



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

OSASUN ZIENTZIAK

**Etorkizuneko farmako-menua:
Burmuineko minbizidun
haurrentzako medikuntza
pertsonalizaturako plataforma
aurreratua**

*Oneka Perea Ariznabarreta,
Jason Linnebjerg Haw,
Jérémy Arieu-Bonnet,
Sandra Laternser, Bettina Kritzer,
Javad Nazarian,
Hanne Vibeke Hansen Marquart,
Signe Modvig Stausbøll,
Krister Wennerberg eta
René Mathiasen*

97-104 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.04.11>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



LAGUNTZAILEAK



Etorkizuneko farmako-menua: Burmuineko minbizidun haurrentzako medikuntza pertsonalizaturako plataforma aurreratua

Oneka Perea Ariznabarreta^{1,2}, Jason Linnebjerg Haw^{1,2}, Jérémy Arieu-Bonnet¹,
Sandra Laternser⁴, Bettina Kritzer⁴, Javad Nazarian⁴,
Hanne Vibeke Hansen Marquart³, Signe Modvig Stausbøll³,
Krister Wennerberg¹, René Mathiasen²

¹*Biotech Research & Innovation Centre (BRIC), University of Copenhagen*

²*Paediatric Oncology Research Laboratory (Bonkolab), Rigshospitalet*

³*Department of Clinical Immunology, Rigshospitalet*

⁴*DIPG/DMG Center, University Children's Hospital Zürich*

oneka.ariznabarreta@bric.ku.dk

Laburpena

Burmuineko tumoreak haur eta gazteen minbizi mota hilgarrienak dira eta gaitz heterogeneoen taldea osatzen dute. Egungo tratamenduak ez dira eraginkorrak, batez ere pronostiko okerreneko pazienteentzat. Heterogeneotasun intratumorala sendagai gidatuen garapenerako erronka nagusia da, terapietikiko ihesa eta berreritzea sustatzen baititu. Lan honek burmuineko minbizi pediatrikoen profil molekular eta farmakologikoa aztertzeko plataforma ezartzea du xede, terapietikiko erresistente diren minbizi-zelula amen karakterizazio fenotipiko eta funtzionalean zentratuz. Hala, epe-luzeko efikazia daukaten sendagai-konbinazio berriak aurkitzea espero da, medikuntza pertsonalizatuaren onarpen klinikoa berretsi eta burmuineko minbizidun haurren bizi-itzaropena hobetzeko asmotan.

Hitz gakoak: burmuineko minbizi pediatrikoa, heterogeneotasun intratumorala, burmuineko minbizi-zelula amak, medikuntza pertsonalizatu funtzionala

Abstract

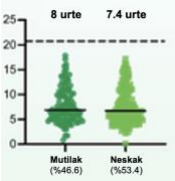
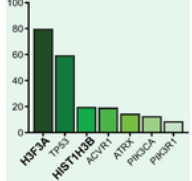
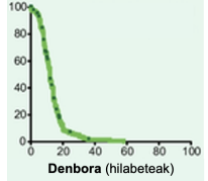
Brain tumours are the deadliest form of cancer in children, encompassing a heterogeneous group of diseases. Current standard-of-care is often ineffective, especially in poor prognosis subtypes. A major challenge for the translation of targeted drugs is intratumour heterogeneity, which drives therapeutic evasion and relapse. This work aims to establish a comprehensive platform for molecular and drug sensitivity profiling of pediatric brain cancers focusing on the phenotypic and functional characterization of treatment-resistant brain cancer stem cells. With this approach, we expect to find novel highly potent drug combinations that show long-term efficacy, supporting the clinical implementation of personalized medicines and improving survival of children with brain cancers.

Keywords: pediatric brain tumours, intratumour heterogeneity, brain cancer stem cells, functional precision medicine

1. Sarrera eta motibazioa

Nerbio-sistema zentralean minbizia (laburki NSZ minbizia) 20 urtetik beherako ume eta nerabeek pairatzen duten tumore ohikoena da, baita populazio talde honen ez-istripuzko heriotza kausa nagusia ere (Pollack et al., 2019). Historikoki talde beraren barnean sailkatu izan diren arren, paziente pediatrikoen NSZ minbiziek helduek garatzen dituzten tumoreekiko antzekotasun gutxi daukate eta askoz heterogeneoagoa den gaixotasun multzoa osatzen dute ezaugarri demografiko, kliniko, nahiz molekularrei dagokienez (Louis et al., 2021).

Ikerlan honek burmuin erdiguneko gliomak (ingelesezko *Diffuse Midline Glioma* edo DMG) ditu aztergai (**1. taula**). Aipaturikoek haur zein gazteengan pronostikorik gaiztoena duen NSZ minbizi klasea osatzen dute. Hain zuzen, diagnosi osteko batez-besteko bizi-itzaropenak ez du urte bete gainditzen. Gainontzeko NSZ minbiziekin alderatuz, DMGak ezin daitezke ebakuntza bidez erauzi, entzefalo enborrharekiko gertutasuna eta tumorearen hedapena direla eta (Karajannis et al., 2018). Ondorioz, erradioterapia da pazienteen tratamendu aukera bakarra. Dena den, efektibotasun mugatua izateaz aparte, erradioterapiaren toxikotasunak ageriko albo-kalteak eragiten ditu eta pazienteen bizi-kalitatea nabarmenki okertzen du (Pollack et al., 2019).

Agerpen adina	Kokapen anatomikoa	Onkogene gidariak	Bizi-itxaropena
			
7-8 urte	Garun-erdiguneko egiturak (zerebeloa, zubia, talamo, eta bizkarrezur muina)	H3.3/H3.1 K27M TP53, ACVR1, eta ATRX mutazioak PDGFRA anplifikazioa	6-12 hilabete

1. irudia. DMG pazienteen ezaugarri demografiko, kliniko, eta molekularrak (Ocasio et al., 2023).

DNAREN sekuentziaziorako metodoen aurrerapenek DMG kasuen ezaugarri molekularrak definitzeko aukera eskaini dute, eta pazienteen arteko aldeak agerian utzi. Kontzeptu honi heterogeneotasun intertumoral deritzo; alegia, DMG denak ez dira berdinak profil genetikoari dagokionez. DMG gehienek H3.1 edo H3.3 histonen 27. lisina metioninarekin dute mutaturik; fenomeno honek, kromatinaren estruktura tridimentsionalean eta transkripzioaren erregulazioan eragiten du (Khuong-Quang et al., 2012; the St. Jude Children’s Research Hospital, 2014). Oro har, kromatinaren egitura eta transkripzioa erregulatzen duten beste hainbat gene eraldatuta edo gain-adierazita daude, baita zelulen hazkuntza sustatzen duten seinaleztapen-bidezidorretako hartzaile eta faktore ugari ere (Findlay et al., 2022). Dena den, aipatu bezala, tumore bakoitza marka horien zenbait konbinazioz osatzen da (**1. taula**).

DMG kasuen berezitasun molekularrak ezagutzeak terapia gidatuen garapena ahalbidetu du. Terapia gidatuak pazienteen profil genetikoan oinarritzen diren medikuntza pertsonalizaturako modalitatea dira (ingelesezko *Genomic-based Precision Medicine*), zeinetan tratamenduak pazientearen tumore partikularren apartekotasunak dituen itu (Mueller et al., 2020). Esaterako, hazkunde errezeptoreek eragindako tumoreak *Avapritinib* izeneko farmakoarekin tratatzeko ahaleginetan ari dira, errezeptoreek bidalitako seinaleak oztopatuz minbiziaren garapena mugatzen baitu (Blueprint Medicines Corporation, 2024). Mundu mailan abiatutako saio kliniko ugariak metodologia hau aplikatzen dute minbiziaren kudeaketarako estrategia gisa; horren adibide dira Australiako *ZERO Childhood Cancer* eta Herbehereetako *Individualized Therapies for Children* programak (Langenberg et al., 2022; Lau et al., 2024).

Alabaina, gaur arte, terapia gidatu bakarrak ere ez du lortu DMG pazienteen biziraupena luzatzerik (Mueller et al., 2020). Izan ere, heterogeneotasun intratumorala da medikuntza pertsonalizatuaren erronka nagusia. Tumorea osatzen duten zelula indibidualak sekuentziaziaz askotariko ezaugarriak dituzten minbizi zelula populazioak deskubritu dira, minbizi beraren barnean elkarrekin bizi direnak. Alegia, DMGen hazkundera beren burua berriztatze gaitasuna daukaten minbizi-zelula amek (ingelesezko *Brain Cancer Stem Cell* edo BCSC) bultzatzen dute eta diferentziatuago dauden beste zelula populazio batzuen aitzindari dira, hala nola, oligodendrozito (OC) nahiz astrozito (AC) tankerako minbizi zelulena (Filbin et al., 2018; Liu et al., 2022; Sussman et al., 2024). Kasu kasu, BCSCen ezaugarri molekularrak era askotarikoak izan daitezke, baina funtzionalki, argi dago minbizien hastapena, oldarkortasuna, terapietikiko erresistentzia eta berrerritzea sustatzen dutela (Liu et al., 2022; Singh et al., 2004). Hori dela eta, itu nagusitzat BCSCak dituzten farmako-konbinazioek DMG minbizien aurkako tratamendu aukera erakargarria suposatzen dute.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Azken urteotan, medikuntza pertsonalizatu funtzionalak (ingelesezko *Functional Precision Medicine*) jaso du arreta, hots, minbiziaren profil genetikoak pazienteengandik eratorri eta laborategian hazitako zeluletan eginiko farmakoen baheketa analisiarekin integratzen dituen modalitate aurreratuak. Sistema honek terapia gidatuekiko duen abantaila nagusia zera da; itu

modura balia daitezkeen aldaketa genetiko nabarmenik ez daukaten pazienteak, zeinak kasuen gehiengoaren diren, ere profita daitezkeela (Letai et al., 2022).

Hainbat saiok frogatu dutenez, pazienteen zelulek *ex vivo* (euren inguru fisiologikotik kanpo, laborategiko hazkuntza medio artifizialean) farmakoekiko duten sentikortasuna ikertzea erabaki klinikoak hartzeko erraminta baliagarria da. Areago, baheketen emaitzetan oinarritutako terapien minbizidun pazienteek gaixotasunik gabe dirauten tarte luza dezakete (Acanda De La Rocha et al., 2024; Peterziel et al., 2022). Nolanahi ere, momentuz ezezagun da zein den *ex vivo* eginiko epe-laburreko probek pazienteen bizi errealeko eboluzioa aurreikusteko daukaten ahalmena. Era berean, farmakoekiko erantzuna determinatzeko erabilitako irakurketek ez dute tratamenduak heterogeneotasun intratumoralarengan eta bereziki, BCSCengan duen eragina aztertzeko abagunerik ematen (Dolman & Ekert, 2024).

Proiektu honen xedea NSZ minbizi pediatrikoentzako (batez ere DMGentzako) medikuntza pertsonalizatu funtzionalerako plataforma ezartzea da. Egungo heterogeneotasun intratumoralari eta minbizi-zelula amen oinarri molekularri buruzko ezagutza baliatuz, minbizi zelula populazio oro deuseztatzen duten farmako-konbinazio berriak proposatzea espero da, sendagarriak diren tratamenduak erdiesteko asmoz. Horretarako, ikerketaren muina hiru ataletan zatitu da:

- 1) Fluxu-zitometria bidezko NSZ minbizidun pazienteen biopsia zein horietatik eratorritako hazkuntza zelularretan aurkitzen diren BCSCen karakterizazioa.
- 2) BCSCen aurkako konbinaziozko tratamenduak identifikatzeko goi-mailako farmakoen baheketarako protokoloen garapena.
- 3) *Ex vivo* farmakoekiko sentikortasunak epe-luzera balioztatzea biologikoki doiak diren pazienteetatik eratorritako organoide- eta animalia-ereduetan.

3. Ikerketaren muina

3.1 Pazienteengandik eratorritako neuroesfera zelulen-hazkuntzak

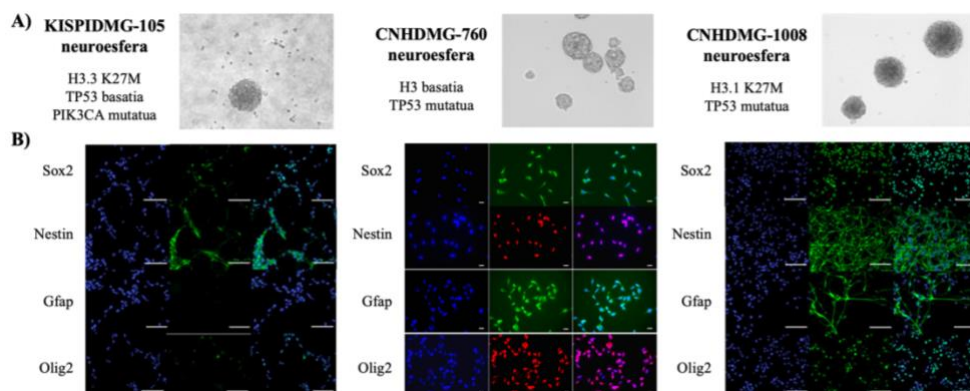
Historikoki minbiziaren ikerketan erabilitako bi dimentsiotako lerro zelularrek ez dute DMG tumoreen konplexutasuna behar bezala irudikatzen. Izan ere, heterogeneotasuna galtzeko joera dute, minbizi zelula doienak populazio motelagoen gainetik hazten baitira (Riedel et al., 2022). Bada, NSZko minbiziak ikertzeko eredu aproposena hiru dimentsiotako neuroesfera hazkuntza primarioak dira (pazienteen biopsietatik zuzenean deribatutakoak eta inolako aldaketa genetikorik gabeak). Lerro zelularrekin erkatuz, haien mantenturako hazkuntza medio bereziak heterogeneotasun intratumorala bermatzen du. Neuroesfera hazkuntzek pazientearen jatorrizko tumorearen ezaugarri gakoak eusten dietenez, terapiarekiko eboluzioa aztertzeko primerako baliabidea dira (Lago et al., 2023).

Hazkuntza zelular horiek ebakuntzan zehar harturiko laginetatik abiatuz sortzen dira. Lehenik, biopsia bisturi batekin mekanikoki txikitzen da eta segidan, digestio entzimatik bidez zelulen arteko matrizea desagiten da. Zelula bakanen soluzioa lortu eta gero, neuroesfera medio berezian (zeinak mota askotariko minbizi zelulen biziraupenerako beharrezko hazkuntza faktoreak eta bitaminak dituen) murgiltzen da. Prozedura gauzatu eta hurrengo asteetan ezinbestekoa da hazkuntza monitorizatu eta kontu handiz, zelulak mindu gabe, medioa berritzea (Chew et al., 2023).

Zelulek tamaina ertaineko esfera trinko eta gardenak eratzen dituztenean, neuroesferen hazkuntza finkatu dela kontsideratzen da eta bestelako froga funtzionaletan (adib., *ex vivo* farmakoen baheketan) parte hartzeko prest dago. Ezer baino lehen, ordea, premiazkoa da neuroesfera zelulen ezaupideak berretsi eta pazientearen jatorrizko laginarekin bat datozela egiaztatzea. Horretarako, biopsiaren eta neuroesferen mutazio profila alderatu eta immunofluoreszentzia bidez markatzaile zehatzen presentzia ziurtatzen da, baita neuroesferak heterogeneotasun intratumorala mantentzen dutela ere (**1. irudia**).

Neuroesferak, BCSCen funtzioak aztertzeko egokiak izan arren, tumorearen mikroingurunea falta dute. Horrenbestez, minbiziaren arkitektura, jarrera eta bilakaera gertuagotik jarraitu ahal izateko, hurrengo urratsa organoideak haztea da. Organoide-ereduak, minbizi zelulak haien inguruneko beste

zelula batzuekin (immunitate zelulekin, kasu) zelulen kanpoko matrizea betetzen duen makromolekula sarean murgilduz eraikitzen dira eta *ex vivo* baheketen emaitzak balioztatzeko funtsezko dira.

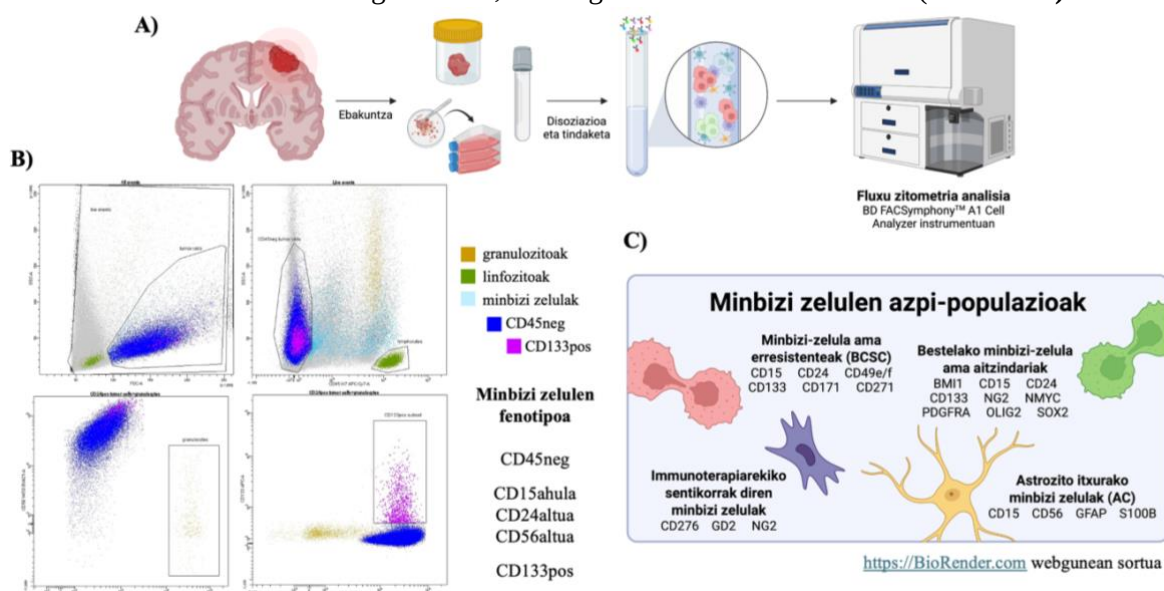


1. irudia. A) Profil genetiko ezberdineko 3 DMG pazienteetatik eratorritako neuroesferen hazkuntzak. B) Immunofluoreszentzia saiorako, neuroesferetatik erauzitako zelulak monogerezatan itsatsi eta BCSCen (Sox2 eta Nestin), AC (Gfap) eta OC minbizi zelulen (Olig2) markatzaileekin tindatu dira.

3.2 Minbizi-zelula amen detekzio eta karakterizaziorako fluxu-zitometria bidezko analisisa

Praktika klinikoan, fluxu-zitometria gaitz hematologikoak eragiten dituzten markatzaile zelularren adierazpena neurtzeko tresna nagusia da; odoleko minbiziak identifikatu eta tratamenduaren eraginkortasuna kontrolatzeko balio du. Nahiz eta ez den NSZeko minbizien diagnosirako erabiltzen, pazienteen pronostikoa eta terapiarekiko erresistentzia iragartzen duten markatzaileak seinaltzen, BCSC populazio batzuk isolatzen eta tumoreen immunitate infiltrazioa determinatzen lagundu du (Petrilli et al., 2022; Rozowsky et al., 2022; Singh et al., 2004).

Beraz, lan honetan, NSZ minbizidun pazienteen biopsia-laginen eta horietatik eratorritako eredu zelularren heterogeneotasun tumorala xedatzeko markatzaile panela ezarri da, minbizi zein immunitate zelulen azaleko antigenoak antzeman ditzaketen antigorputzez osatua. Biopsiak neuroesferak eratzeko protokolo berarekin prozesatu eta zelulak fluoreszentez etiketaturiko antigorputzekin inkubatzen dira. Zitometroaren laser izpiek zelulen lagina kitzikatzen dute eta horiei atxikitako antigorputzen arabera, fluoreszentzia seinale aldakorra igortzen da, ordenagailu bidez neur daitekeena (**2A. irudia**).



2. irudia. A) Fluxu-zitometria bidezko NSZ minbizi zelulen karakterizaziorako protokoloa. B) 11 urteko pazientearen biopsia. Minbizi zelulak (urdinez) immunitate zelulengandik (horiz/berdez) bereiz daitezke, tamaina eta antigenoen adierazpenaren arabera. CD133 markarentzako positibo den minbizi zelulen populazioak (arrosaz) BCSCen presentzia iradokitzen du. C) Panel berrirako markatzaileak.

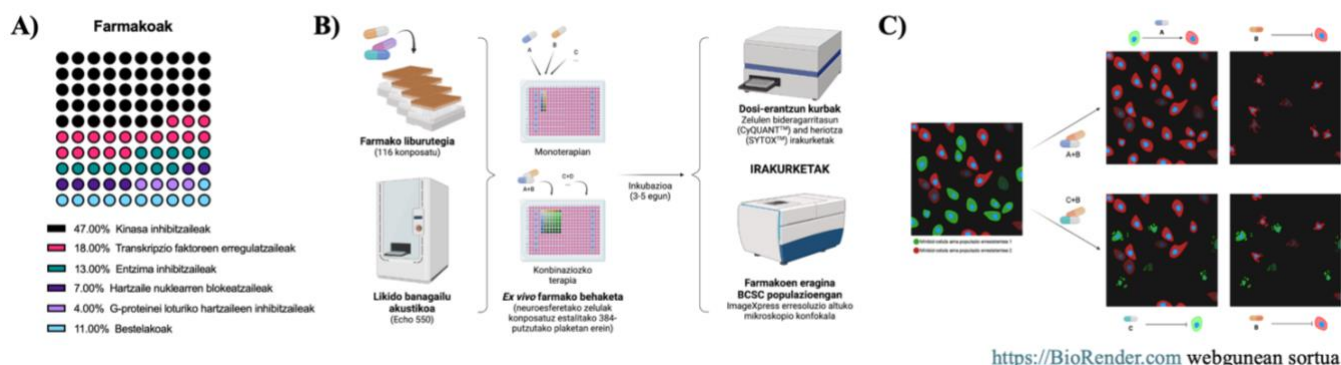
Behin-behineko analisietan pazienteen minbizi eta immunitate zelulak detektatu dira. NSZ minbizi zelulak immunitate zelulengandik bereizteko irizpide gorenak CD45 proteinaren adierazpena da (odol zelulen identifikaziorako azaleko proteina, minbizi zelulek aurkezten ez dutena). Orokorrean, tumore zelulek CD15 (aitzindari neuronalen marka), CD24, eta CD56 (azken biak BCSCen ustezko markak) adierazpen aldakorra erakusten dute. Honek pazienteen arteko heterogeneotasun intertumoralazpimarratzen du. Gainera, biopsietako batzuen tumore zelulen multzo txikiak CD133 adierazten du, zeina BCSCen marka klasiko kontsideratzen den. Gertaera isolatua izanagatik ere, aurkikuntza honek agerian uzten du minbizi-zelula ama populazio potentzialaren existentzia (**2B. irudia**).

Haatik, bestelako minbizi-zelula amen bereizgarri diren markatzaile biologikoen falta dela eta, lehen panel hau heterogeneotasun intratumorala erakusteko mugatua da. Horregatik, garrantzizkoak diren markatzaile haboro barneratzen dituen bi panel handiagotara eguneratu da. Azken honek BCSC, OC, eta AC diferentziazio maila ezberdinetako minbizi zelulak diskriminatzeko proteinak izateaz gain, tratamenduarekiko erresistentziarekin erlazionatu izan diren markatzaileak hartzen ditu kontuan, baita immunoterapia erantzuna aurreikusteko balio dutenak ere (**2C. irudia**). Une honetan, 16 molekula fluoreszente aldi berean irakurri ahal izateko, emisio espektroen gainjarpena urritzeta da helburua, zitometroaren parametroak optimizatu eta datozen biopsiak prozesatzeko abian ipiniz.

3.3 Sendagai-konbinazioen garapenerako farmakoen baheketa programa

Farmakoen baheketerako abiapuntua konposatu kimiko aproposen liburutegia biltzea da, publikoki eskuragarri dauden gene-ezabaketa baheketen emaitzetan oinarrituz. Analisi horiek minbiziaren zaurgarritasunei buruzko informazioa ematen dute, zein gene deuseztatuz eragin daitekeen tumore zelula jakinaren heriotza. Haurren Minbizi Ereduen Atlas (ingelesez *Childhood Cancer Model Atlas*) izeneko datu-basetik DMG pazienteetako neuroesferen zaurgarritasunak erauzi dira (Sun et al., 2023). Zaurgarritasun horiei zelulen %80ak (minbizi nahiz osasuntsuek) amankomunean dituztenak kendu zaizkie, biziraupenerako ezinbesteko kontsideratzen baitira (eta hortaz, ezin daitezke tratamenduen itu modura erabili). Era honetara, 165 zaurgarritasun bildu dira; 137ren aurkako farmakoak badaude.

Farmakoen selektibotasunari (dagokien itua soilik ala beste batzuk ere blokea ditzaketen) eta potentziari (efektua sortarazteko beharrezko dosia) jarraikiz, 116 konposatu dituen liburutegia osatu da. Konposatu klaseei dagokienez, %47.4 kinasa inhibitzaileak dira (hazkuntza errezeptoreen aktibazioa oztopatzen dute), %17.5 transkripzio faktore eta faktore epigenetikoen modulatzaileak (transkribapenaren erregulazioa sustatzen dute), %13.1 entzima inhibitzaileak, %7.3 hartzaile nuklearren blokeatzaileak, %3.6 G-proteinei loturiko hartzaileen inhibitzaileak, eta %10.9 bestelakoak. DMGen profil genetikoa kontuan hartuz (hazkunde seinaleztapen-bide ugariaren aktibazio iraunkorra eta kromatinaren egituraren aldaketa), farmako zerrendak badu zentzu biologikoa (**3A. irudia**).



3. irudia. A) Farmakoen liburutegiko konposatu klaseen banaketa. B) Baheketerako proposaturiko diseinu esperimentalak. C) Konbinaziozko tratamenduak diseinatzeko estrategia.

Farmakoen zerrendaren atzetik, bahetzeko erabiliko den sistemaren aukeraketa dator. Egun erabiltzen diren irakurketek ez dute heriotza zelularra zuzenki neurtzen. Farmakoekiko sentikortasun eta zitotoxikotasun parametroak kalkulatzeko, proiektu honek proba hobeak ezartzea du xede.

Lehendabizi, mono-terapia baheketa egingo da, konposatu indibidualek zelulen proliferazioan eta heriotzan duten eragina mikroskopio bitartez aztertuz (zelula hil ala bizien DNA selektiboki tinda dezaketen fluorofo-roekin). Ondoren, tumore zelulak akabatzeko eraginkortasun handiena daukaten farmakoekin bigarren baheketa egingo da, konposatuek minbizi zelula azpi-populazioengan duten inpaktuari begiratzeko (**3B. irudia**). Populazio horiek ikuskatzeko, fluxu-zitometriako emaitzek adierazitako markatzaile doienak aprobetxatuko dira. Hala, mota askotariko minbizi zelulak kaltetzen dituzten farmakoak konbinatzea da asmoa (**3C. irudia**). Amaitzeko, konbinaziozko terapien efektibotasuna epe-luzera mantentzen dela frogatuko da, neuroesfera eta organoideen hazkuntzak 28-egunez tratatuz eta euren eboluzioaren jarraipena eginez. Funtsean, intereseko tratamendurik topatuz gero, pazienteetatik eratorritako sagu-ereduetan ikertuko dira, entsegu klinikoetara pasa baino lehen.

4. Ondorioak

Orain arte, DMG pazienteen biopsia-laginetatik neuroesfera zelulen hazkuntzak erartortzea posible dela egiaztatu da, baita jatorrizko tumoreen ezaugarri kakoei eutsiz heterogenotasun intertumoral zein intratumoral aurkeztzen dutela ere. Fisiologikoki esanguratsuak diren *ex vivo* ereduak behar-beharrezkoak dira minbiziaren aurkako terapia berrien aurkikuntza prozesuan, pazienteen eritasunaren garapena, erantzuna, eta berragerpena aurreikusten baitute (Lago et al., 2023; Riedel et al., 2022).

Fluxu-zitometriak gaixotasun hematologikoen markatzaileen aniztasuna miatu eta gaitzen segimendua egiteko izugarrizko balio klinikoa dauka. Lan honetan, NSZeko minbizien biopsia-laginetan minbizi eta immunitate zelulak detektatzeko erabil daitekeela baieztatu da, elkar diskriminatzeko CD45 adierazpena baliatuz. Paziente bakoitzaren zelulek paneleko gainerako markatzaileen maila aldakorra dute, eta biopsia batzuen barnean CD133 zelula talde positibo isolatuak aurkitu dira. Honek, BCSC tankerako populazioen presentzia iragartzen du (Singh et al., 2004). Teknika hau pazienteen biopsiak eta neuroesferak molekularki karakterizatzeke abantailatsua den arren, ez da guztiz partziala. Alta, paneletan gehitzen diren markatzaileak literaturan oinarrituta daude, baina posible liteke zenbait minbizi populazio definitzeko garrantzizko diren beste proteina batzuen adierazpena galtzea (Rozowsky et al., 2022).

Bukatzeko, DMG neuroesferen zaurgarritasunak ustiatu dira biologikoki adierazgarriak diren farmakoen liburutegia eraikitzeke. Konposatu zerrenda *ex vivo* baheketak aurrera eramateko funtsa da, pazienteetatik eratorritako neuroesferen erantzunak ikertzeko parada eskaintzen baitu. Hala, neuroesferen profil molekularra (genetika, DNAREN metilazio patroiak, eta fluxu-zitometriaz zehaztutako fenotipoa) farmakoekiko sentikortasunekin erkatuz, erantzun klinikoa iragar ditzaketen biomarkatzaileak deskubritzea espero da. Hain zuzen, pazienteak funtzionalki doituriko terapia taldeetan sailkatzea litzateke jomuga.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunean, aipaturiko konposatuen zerrenda erabiliko da hainbat pazienteetatik eratorritako neuroesferen *ex vivo* sentikortasunak bahetzeko (**3. irudia**). Orotara minbizi zelulen bideragarritasuna nabarmen apaltzen duten hautagaiek heterogeneotasun intratumoralean duten efektua ulertzeko, fluxu-zitometriako panel hedatuaren arabera markatzaileak aplikatuko dira mikroskopio bidezko irakurketetan. Finean, BCSC populazio ugari batera ezereztatu ditzaketen sendagai-konbinazioak proposatzea da helburua, terapiarekiko erresistentziaren garapena ekidin eta pazienteen biziraupena luzatzeko gogoz.

Bestalde, markatzaile zehatzekin definituriko minbizi zelula populazioak fluxu-zitometriaz isolatu eta sekuentziatzea bidaliko dira, proteina mailako adierazleak RNA mailan bereizteko intentzioz. Honenbestez, farmakoekiko askotariko erantzunak dituzten zelulak taldeak konparatu eta erresistentzien jatorria azaltzea nahi da. Azkenik, sendagai-konbinazioen epe-luzeko efektibotasuna biologikoki esangurakoak diren organoide hazkuntzetan (baita animaliereduetan ere) balioztatuko dira, NSZ minbiziak dituzten haur eta gazteentzako tratamendu estrategia osagarriak garatu eta saio kliniko berriak abiarazteko itxaropenez.

6. Erreferentziak

- Acanda De La Rocha, A. M., Berlow, N. E., Fader, M., Coats, E. R., Saghira, C., Espinal, P. S., Galano, J., Khatib, Z., Abdella, H., Maher, O. M., Vorontsova, Y., Andrade-Feraud, C. M., Daccache, A., Jacome, A., Reis, V., Holcomb, B., Ghurani, Y., Rimblas, L., Guilarte, T. R., ... Azzam, D. J. (2024). Feasibility of functional precision medicine for guiding treatment of relapsed or refractory pediatric cancers. *Nature Medicine*, 30(4), 990–1000. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-02848-4>
- National Library of Medicine (NIH). (2024ko irailaren 23a). *A Study of Avapritinib in Pediatric Patients With Solid Tumors Dependent on KIT or PDGFRA Signaling*. Berreskuratua 2025eko otsailaren 14an, hurrengo estekatik: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04773782>
- Chew, N., Habarakada, D., Firestein, R., & Daniel, P. (2023). A protocol to establish cell line models from rare pediatric solid tumors. *STAR Protocols*, 4(3), 102537. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102537>
- Dolman, M. E. M., & Ekert, P. G. (2024). Functional precision medicine for pediatric cancers. *Nature Medicine*, 30(4), 940–941. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-02863-5>
- Filbin, M. G., Tirosh, I., Hovestadt, V., Shaw, M. L., Escalante, L. E., Mathewson, N. D., Neftel, C., Frank, N., Pelton, K., Hebert, C. M., Haberler, C., Yizhak, K., Gojo, J., Egervari, K., Mount, C., van Galen, P., Bonal, D. M., Nguyen, Q.-D., Beck, A., ... Suvà, M. L. (2018). Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq. *Science*, 360(6386), 331–335. <https://doi.org/10.1126/science.aao4750>
- Findlay, I. J., De Iuliis, G. N., Duchatel, R. J., Jackson, E. R., Vitanza, N. A., Cain, J. E., Waszak, S. M., & Dun, M. D. (2022). Pharmaco-proteogenomic profiling of pediatric diffuse midline glioma to inform future treatment strategies. *Oncogene*, 41(4), 461–475. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02102-y>
- Karajannis, M. A., Snuderl, M., Yeh, B. K., Walsh, M. F., Jain, R., Sahasrabudhe, N. A., & Wisoff, J. H. (2018). High-Grade Glioma, Including Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. In *Brain Tumors in Children*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43205-2_9
- Khuong-Quang, D.-A., Buczkowicz, P., Rakopoulos, P., Liu, X.-Y., Fontebasso, A. M., Bouffet, E., Bartels, U., Albrecht, S., Schwartzentruber, J., Letourneau, L., Bourgey, M., Bourque, G., Montpetit, A., Bourret, G., Lepage, P., Fleming, A., Lichter, P., Kool, M., von Deimling, A., ... Hawkins, C. (2012). K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathologica*, 124(3), 439–447. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-0998-0>
- Lago, C., Federico, A., Leva, G., Mack, N. L., Schwalm, B., Ballabio, C., Ganesello, M., Abballe, L., Giovannoni, I., Reddel, S., Rossi, S., Leone, N., Carai, A., Mastronuzzi, A., Bisio, A., Soldano, A., Quintarelli, C., Locatelli, F., Kool, M., ... Tiberi, L. (2023). Patient- and xenograft-derived organoids recapitulate pediatric brain tumor features and patient treatments. *EMBO Molecular Medicine*, 15(12). <https://doi.org/10.15252/emmm.202318199>
- Langenberg, K. P. S., Meister, M. T., Bakhuizen, J. J., Boer, J. M., van Eijkelenburg, N. K. A., Hulleman, E., Ilan, U., Looze, E. J., Dierselhuis, M. P., van der Lugt, J., Breunis, W., Schild, L. G., Ober, K., van Hooff, S. R., Scheijde-Vermeulen, M. A., Hiemcke-Jiwa, L. S., Flucke, U. E., Kranendonk, M. E. G., Wesseling, P., ... Molenaar, J. J. (2022). Implementation of paediatric precision oncology into clinical practice: The Individualized Therapies for Children with cancer program ‘iTHER.’ *European Journal of Cancer*, 175, 311–325. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2022.09.001>
- Lau, L. M. S., Khuong-Quang, D.-A., Mayoh, C., Wong, M., Barahona, P., Ajuyah, P., Senapati, A., Nagabushan, S., Sherstyuk, A., Altekoster, A.-K., Fuentes-Bolanos, N. A., Yeung, V., Sullivan, A., Omer, N., Diamond, Y., Jessop, S., Battaglia, L., Zhukova, N., Cui, L., ... Ziegler, D. S. (2024). Precision-guided treatment in high-risk pediatric cancers. *Nature Medicine*, 30(7), 1913–1922. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03044-0>
- Letai, A., Bhola, P., & Welm, A. L. (2022). Functional precision oncology: Testing tumors with drugs to identify vulnerabilities and novel combinations. *Cancer Cell*, 40(1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.12.004>
- Liu, I., Jiang, L., Samuelsson, E. R., Marco Salas, S., Beck, A., Hack, O. A., Jeong, D., Shaw, M. K. L., Englinger, B., LaBelle, J., Mire, H. M., Madlener, S., Mayr, L., Quezada, M. A., Trissal, M., Panditharatna, E., Ernst, K. J., Vogelzang, J., Gatesman, T. A., ... Filbin, M. G. (2022). The landscape of tumor cell states and spatial organization in H3-K27M mutant diffuse midline glioma across age and location. *Nature Genetics*, 54(12), 1881–1894. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01236-3>
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The

- 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- Mueller, T., Stucklin, A. S. G., Postlmayr, A., Metzger, S., Gerber, N., Kline, C., Grotzer, M., Nazarian, J., & Mueller, S. (2020). Advances in Targeted Therapies for Pediatric Brain Tumors. *Current Treatment Options in Neurology*, 22(12). <https://doi.org/10.1007/s11940-020-00651-3>
- Ocasio, J. K., Budd, K. M., Roach, J. T., Andrews, J. M., & Baker, S. J. (2023). Oncohistones and disrupted development in pediatric-type diffuse high-grade glioma. *Cancer and Metastasis Reviews*, 42(2), 367–388. <https://doi.org/10.1007/s10555-023-10105-2>
- Peterziel, H., Jamaladdin, N., ElHarouni, D., Gerloff, X. F., Herter, S., Fiesel, P., Berker, Y., Blattner-Johnson, M., Schramm, K., Jones, B. C., Reuss, D., Turunen, L., Friedenauer, A., Holland-Letz, T., Sill, M., Weiser, L., Previti, C., Balasubramanian, G., Gerber, N. U., ... Oehme, I. (2022). Drug sensitivity profiling of 3D tumor tissue cultures in the pediatric precision oncology program INFORM. *Npj Precision Oncology*, 6(1), 94. <https://doi.org/10.1038/s41698-022-00335-y>
- Petrilli, L. L., Fuoco, C., Palma, A., Pasquini, L., Pericoli, G., Grabovska, Y., Mackay, A., Rossi, S., Carcaboso, A. M., Carai, A., Mastronuzzi, A., Jones, C., Cesareni, G., Locatelli, F., & Vinci, M. (2022). Inter and intra-tumor heterogeneity of paediatric type diffuse high-grade gliomas revealed by single-cell mass cytometry. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1016343>
- Pollack, I. F., Agnihotri, S., & Broniscer, A. (2019). Childhood brain tumors: current management, biological insights, and future directions. *Journal of Neurosurgery. Pediatrics*, 23(3), 261–273. <https://doi.org/10.3171/2018.10.PEDS18377>
- Riedel, N. C., de Faria, F. W., Alfert, A., Bruder, J. M., & Kerl, K. (2022). Three-Dimensional Cell Culture Systems in Pediatric and Adult Brain Tumor Precision Medicine. *Cancers*, 14(23), 5972. <https://doi.org/10.3390/cancers14235972>
- Rozowsky, J. S., Meesters-Ensing, J. I., Lammers, J. A. S., Belle, M. L., Nierkens, S., Kranendonk, M. E. G., Kester, L. A., Calkoen, F. G., & van der Lugt, J. (2022). A Toolkit for Profiling the Immune Landscape of Pediatric Central Nervous System Malignancies. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.864423>
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., & Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396–401. <https://doi.org/10.1038/nature03128>
- Sun, C. X., Daniel, P., Bradshaw, G., Shi, H., Loi, M., Chew, N., Parackal, S., Tsui, V., Liang, Y., Koptyra, M., Adjumain, S., Sun, C., Chong, W. C., Fernando, D., Drinkwater, C., Tourchi, M., Habarakada, D., Sooraj, D., Carvalho, D., ... Firestein, R. (2023). Generation and multi-dimensional profiling of a childhood cancer cell line atlas defines new therapeutic opportunities. *Cancer Cell*, 41(4), 660–677. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.03.007>
- Sussman, J. H., Oldridge, D. A., Yu, W., Chen, C.-H., Zellmer, A. M., Rong, J., Parvaresh-Rizi, A., Thadi, A., Xu, J., Bandyopadhyay, S., Sun, Y., Wu, D., Hunter, C. E., Brosius, S., Ahn, K. J., Baxter, A. E., Koptyra, M. P., Vanguri, R. S., McGrory, S., ... Tan, K. (2024). A longitudinal single-cell and spatial multiomic atlas of pediatric high-grade glioma. *BioRxiv [Preprint]*. <https://doi.org/10.1101/2024.03.06.583588>
- the St. Jude Children’s Research Hospital. (2014). The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nature Genetics*, 46(5), 444–450. <https://doi.org/10.1038/ng.2938>

7. Eskerrak eta oharrak

Proiektu honek Oneka Perea Ariznabarretari doktoretza tesia burutzeko esleitu zaion “la Caixa” Fundazioaren diru-laguntzaren (LCF/BQ/EU24/12060063) eta René Mathiasenek jaso duen Danimarkako Haurren Minbizi Fundazioaren (*Børnecancerfonden*) finantzaketaren babesa izan ditu. Eskerrik beroena azaldu nahi diet Javad Nazarianen Züricheko DIPG/DMG zentroko ikerketa taldeari, gurekin partekatu dituzten neuroesfera ereduengatik, eta bereziki Sandra Laternser eta Bettina Kritzerri, hazkuntzak eratzeko helarazi didaten jakintzagatik; Jason Linnebjerg Haw eta Jérémy Arieu-Bonneti laborategian eskainitako laguntzagatik; René Mathiasen, Krister Wennerberg eta Signe Sautsbølli kolaborazio honen mamia martxan ipini eta proiektua aurrera eramateko baliabideak errazteagatik.