



MEMORIA CIENTÍFICA

RECAÍDA 0

MATEMÁTICAS CONTRA LA LEUCEMIA INFANTIL



para la

ASOCIACIÓN PABLO UGARTE

en colaboración con



MEMORIA CIENTÍFICA

Título del proyecto: Identificación temprana de resistencias y optimización de tratamientos en leucemia linfoblástica aguda infantil mediante modelado matemático y estadístico

Resumen del proyecto. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la enfermedad maligna más frecuente en la infancia, con una tasa de recaídas del 15-20% a pesar de los avances logrados en los últimos años. La aparición de métodos diagnósticos ha determinado un nuevo enfoque en la clasificación de las neoplasias hematológicas, pasando de las clasificaciones basadas en la morfología o en la respuesta clínica a un intento de clasificación centrado en la etiopatogenia molecular/bioquímica. Entre las metodologías diagnósticas más relevantes, destacar la citometría de flujo (CMF) por la rapidez en la obtención de resultados y su relativa sencillez técnica, revelándose como una herramienta de primer orden para facilitar el diagnóstico y seguimiento de la LLA. Los modelos matemáticos permiten realizar predicciones cuantitativas, inferir mecanismos subyacentes, verificar hipótesis biológicas y describir relaciones causales entre los elementos de un sistema biológico. El propósito del proyecto es reunir datos de pacientes de LLA que incluyan aparte de los datos clínicos los datos moleculares y los datos brutos de la citometría de flujo para desarrollar dos objetivos principales: i) Identificar nuevos biomarcadores pronóstico, de respuesta y/o resistencia a los tratamientos usando todos los datos obtenidos del diagnóstico integrado, especialmente los datos de la CMF. ii) Desarrollar modelos evolutivos que puedan describir la evolución de la enfermedad y su respuesta a las terapias y utilizarlos para buscar estrategias optimizadas de dosificación y/o estrategias que minimicen la probabilidad de aparición de recaídas y/o tratamientos personalizados en función de los perfiles de expresión encontrados.

Antecedentes y estado actual del tema. La leucemia LLA infantil es el cáncer más frecuente en la infancia. Los tratamientos actuales consiguen curar a un elevado porcentaje de estos niños, aunque la recaída de la LLA supone todavía la quinta neoplasia más frecuente en edades pediátricas. El tratamiento depende del grupo de riesgo del paciente, clasificándose según la presencia o no de algunos factores biológicos encontrados al diagnóstico y la respuesta a la terapia, esto es, los niveles de enfermedad mínima residual (EMR) en momentos concretos del tratamiento. Los pacientes clasificados como grupo de Riesgo Alto (RA) son tratados de forma más agresiva, reservando protocolos menos agresivos para los pacientes de Riesgo Estándar (RE) o intermedio (RI). Hasta un 15% de los pacientes etiquetados como de RE o RI recaen, esto indica que se desconocen aún factores pronósticos para identificar correctamente el grupo de riesgo (Fuster, 2014; Garcia y col, 2012; SEHOP, 2016). El uso de distintos métodos diagnósticos ha propiciado un nuevo enfoque en la clasificación de las neoplasias hematológicas, pasando de las clasificaciones basadas en la morfología o en la respuesta clínica a un intento de clasificación centrado en la etiopatogenia molecular/bioquímica (Harris y col, 1994; 1999). En las LLA se realiza un diagnóstico integrado que se compone de cuatro partes (Dohner et al, 2010): citomorfología, citometría de flujo, biología molecular y citogenética.

El modelado matemático en cáncer pretende mejorar los tratamientos mediante la optimización de los protocolos y la personalización de las terapias. Se han planteado modelos matemáticos para describir el comportamiento de distintos tumores hematológicos (Clapp y col 2015; Enciso y col 2015). Por ejemplo, se han usado para comparar estrategias de tratamiento, como el uso de dosis intensivas frente a continuas (Glauche et al, 2012) o el número de fármacos a utilizar o su secuencia (Roeder y col, 2006; Komarova et al, 2009; Jayachandran y col, 2014; Stiehl y col, 2014; He y col. 2016). Otros autores (Stiehl y col. 2016; Marciniak-Czochra y col. 2009) han desarrollado modelos matemáticos para estudiar la aparición y evolución de heterogeneidad clonal en leucemias agudas. Otros estudios

se han planteado cómo la organización jerárquica de un tejido puede controlar la acumulación de mutaciones somáticas (Derenyi y Szollosi, 2017). Varios trabajos han abordado el tema de la resistencia a los tratamientos en leucemias utilizando datos in-vitro (Panetta y col, 2006), datos de ensayos clínicos (Tang et al, 2012), procesos de 'branching' (Tomasetti, 2010) o de nacimiento y muerte celular con mutaciones (Komarova y col, 2009), por citar sólo algunos ejemplos.

Una limitación de los modelos matemáticos previos es que se han basado en conjuntos de datos de pacientes muy limitados. Por ejemplo, ningún modelo ha aprovechado los datos de citometría de flujo para caracterizar la enfermedad a pesar de la estandarización de su uso (Ortuño y Orfao, 2002; Van Dongen y col, 2015). Además, pocos estudios se han centrado en las LLA (Panetta y col, 2010; Noble y col, 2010; Nakata y col. 2011; Clapp y Levy 2014). Finalmente ningún estudio ha tenido una orientación traslacional y logrado proponer estrategias de utilidad clínica.

Objetivos. El proyecto tiene dos objetivos principales bien definidos.

O1. Identificación de nuevos biomarcadores pronósticos, de respuesta y/o resistencia a los tratamientos usando todos los datos obtenidos del diagnóstico integrado, especialmente la CMF. Para ello revisaremos los factores que afectan al diagnóstico y a la clasificación de las leucemias agudas y en datos útiles para el seguimiento de la EMR. El proyecto se basa en explotar con mayor profundidad los datos disponibles, pero especialmente los de la CMF. Esta prueba de rutina permite conocer la expresión molecular en la superficie de cada célula tumoral (de la muestra de hasta 10^6 células) y caracterizar el perfil inmunofenotípico de las células leucémicas. De la enorme cantidad de información que proporciona esta prueba sólo se utiliza una pequeña parte para identificar el fenotipo del clon mayoritario, pero se podría usar para buscar patrones de clones minoritarios que puedan estar relacionados con una posible resistencia al tratamiento. Matemáticamente el uso de n marcadores (que pueden estar en torno a ocho) permite embeber el conjunto de datos de muestra en un espacio n -dimensional, en el que se podrían caracterizar propiedades de los datos mediante métodos estadísticos, métodos evolutivos o estrategias de tipo machine-learning y proporcionar nuevos biomarcadores. Esto tiene el potencial de ir mucho más allá de las proyecciones bidimensionales que se utilizan actualmente para interpretar los datos. Además, esta información está disponible longitudinalmente en tiempo con lo cual se dispondrá también de las evoluciones temporales de estos nuevos biomarcadores, incrementando la información disponible con potencial utilidad clínica. Por tanto, plantear un estudio retrospectivo para aprovechar la información del CMF e intentar buscar en esa ingente cantidad de datos patrones que permitan predecir resistencias. Este objetivo se desarrolla en varios objetivos menores.

O11. Búsqueda de patrones de expresión y/u otro tipo de biomarcadores definidos mediante modelos matemáticos que sean predictores de buena/mala respuesta y/o posibilidad de desarrollo de resistencias. Usaremos también herramientas de análisis de datos dispersos como medidas de clustering, medidas de complejidad espacio-temporal de nubes de puntos, etc.

O12. Relacionar estos patrones con el 20% de recaídas en LLA y usarlos para predecirlas. Plantear hipótesis de los fenómenos de resistencia.

O13. Desarrollar biomarcadores basados en la evolución temporal de los patrones obtenidos a partir del análisis de los datos longitudinales de la CMF.

O2. Buscar estrategias optimizadas de dosificación y/o estrategias que minimicen la probabilidad de aparición de recaídas y/o tratamientos personalizados en función de los perfiles de expresión encontrados utilizando modelos matemáticos evolutivos. Para ello es necesario contar con modelos evolutivos que puedan describir la evolución de la enfermedad y su respuesta a las terapias.

O21. Extender los modelos matemáticos evolutivos existentes (por ejemplo los de Sthiel y col, 2014) para aprovechar la mayor información sobre los clones presentes obtenida de la CMF y describir la información de la enfermedad de modo retrospectivo.

O22. Validar los modelos matemáticos utilizando información retrospectiva de pacientes.

O23. Estudio matemático para buscar estrategias terapéuticas óptimas para el tratamiento de la enfermedad y estudiar su viabilidad. Realizar una propuesta de ensayo clínico.

Metodología de la investigación.

Recogida de datos. Procederemos a la recogida de datos de pacientes que cumplan los criterios de inclusión tales como: i) diagnosticados de LLA con edad superior de 1 año e inferior a 19 años; ii) que tengan incluidos en su historia clínica el diagnóstico integrado (citología, CMF, biología molecular y citogenética), el estudio de líquido cefalorraquídeo, datos clínicos personales y terapéuticos. En la recogida de datos participarán distintos hospitales colaboradores en el estudio principalmente el Hospital de Jerez (Cádiz) donde el protocolo se encuentra en aprobación por parte de la doctora Cristina Blázquez (hematóloga pediátrica). El proyecto se ha presentado en distintos foros, por ejemplo en una reunión Post_IBFM 17 y distintos hospitales se han mostrado dispuestos a colaborar entre los que se encuentran el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander), el Hospital Universitario Niño de Jesús (Madrid), el Hospital Universitario Vall d' Hebron (Barcelona) y el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia). Estimamos contar aproximadamente con una muestra de 300 pacientes por año desde 2013.

Desarrollo, análisis y validación de nuevos biomarcadores. Con los patrones moleculares y los datos de la CMF, desde la Universidad de Cádiz usaremos técnicas de análisis de datos dispersos (técnicas de clustering, heterogeneidad de datos espacialmente distribuidos, etc) y estrategias de tipo machine-learning para definir y validar modelos predictivos. Estos biomarcadores definidos en base al grupo retrospectivo servirán de base para un posterior estudio de validación prospectivo. También la evolución temporal de los biomarcadores puede permitir definir métricas de respuesta y/o predictores de recaída. En toda esta parte se utilizarán también técnicas estadísticas habituales de estudios de supervivencia (Kaplan-Mei), regresiones de Cox, correlaciones, c-índices, etc, además de otras estrategias como machine-learning y métodos evolutivos.

Se mantendrán reuniones periódicas con los clínicos involucrados en el proyecto a medida que se vayan identificando biomarcadores potencialmente válidos y durante todo el desarrollo del estudio especialmente a la hora de establecer conclusiones que sean utilizables en la práctica clínica.

Estrategias optimizadas de dosificación. En esta parte del proyecto se desarrollarán modelos de ecuaciones diferenciales acopladas similares a los de Sthiel y col (2015) pero ajustados usando datos reales, en particular los de la CMF. Posteriormente, se realizarán barridos en los parámetros terapéuticos para encontrar terapias óptimas como en trabajos anteriores del grupo de investigación (por ejemplo Henares-Molina y col, 2017 y referencias citadas en ese artículo). Se introducirán como restricciones del problema matemático las toxicidades de los tratamientos para diseñar, bien terapias más efectivas con la misma toxicidad o bien terapias menos tóxicas con la misma efectividad.

Plan de trabajo; Cronograma

Tareas	Año 1	Año 2	Año 3	> Año 4
Recogida de datos				
Desarrollo de biomarcadores				
Desarrollo de modelos matemáticos				
Validación de modelos matemáticos				
Validación de biomarcadores				
Estudios in-silico de optimización de				

tratamientos				
Diseño de estudios prospectivos				

Importancia del trabajo en oncología. En los últimos años ha habido un enorme interés en la utilización de modelos matemáticos de muy distintos tipos para responder a diversas cuestiones que se plantean en Oncología (Altrock et al, 2016; Michor y Beal, 2015; Pérez-García y col, 2016). Esto incluye la construcción de modelos matemáticos y técnicas de la matemática aplicada: ecuaciones diferenciales, métodos numéricos, optimización, etc., además del uso de distintos tipos de métodos estadísticos avanzados. Sin embargo los éxitos son aún muy limitados. El grupo colaborador en este proyecto del Mathematical Oncology Laboratory (MôLAB) de la Universidad de Castilla la Mancha (UCLM) es puntero en esa línea a nivel mundial, y gracias a su colaboración con la Universidad de Cádiz con este proyecto se pretende abordar problemas de enorme relevancia: la mejora de la clasificación de riesgo de pacientes de leucemias linfoblásticas agudas, la predicción de las recaídas y el diseño de estrategias terapéuticas óptimas que curen a más pacientes y/o reduzcan la toxicidad de los tratamientos.

Actividades difusión de resultados. Se realizarán publicaciones en revistas científicas indexadas en el JCR, asistencia y presentación de los resultados a congresos médicos nacionales e internacionales del máximo nivel. Se estará a disposición de la Universidad de Cádiz para colaborar en actividades de divulgación. Se publicarán notas de prensa de los resultados obtenidos de mayor relevancia. También se promocionará el estudio de las leucemias en la comunidad matemática por varias vías: (1) Mediante charlas divulgativas a estudiantes de los últimos cursos, especialmente en el marco del curso anual de "Oncología matemática" que se imparte en la UCLM con una nutrida participación de estudiantes de todo el país. (2) Mediante la coordinación de un proyecto europeo dedicado al tema que se está organizando junto con grupos de Francia, Alemania y otros países. (3) Mediante conferencias en foros matemáticos.

Bibliografía

- Altrock PM, Liu LL, Michor F (2016) *The mathematics of cancer: Integrating quantitative models*. Nature Reviews Cancer **15**: 730-745
- Clapp G, Levy D (2015) *Drug Discovery today: disease models, A review of mathematical models of leukemia and lymphoma* 16: 1-6.
- Dohner H et al (2010) *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. Blood. 115: 453-474.
- Derenyi I, Szollosi GJ (2017) *Hierarchical tissue organization as a general mechanism to limit the accumulation of somatic mutations*, Nature Communications **8**: 145545.
- Enciso J, Mendoza L, Pelayo R (2015) *Normal vs. Malignant hematopoiesis: the complexity of acute leukemia through systems biology*. Front. Genet. 6:290.
- Fuster JL (2014) *Current approach to relapsed acute lymphoblastic leukemia in children*. World Journal of Hematology **6**, 3(3), 49-70.
- Glauche I, et al (2012) *Therapy of chronic myeloid leukemia can benefit from the activation of stem cells: simulation studies of different treatment combinations*. British J. of Cancer. 106:1742-1752.
- He Q, Zhu J, Dingli D, Foo J, Leder K (2016) *Optimized treatment schedules for Chronic Myeloid Leukemia*, PLoS Computational Biology 12:e1005129.
- Henares-Molina A et al (2017) *Non-Standard Radiotherapy Fractionations Delay the Time to Malignant Transformation in Low-Grade Gliomas*. PLoS One 12, e0178552.
- Komarova N, et al (2009) *Combination of two but no three current targeted drugs can improve therapy of chronic myeloid leukemia*. PLoS ONE **4**:e4423.

- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. (1999) *The World Health Organisation classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues*. J Clin Oncol **1**:3835-49.
- Jayachandran D, Rundell AE, Hannemann RE, Vik TA, Ramkrishna D (2014) *Optimal Chemotherapy for Leukemia: A Model-Based Strategy for Individualized Treatment*. PLoS ONE 9:e109623
- Mahon F-X, et al (2010) *Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have ...: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial*. Lancet Oncol 11:1029–35.
- Michor F, Beal K, (2015) *Improving cancer treatment via Mathematical Modeling: Surmounting the Challenges is Worth the Effort*. Cell **163**:1059-1063.
- Noble SL et al (2010) *Using adaptive model predictive control to customize maintenance therapy chemotherapeutic dosing for childhood acute lymphoblastic leukemia*. J Theor Biol. 264:990-1002
- Ortuño FJ, Orfao A (2002) *Applicability of flow cytometry in the diagnosis and follow-up of acute leukemias*. Clinical Medicine **118**:423-436.
- Panetta JC, et al (2010) *Modeling mechanisms of in vivo variability in methotrexate accumulation and folate pathway inhibition in acute lymphoblastic leukemia cells*. PLoS Comput Biol. **6**:e1001019.
- Panetta JC, Evans WE, Cheok MH (2006) *Mechanistic mathematical modelling of mercaptopurine effects on cell cycle of human acute lymphoblastic leukaemia cells*. Br J Cancer 94:93-100.
- Pérez-García VM, Fitzpatrick S, Pérez LA, Pesic M, Schucht P, Arana E, Sánchez-Gómez P (2016) *Applied mathematics and nonlinear sciences in the war on cancer*. App Nonlin Sci **1**:423-436.
- Roeder I, et al. (2006) *Dynamic modeling of imatinib-treated chronic myeloid leukemia: functional insights and clinical implications*. Nature Medicine 12:1181–1184.
- SEHOP/PETHEMA Protocolos: *Tratamiento de la Leucemia Aguda Linfoblástica Aguda de Nuevo Diagnostico. Versión 2.0* (0.9.10.2014). *Tratamiento de la Leucemia Aguda Linfoblástica en Primera Recaída. Versión 1.0* (01.06.2016).
- Stiehl T et al (2014) *Clonal selection and therapy resistance in acute leukaemias: mathematical modelling explains proliferation patterns at diagnosis and relapse*. J R Soc Interf 11:20140079.
- Tang M et al (2012) *Selection pressure exerted by imatinib therapy leads to disparate outcomes of imatinib discontinuation trials*. Haematologica 97:1553-61
- Tomasetti C, Levy D (2010) *Role of symmetric and asymmetric division of stem cells in developing drug resistance*. PNAS 107:16766–71.
- Van Dongen JJ et al (2015) *Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies*. Blood. **125**:3996-4009.