

HOSPITAL LA PAZ

Servicio de Hemato-oncología
Pediátrica

Sección de Oftalmología
Infantil

INGEMM

Instituto de Investigación
Sanitaria (IdiPAZ)

Hospital Universitario La Paz
(HULP)

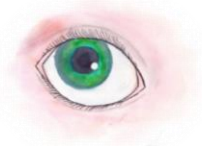
INVESTIGADORES

INVESTIGADORES PRINCIPALES

- ANTONIO PÉREZ MARTÍNEZ. MD, PhD. Jefe de Servicio de Hematooncología Pediátrica.
- JESÚS PERALTA. MD, PhD. Médico adjunto de Sección de Oftalmología Pediátrica.
- SUSANA NOVAL. MD, PhD. Jefa de Sección de Oftalmología Pediátrica.
- Contrato postdoctoral

EQUIPO INVESTIGADOR

- Adela Escudero López. PhD. Responsable del laboratorio de Hematooncología Pediátrica. Madrid.
- Beatriz Ruz, Bioinformática del Servicio de Genética.
- Nerea Matamala, investigadora postdoctoral del Servicio de Genética - INGEMM-IdiPAZ-HULP
- Victor Galán. Médico adjunto del Servicio de Hematooncología Pediátrica.
- Sonsoles San Román. Médico adjunto del Servicio de Hematooncología Pediátrica.
- Oriana D'Anna. Médico adjunto de Sección de Oftalmología Pediátrica.
- Alicia Jalvo, Técnico de laboratorio del Servicio de Genética - INGEMM-IdiPAZ-HULP
- Alicia Pernas, Técnico de laboratorio del Servicio de Genética - INGEMM-IdiPAZ-HULP

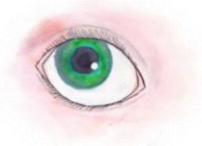


Introducción

El retinoblastoma (Rb) es el cáncer intraocular primario más frecuente en la edad pediátrica, paradigma de la predisposición genética al cáncer. Se trata de un tumor precoz, con una edad media de presentación inferior a los dos años, consecuencia de la presencia de dos mutaciones, afectando a cada una de las dos copias del gen RB1. Un 40% de los casos son hereditarios, aunque sólo el 10% tengan historia familiar; por lo que en estos casos es habitual la aparición de múltiples focos en el mismo ojo o en el ojo contralateral durante los primeros años de vida. El diagnóstico es clínico por oftalmoscopia y se confirma con ecografía ocular, aunque el estudio de imagen se debe completar con RM para determinar la extensión de la lesión y descartar lesiones a nivel de la línea media cerebrales. Una de las principales limitaciones en su manejo clínico, y un aspecto diferencial con otros tumores sólidos, reside ya al diagnóstico en la imposibilidad de realizar la biopsia directa sobre el tumor por el riesgo de diseminación tumoral.

Sin embargo, aún resulta más complejo el seguimiento de estas lesiones. En el momento de la presentación la mayoría de los niños presentan al menos una lesión de gran volumen que ha desencadenado la leucocoria o el estrabismo gracias a los cuales los padres del niño han consultado. Actualmente el tratamiento más extendido en estas fases iniciales es la quimioterapia intrarterial y en menos ocasiones, sistémica. Pero es muy frecuente que haya que consolidar estos tratamientos o actuar sobre focos más pequeños o de nueva aparición con otras formas de tratamiento como crioterapia, laserterapia, termoterapia o inyecciones intravítreas de quimioterapia. Estas últimas son necesarias en los casos en los que el tumor principal se ha extendido a la cavidad vítrea donde la quimioterapia administrada por vía intrarterial no alcanza niveles terapéuticos suficientes.

De modo que el tratamiento de estos niños se extiende en el tiempo, con ciclos de quimioterapia intrarterial, exploraciones bajo anestesia general y tratamientos de consolidación de lesiones con respuesta incompleta o de nueva aparición. Actualmente el método para determinar la respuesta al tratamiento, las recurrencias o la aparición de nuevas lesiones se basa únicamente en la oftalmoscopia indirecta por oftalmólogos expertos y registro retinográfico para poder compararlas a lo largo del tiempo. Y la experiencia es aún más determinante si tenemos en cuenta que los patrones de regresión de las lesiones son muy variables (blanco en requesón, calcificación, gris traslúcido en escamas de pescado...) y que las siembras vítreas o retinianas son de pequeño tamaño. Todo esto nos obliga a buscar métodos complementarios para determinar de forma objetiva la respuesta al tratamiento y la posible reactivación o aparición de nuevos focos de retinoblastoma.



Las biopsias líquidas analizan líquidos biológicos, como la sangre, el líquido céfalorraquídeo, líquidos articulares, u otros líquidos como el humor acuoso, para identificar ADN libre circulante (cfDNA) liberado por las células tumorales. Constituye una estrategia en desarrollo en muchos tumores sólidos aportando datos cada vez más consolidados sobre su pronóstico durante la monitorización de la enfermedad, pero también para ayudar a la caracterización genética de la enfermedad al diagnóstico de tumores donde una biopsia directa sobre el tumor no es posible por su accesibilidad o por su riesgo de diseminación.

Es por tanto en este escenario donde el retinoblastoma constituye un tumor en el que la biopsia líquida sobre el humor acuoso resulta de especial interés sobre todo para el seguimiento.

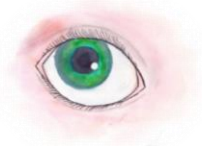
El humor acuoso es un líquido transparente que baña a las estructuras internas de la cámara anterior y posterior del ojo (cara anterior del cristalino, iris, endotelio). Entre sus funciones se encuentran la de nutrir y oxigenar a la córnea y al cristalino, estructuras que carecen de aporte sanguíneo en la edad adulta. Es acelular.

El humor acuoso, en manos de oftalmólogos expertos y tras sedación en el paciente pediátrico, puede obtenerse de forma segura y mínimamente invasiva en los pacientes con retinoblastoma. De hecho, extraer 0,1 ml de humor acuoso es una práctica habitual cuando se inyecta volumen con las inyecciones de quimioterapia intravítrea. A partir de él se podría obtener el cfDNA y realizar los estudios genómicos reproduciendo los perfiles genéticos como: a) las alteraciones somáticas en el número de copias (CNA), la ganancia de 1q, 2p, 6p, pérdida de 13q, 16q, y la amplificación focal de MYCN, b) la presencia de mutaciones en RB1 y c) además podría monitorizarse a lo largo del tiempo correlacionando estos hallazgos con la respuesta al tratamiento.

Por tanto, la biopsia líquida del humor acuoso constituye una herramienta útil y precisa para el manejo clínico e individualizado de los pacientes con retinoblastoma, tanto para el diagnóstico, como para el pronóstico y manejo terapéutico.

El Hospital la Paz fue acreditado como CSUR (Centro, servicio y unidad de referencia) en el año 2008, aunque a lo largo de su historia ha atendido ya a más de 300 niños con retinoblastoma, con una media de 10-12 pacientes al año procedentes de todo el territorio nacional. El abordaje del retinoblastoma es multidisciplinar. El Comité de Retinoblastoma está constituido por la Sección de Oftalmología infantil, trabajando en colaboración junto con diversos servicios del hospital como son el Servicio de Hemato-oncología infantil, Radiología intervencionista, Radioterapia, Genética y Farmacia.

El diagnóstico inicial de la enfermedad o alcanzar tasas de supervivencia superiores al 95% ya no constituyen un reto en el abordaje del retinoblastoma, en manos de equipos multidisciplinares con gran experiencia, pericia técnica y en continua actualización. Sin embargo, necesitamos continuar investigando en la caracterización genética, la predisposición a cáncer a largo plazo, nuevos tratamientos y en disminuir la tasa de morbilidad. Debemos seguir buscando técnicas diagnósticas y terapias avanzadas que minimicen la probabilidad de enucleación, la toxicidad retiniana de los fármacos, el riesgo de extensión del tumor, la necesidad de tratamientos repetidos y la variabilidad



clínica; en este caso, mediante la búsqueda de técnicas avanzadas de detección precoz de actividad tumoral residual.

Objetivos

1. Generar una colección de humor acuoso procedente de pacientes diagnosticados de retinoblastoma tras el primer ciclo de tratamiento y a lo largo del seguimiento
2. Identificar nuevos biomarcadores pronósticos, diagnósticos o terapéuticos a partir del material genético contenido en el humor acuoso que nos permitan mejorar el seguimiento y tratamiento de los pacientes de retinoblastoma

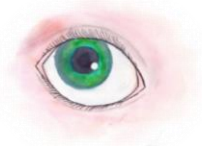
Metodología

- Pacientes: Casos nuevos de retinoblastoma que no hayan recibido tratamientos previos. Esto supone una muestra de entre 8-15 niños al año.
- Extracción de sangre periférica (2 ml) al diagnóstico con el estudio preoperatorio y en cada exploración bajo anestesia que se realice en quirófano tras el primer ciclo de tratamiento.
- Extracción de humor acuoso (100 mcL). Se tomará una primera muestra al diagnóstico, aprovechando una exploración bajo anestesia general en quirófano o en la sala de vascular con el primer ciclo de quimioterapia intrarterial. Esta técnica debe realizarse siempre tras exposición de la superficie ocular durante 3 minutos a povidona yodada al 50%, en condiciones de esterilidad y a través de córnea clara avascular. A partir del tercer ciclo de quimioterapia intrarterial o de cualquier otro modo de tratamiento, se realizan múltiples exploraciones bajo anestesia general, circunstancias en las que se puede volver a obtener una muestra.

El número de exploraciones bajo anestesia general que se le realice a un paciente depende de varios factores como el estadio inicial, la edad, la presencia de focos múltiples, único o de siembras vítreas o retinianas. No se someterá al paciente a más exploraciones de las clínicamente indicadas, pero aproximadamente se obtendrán muestras:

- Al diagnóstico con el primer ciclo de quimioterapia intrarterial u otra modalidad de tratamiento menos frecuente en la actualidad
- Al finalizar la quimioterapia intrarterial y posteriormente en las revisiones de quirófano (dos al año), durante dos años.

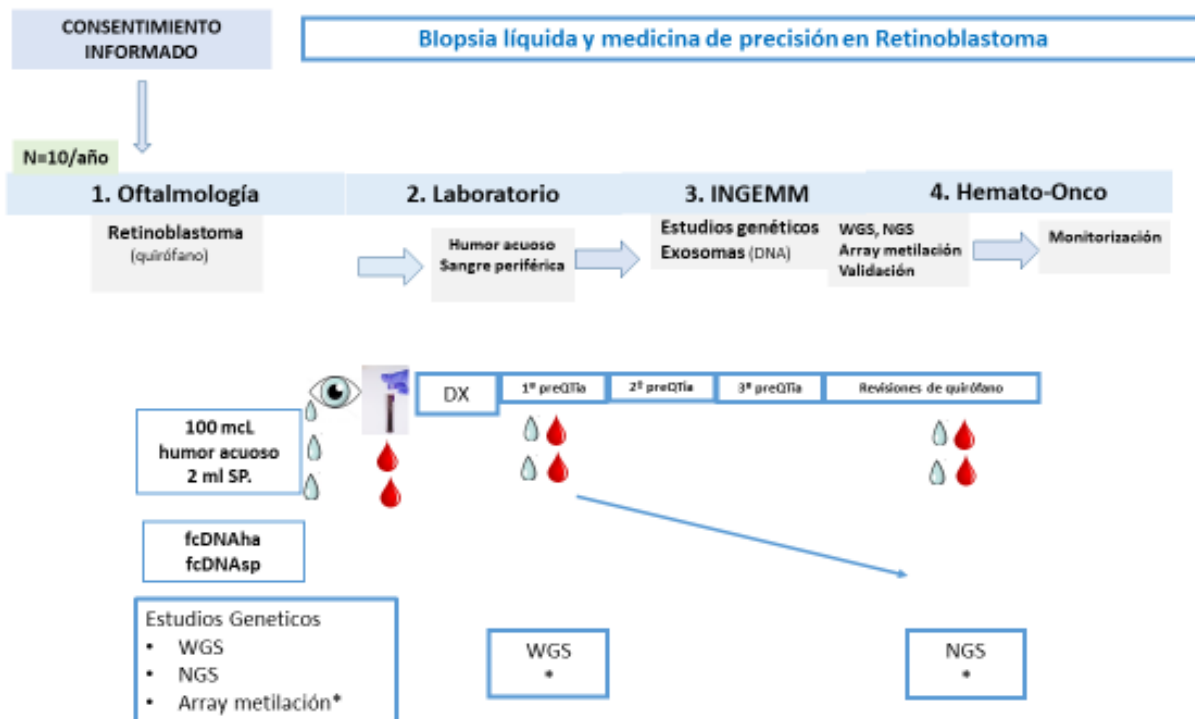
Esta periodicidad puede variar en casos en los que no se obtenga la respuesta esperada al tratamiento o con la aparición de nuevos focos. Se aprovechará cada ocasión para sacar nuevas



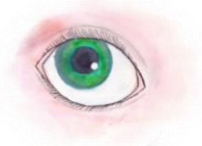
muestras y así establecer mejor la correlación con los hallazgos clínicos. El protocolo se interrumpirá si se indica la enucleación; momento en el cual se tomará la última muestra.

En los casos bilaterales, se tomará muestra sólo del ojo en el que haya aparecido un nuevo foco, presente siembras vítreas o se encuentre en un estadio más avanzado.

Los resultados se analizarán de forma conjunta y por subgrupos, según la presencia o no de siembras vítreas que puede ser determinante en la capacidad de detectar DNA en humor acuoso.



- Aislamiento de cfDNA Empleando el kit QIAamp Circulating Nucleic Acid (Qiagen) tanto de humor acuoso como de sangre periférica
aislamiento de exosomas tumorales en humor acuoso
- Estudio genético: Whole genome Sequencing (WGS) al diagnóstico y NGS para monitorización.



- Análisis estadístico: Correlación de las alteraciones genéticas identificadas en el cfDNA extraído de humor acuoso con la evolución clínica del paciente

Resultados esperados:

Esperamos incluir en el estudio 10 pacientes diagnosticados de retinoblastoma y obtener un total alrededor de 60 muestras de humor acuoso, 6 por de cada uno de los pacientes. Esperamos que la correlación entre los resultados del estudio genético y la evolución clínica de cada uno de los pacientes nos permita determinar si existe algún biomarcador molecular que resulte de utilidad para el seguimiento de los pacientes.

Bibliografía

1. Berry JL, Xu L, Polski A, Jubran R, Kuhn P, Kim JW, Hicks J. Aqueous Humor Is Superior to Blood as a Liquid Biopsy for Retinoblastoma. *Ophthalmology*. 2020 Apr;127(4):552-554. doi: 10.1016/j.ophtha.2019.10.026. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31767439; PMCID: PMC7093221.
2. Berry JL, Xu L, Kooi I, Murphree AL, Prabakar RK, Reid M, Stachelek K, Le BHA, Welter L, Reiser BJ, Chévez-Barrios P, Jubran R, Lee TC, Kim JW, Kuhn P, Cobrinik D, Hicks J. Genomic cfDNA Analysis of Aqueous Humor in Retinoblastoma Predicts Eye Salvage: The Surrogate Tumor Biopsy for Retinoblastoma. *Mol Cancer Res*. 2018 Nov;16(11):1701-1712. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0369. Epub 2018 Jul 30. PMID: 30061186; PMCID: PMC6214755.
3. Polski A, Xu L, Prabakar RK, Kim JW, Shah R, Jubran R, Kuhn P, Cobrinik D, Hicks J, Berry JL. Cell-Free DNA Tumor Fraction in the Aqueous Humor Is Associated With Therapeutic Response in Retinoblastoma Patients. *Transl Vis Sci Technol*. 2020 Sep 30;9(10):30. doi: 10.1167/tvst.9.10.30. PMID: 33062393; PMCID: PMC7533735.
4. Xu L, Shen L, Polski A, Prabakar RK, Shah R, Jubran R, Kim JW, Biegel J, Kuhn P, Cobrinik D, Hicks J, Gai X, Berry JL. Simultaneous identification of clinically relevant RB1 mutations and copy number alterations in aqueous humor of retinoblastoma eyes. *Ophthalmic Genet*. 2020 Dec;41(6):526-532. doi: 10.1080/13816810.2020.1799417. Epub 2020 Aug 17. PMID: 32799607; PMCID: PMC7806277.
5. Ghiam BK, Xu L, Berry JL. Aqueous Humor Markers in Retinoblastoma, a Review. *Transl Vis Sci Technol*. 2019 Apr 9;8(2):13. doi: 10.1167/tvst.8.2.13. PMID: 31019846; PMCID: PMC6469575.
6. Berry JL, Xu L, Murphree AL, Krishnan S, Stachelek K, Zolfaghari E, McGovern K, Lee TC, Carlsson A, Kuhn P, Kim JW, Cobrinik D, Hicks J. Potential of Aqueous Humor as a Surrogate Tumor Biopsy for Retinoblastoma. *JAMA Ophthalmol*. 2017 Nov 1;135(11):1221-1230. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2017.4097. PMID: 29049475; PMCID: PMC5710399.

