible la cuantificación, debido a la presencia de tinción de fondo del nucleoplasma, que no permite la diferenciación mediante la selección de pixels de la tinción propia de las proteínas PTB del PNC. En cuanto a las alteraciones de la envoltura nuclear, estas resoluciones sí permiten su detección subjetiva al microscopio óptico, sin embargo resulta muy complicada la automatización de la cuantificación objetiva mediante el software Image pro plus, debido al pequeño tamaño de los elementos intranucleares, difícilmente detectables mediante las herramientas de medida previamente citadas.

Elongación teloméric

Para el análisis objetivo de la elongación telomérica se puso a punto los softwares TFL-Telo y Telometer, basados en la cuantificación de fluorescencia y área de las señales teloméricas. El software Telometer (Image J) proporcionó una corrección del contenido total de DNA mediante la normalización de la fluorescencia de las señales teloméricas con la fluorescencia de DAPI por núcleo, por lo que se consideró más oportuno para realizar los ensayos. A partir de imágenes de FISH digitalizadas se obtuvieron datos matemáticos relativos al área de las señales, número de señales por núcleo e intensidad de las mismas, así como la desviación estándar de cada valor. A partir de estos datos se pudo inferir la elongación telomérica, según área e intensidad, así como la presencia de heterogeneidad clonal, dada la desviación estándar de los valores por núcleo. Mediante

estos resultados, se ha podido realizar un estudio de la presencia del mecanismo alternativo de elongación telomérica (ALT) en tumores neuroblásticos con alta inestabilidad genómica, presentado en diversos congresos.

La hibridación mediante FISH fue positiva en 16 de los 18 tumores neuroblásticos de alta inestabilidad genómica. Realizar el experimento en TMA nos permitió obtener resultados reproducibles y no sesgados, al realizar la hibridación y posterior digitalización en todos los tumores al mismo tiempo.

Mediante la dicotomización de los datos a partir de la mediana de los valores medios del ratio de intensidad telómeros/DAPI, área y número de señales, así como de su desviación estándar (SD) por biopsia, se definieron dos grupos de tumores: A) aquellos con valores de ratio intensidad, área y número de señales por encima de la mediana (9/16) y B) formado por aquellos casos que presentaron valores por debajo de la mediana en cualquiera de los 3 parámetros (7/16). El 77.8% de los casos del grupo A mostraron además valores de SD de la media de ratio intensidad por encima de la mediana (7/9), en contraste con el 42.8% de los casos del grupo B (3/7).

Tras la asociación de los datos obtenidos por FISH con los datos genómicos de los tumores, detectamos la presencia de amplificación del oncogén *MYCN* en el 66.7% de los casos del grupo A y en el 100% de los casos del grupo B, mientras que la delección del cromosoma 11q sólo se observó en el 33.3% de los casos del grupo A. La edad media al diagnóstico fue de 43 y 20 meses para el grupo A y B, respectivamente. Únicamente cinco pacientes presentaron tumores en estadio 4, tres de ellos pertenecientes al grupo A. La mitad de los pacientes de la cohorte sufrieron una recaída, 75% incluidos en el grupo A. El 53% de los pacientes murieron debido a la enfermedad, 77.8% de los cuales pertenecientes al grupo A. El tiempo medio libre de enfermedad (tEFS) de toda la cohorte fue de 37 meses, sin embargo este tiempo decreció en el grupo A hasta 15 meses y aumentó a 64 meses en el grupo B. El tiempo medio de supervivencia total (tOS) de la cohorte fue de 44 meses, y de la misma manera disminuyó hasta 21 meses en los pacientes del grupo A y aumentó a 73 meses en el grupo B.

Considerando todos los resultados en conjunto, los pacientes del grupo A presentaron peor pronóstico en relación a tumores con telómeros más elongados y presencia del mecanismo alternativo de elongación telomérica (ALT), evidenciado por la presencia de alta intensidad y área de las señales teloméricas, así como de los valores superiores de SD de la media de los valores de ratio intensidad. Además, el caso en el que se detectó la presencia de agregados teloméricos mediante análisis subjetivo formó parte de este grupo. Estos resultados sugirieron heterogeneidad en la elongación telomérica y por tanto la posible presencia del mecanismo ALT en algunos clones celulares. Por otro lado, el tEFS y tOS en este grupo de pacientes fue inferior, a pesar de que ambos grupos estaban formados por tumores de alta inestabilidad genómica y con igual porcentaje de pacientes con tumores en estadio 4.

ESTUDIOS A REALIZAR EN 2018

Como consecuencia de La experiencia adquirida en la cuantificación objetiva de las proteínas PTB y alteraciones de la NE, se propone un análisis subjetivo supervisado y posterior transformación a lenguaje matemático de la presencia de PNC y de las alteraciones morfológicas de la NE, de la siguiente forma:

Compartimento perinucleolar (PNC)

Validar los patrones encontrados en tumores neuroblásticos de alta inestabilidad genómica en otros tumores de diferente inestabilidad: recientemente se ha realizado un estudio en el grupo de alta inestabilidad genómica con presencia de cromotripsis y/o más de 3 amplificaciones génicas y se han establecido 4 patrones de tinción: (A) ausencia de tinción; (B) tinción débil del nucleoplasma sin presencia de PNC; (C) tinción débil y difusa del nucleoplasma con presencia de 2-5 pequeños PNC por célula y prevalencia del 20-50% ; (D) patrón de tinción del nucleoplasma punteado, de intensidad media-fuerte con presencia de algunos PNC de tamaño grande y prevalencia del 50-90%.

Estos patrones se correlacionan con los perfiles genómicos de los tumores, de forma que el grupo D corresponde aquellos casos con mayor número de SCAs, por lo que se propone continuar el estudio de la siguiente forma:

-Aplicar estos patrones a otros grupos de inestabilidad genómica ya establecidos y agrupados en diferentes TMAs: inestabilidad media (*MYCN* amplificado, 11q deleciónado o >4 alteraciones cromosómicas segmentarias típicas (SCA typ), baja (<3 SCA typ) y muy baja (alteraciones cromosómicas numéricas).

-Buscar otras correlaciones con datos clínicos de los pacientes o biológicos de los tumores.

-Una vez validados los patrones, podrán categorizarse y transformar en lenguaje matemático, asignando un valor numérico a la presencia o ausencia de cada variable o patrón, para poder completar la base de datos Neupat y el modelo predictivo de neuroblastoma (NB) junto a los datos ya obtenidos de la MEC, los datos genómicos de asociación y clínicos de los pacientes.

Alteraciones morfológicas de la envoltura nuclear

La definición de las alteraciones morfológicas de la envoltura nuclear ha quedado definida de forma subjetiva y supervisada por 3 investigadores, en tinciones de HE de tumores de alta inestabilidad genómica. De la misma forma que para el PNC, se propone:

-Asociación de alteraciones de la NE con características genéticas o clínicas (búsqueda de patrones)

-Aplicar y validar esos patrones en los otros grupos de inestabilidad genómica.

-Transformar esos patrones en lenguaje matemático para incluir en Neupat y complementar el modelo predictivo

Elongación telomérica

En cuanto al análisis de los telómeros se propone continuar el trabajo de la siguiente forma:

- Cuantificar mediante IQ-FISH y Telometer el resto de TMA's con diferente inestabilidad genómica.
- Validar los resultados en cortes completos de los tumores incluidos en esas TMA's.
- Validar los patrones encontrados en la TMA de alta inestabilidad en las otras TMA's, así como la búsqueda de nuevos patrones asociados a diferentes inestabilidades.
- Asociación de los parámetros y variables derivadas del análisis de bioimagen microscópica nuclear a los datos genéticos albergados en la base de datos Neupat. Complementar el modelo predictivo de NB.

Por otro lado, se añadirán nuevos estudios sobre fenómenos de biotensegridad y mecanotransducción nuclear en NB de alto y bajo riesgo (MEMORIA ADJUNTA: BIOIMAGEN MICROSCÓPICA: BIOTENSEGRIDAD NUCLEAR DE LOS TUMORES NEUROBLÁSTICOS USANDO MODELOS 3D IN VITRO. AYUDA SOLICITADA PARA 2019-2021).

Hemos iniciado estudios derivados de la estancia de 3 meses (mayo-julio 2018) en el Instituto de Bioingeniería de Cataluña de una de las investigadoras predoctorales, mediante la **bioimpresión de matrices extracelulares en tres dimensiones (3D)**. A continuación se explica brevemente el nuevo proyecto: se obtendrán hidrogeles de diferente composición y dureza, que a partir de la inoculación de líneas celulares de NB agresivo, servirán de soporte para la generación de matrices tridimensionales que imitarán a los modelos propuestos en trabajos previos del grupo. Se realizará el estudio del compartimento perinucleolar, envoltura nuclear y elongación telomérica, así como el análisis del perfil pangénómico de este material, mediante diversas técnicas como la microscopía confocal y de segundos armónicos para la caracterización de las estructuras matriciales en 3D, técnicas de tinción IQ (HE), IHQ y IQ-FISH, mediante inclusión en parafina de los modelos en 3D para aplicar el análisis subjetivo supervisado de la biotensegridad nuclear previamente explicado y su relación con la matriz extracelular generada (colágeno, vitronectina, fibras de reticulina) en 2D, así como técnica de arrays de SNP de alta densidad tras decelularización de las matrices generadas para la determinación de los posibles cambios de las alteraciones cromosómicas presentes en las células inoculadas.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS 2017-18 DONDE CONSTA LA AYUDA RECIBIDA

I. Comunicaciones orales y ponencias:

I.1. SIOPEN Biology Meeting

Viena (Austria), 2 y 3 de marzo 2017

I.1.a. Spanish experience on ctDNA in a small group of HR patients.

I.1.b. SIOPEN hetMNA study – finalization

I.2. XIX Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular. IV Congreso Iberoamericano de Histología. VII International Congress of Histology and Tissue Engineering.

Santiago de Compostela (España), del 5 al 8 de septiembre 2017

La Histología se abre a la Sociedad. El proceso de la investigación microscópica en cáncer infantil: a la búsqueda de la curación.

I.3. Reunión Grupo Neuroblastoma SEHOP

Valencia (España), 23 de noviembre 2017

Patología digital del neuroblastoma en 3D.

I.4. III Simposio de Biopsia Líquida

Santiago de Compostela (España), del 25 al 27 de enero 2018

Challenges and opportunities for the application of ctDNA in neuroblastoma.

II. Presentación de posters:

II.4. II Congreso nacional de jóvenes investigadores en biomedicina

Valencia (España), 23 y 24 de noviembre 2017

II.4.a. P01-53: Analysis of the perinucleolar compartment in neuroblastic tumor cells with high chromosomal instability.

II.5. ANR 2018

San Francisco (California), del 9 al 12 de mayo 2018

II.5.a. 297: Nuclear Patterns of High Chromosome Unstable Neuroblastic Cells Through Digital Pathology.

III. Cursos:

III.1. XIX Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular. IV Congreso Iberoamericano de Histología. VII International Congress of Histology and Tissue Engineering.

Santiago de Compostela (España), del 5 al 8 de septiembre 2017

Análisis de bioimagen microscópica.

III.2. VI Curso de Patología Digital

Valencia (España), del 25 al 27 de octubre 2017

Análisis de imagen en investigación: Estudio automático de imágenes seriadas histoquímicas, inmunohistoquímicas y de FISH en neuroblastoma.

IV. Publicaciones en desarrollo:

IV.1. Autores: Susana Martín-Vañó, Ana P. Berbegall, Samuel Navarro, Rosa Noguera.

Título: Novel diagnostic approach of nuclear alterations in high chromosomal unstable Neuroblastoma by Digital Pathology.

GASTOS

Fecha	F.Cobro	Tercero	Descripción	Importe_cobrado	Importe
08/11/2017	08/11/2017	FUNDACION NEUROBLASTOMA	DONA	20.000,00	20.000,00
				20.000,00	20.000,00

F) GASTOS DEL PROYECTO (No se muestran los datos a los que no se tiene acceso)

Tipo Gasto	Fecha	F.Emisión	F.Pago	Tercero	Descripción Gasto	Importe
Gastos por gestion (overheads)	08/11/2017	08/11/2017	08/11/2017	FUNDACION NEUROBLASTOMA	Traspaso al proyecto 0 - PROYECTO DE ESTRUCTURA DE LA FUNDACION	3.000,00
Suscripciones/inscrip. servicios generales (bolsas)	10/05/2018	10/05/2018	14/05/2018	IMPACT JOURNALS, LLC ONCOTARGET	Servicio de publicación de artículo científico ONCOTARGET: Lymph microvascularization as a prognostic indicator in neuroblastoma	2.917,95
Otros gastos (proy. investigacion)	31/05/2018	23/05/2018	15/06/2018	UNIVERSIDAD DE VALENCIA	2018/1/1308/A 843 - CytoSan HD Kit: Servicio de Analisis Multigenico Ucim.	8.194,27
						14.112,22

I) DISPUESTOS

Tipo	Referencia	Fecha	Tercero	Importe Total	Importe Aplicado	Pendiente
Pedido	2018/2/906	23/05/2018	UNIVERSIDAD DE VALENCIA	8.194,27	8.194,27	0,00
				8.194,27	8.194,27	0,00

SALDO FINAL					5.887,78
--------------------	--	--	--	--	-----------------