

INFORME FINAL

	Página
0. RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. PARTE 1.- NEUROBLASTOMA	5
2.1. Hipótesis y objetivos	5
2.2. Parte clínica: pacientes neuroblastoma	6
2.2.1. Metodología	6
2.2.2. Resultados	10
2.3. Parte preclínica: modelo murino de neuroblastoma	15
2.3.1. Metodología	15
2.3.2. Resultados	19
3. PARTE 2.- MEDULOBLASTOMA	36
3.1. Hipótesis y objetivos	36
3.2. Metodología	37
3.2.1. Objetivo específico 1	37
3.2.2. Objetivo específico 2	40
3.2.3. Objetivo específico 3	42
3.3. Resultados	42
4. PARTE 3.- SUPERVIVIENTES DE CÁNCER PEDIÁTRICO	45
4.1. Hipótesis y objetivos	45
4.2. Metodología	45
4.3. Resultados	47
5. MEMORIA ECONÓMICA	49
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
8. FIRMAS	51

1. RESUMEN

El Proyecto financiado por la “I Beca de Investigación Mujeres Que Corren Unoentreciemil” lleva por título: “¿Por qué el ejercicio puede ayudar a curar mejor el cáncer infantil? Una visión integrada con pacientes con neuroblastoma y modelo animal”. En adultos con cáncer el ejercicio físico atenúa los efectos secundarios derivados del tratamiento o del propio tumor, ayudando incluso a enlentecer la progresión del mismo, pero las evidencias son aún escasas en cáncer pediátrico, sobre todo en tumores sólidos. Nuestro proyecto se articula principalmente en tres sub-estudios: (i) determinar los efectos de un programa de ejercicio intrahospitalario en la capacidad funcional y el bienestar de niños en fase de tratamiento frente a dos tumores sólidos especialmente agresivos y asociados con importantes secuelas, neuroblastoma y meduloblastoma; (ii) estudiar el estado de salud general de supervivientes de cáncer infantil frente a sus controles sanos (analizando además en el caso de los tumores sólidos los posibles beneficios de haber realizado previamente ejercicio durante el tratamiento); y (iii) en un modelo preclínico (murino) de neuroblastoma, estudiar los mecanismos biológicos subyacentes a los potenciales efectos del ejercicio sobre el desarrollo del tumor y la supervivencia al mismo (con análisis moleculares e inmunológicos). Trabajamos con cuatro hospitales de Madrid (Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Hospital Universitario Gregorio Marañón, Hospital Universitario La Paz y Hospital Universitario 12 de Octubre), y hemos recibido el 1er *Premio Liberbank* de Investigación en Medicina Deportiva 2018 en reconocimiento a nuestra labor investigadora en el cáncer pediátrico, además de haber publicado cuatro artículos científicos, y de divulgar nuestro trabajo y agradecimiento a la Fundación en medios de difusión.

A continuación, mostramos a distintos participantes del proyecto de investigación:



2. INTRODUCCIÓN

El Proyecto financiado por la “I Beca de Investigación Mujeres Que Corren Unoentreciemil” lleva por título: “¿Por qué el ejercicio puede ayudar a curar mejor el cáncer infantil? Una visión integrada con pacientes con neuroblastoma y modelo animal”.

Como hemos indicado en las memorias de seguimiento anteriores, durante los seis meses iniciales del proyecto, tuvimos dificultades para reclutar a pacientes pediátricos con neuroblastoma debido a la ausencia de nuevos diagnósticos en el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Por ello, para aumentar el tamaño de la muestra, se acordó que el reclutamiento incorporase también a pacientes procedentes del Hospital Universitario La Paz de Madrid. Pese a su incorporación, en estos hospitales no se dieron nuevos casos de neuroblastoma que cumplieran con los criterios de inclusión establecidos en este proyecto especificados en secciones posteriores.

Otra de las partes que constituye este proyecto está focalizada en analizar los efectos del ejercicio físico en modelo murino de neuroblastoma. Ésta ha supuesto un gran reto debido a la dificultad inherente al modelo utilizado. Sin embargo, hemos hecho grandes avances que sientan la base para futuras investigaciones que permitirán profundizar en el conocimiento del neuroblastoma.

Consideramos también nuevas opciones para aumentar la calidad del proyecto, incorporando pacientes con otros tipos de cáncer. Basándonos en investigaciones previas realizadas por nuestro grupo de investigación, concluimos que los pacientes con meduloblastoma (tumor cerebral maligno pediátrico más frecuente, con una incidencia de 1/200.000 niños <15 años) podrían beneficiarse de los efectos que conlleva la realización de ejercicio físico. Por ello, se amplió el protocolo inicial de investigación a través de la incorporación de pacientes con meduloblastoma, los cuales procedieron del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Hospital Universitario La Paz, Hospital General Universitario Gregorio Marañón y Hospital Universitario 12 de Octubre. Al igual que en el caso de los pacientes con neuroblastoma, el número de pacientes con meduloblastoma que pudieron ser reclutados fue limitado.

Una tercera parte del proyecto estuvo centrada en supervivientes de cáncer pediátrico. Las cifras de supervivencia a 5 años en esta población alcanzan el 83%. Sin embargo, este logro trae consigo un incremento de los efectos adversos de los tratamientos oncológicos y del propio cáncer padecido en años anteriores, deteriorando su calidad de vida. Por lo tanto, existe la necesidad de analizar el estado de salud general y, en particular, el estado funcional que poseen dichos supervivientes tras varios años de padecer la enfermedad.

En la primera memoria semestral consideramos que, atender a este objetivo aportaría información importante sobre esta población e incrementaría la calidad del proyecto. Esta parte se realizó en el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús y en la Universidad Europea de Madrid. Como consecuencia del trabajo desarrollado, se han publicado cuatro artículos científicos en revistas de impacto y se ha recibido el primer galardón en los Premios Nacionales de Investigación en Medicina del Deporte Liberbank 2018 (Oviedo, Asturias).

Durante el último semestre, la situación social y sanitaria que vivimos en relación con el COVID-19 tuvo un gran impacto sobre el desarrollo del proyecto, tanto en la parte clínica con pacientes pediátricos con neuroblastoma y meduloblastoma como en la parte preclínica centrada en ratones con neuroblastoma. Siguiendo las indicaciones publicadas en el Boletín Oficial del Estado (BOE, marzo de 2020) sobre las medidas urgentes a adoptar para hacer frente al COVID-19 y, en concreto, las medidas de gestión en materia sanitaria, cesamos de inmediato los procedimientos experimentales, como son:

- La intervención de ejercicio físico y asesoramiento en salud, a pesar de que dos pacientes con meduloblastoma estaban participando en el estudio.
- La inclusión de nuevos participantes.
- La realización de las evaluaciones asociadas con la valoración de la capacidad física y funcional de los pacientes y las mediciones moleculares.
- La adquisición de información clínica de los participantes en el estudio, la cual sólo puede tener lugar dentro de las instalaciones del hospital.
- La intervención con los ratones con neuroblastoma, teniendo que proceder a su sacrificio inmediato por requerimientos del animalario.

A las citadas circunstancias se suma el hecho de que algunos miembros del equipo de investigación son personal sanitario, por lo que todos sus esfuerzos fueron dirigidos a frenar la pandemia por COVID-19. En consecuencia, no se pudo volver a retomar el reclutamiento de nuevos pacientes ni iniciar una nueva colonia de ratones.

No obstante, aunque este proyecto finalice, seguiremos trabajando para aumentar el tamaño de las muestras de estudio y para que los resultados obtenidos en este proyecto puedan ser publicados en revistas científicas y difundidos en distintos medios. Nuestra finalidad es que los pacientes con neuroblastoma y meduloblastoma, y los supervivientes de cáncer pediátrico puedan beneficiarse de la práctica del ejercicio físico tanto durante el tratamiento contra el cáncer como una vez que finalizan el mismo.

Durante esta memoria, explicaremos los resultados obtenidos desde el inicio del proyecto hasta su finalización, dividiéndolos en los siguientes apartados:

1. Parte 1.- Neuroblastoma, considerando la parte clínica en pacientes como la parte preclínica en modelo murino con la misma enfermedad.
2. Parte 2.- Meduloblastoma, en pacientes pediátricos.
3. Parte 3.- Supervivientes de cáncer pediátrico.
4. Memoria económica.
5. Cómo abordar las fases posteriores del proyecto.

2. PARTE 1.- NEUROBLASTOMA

2.1. Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

La realización de un programa de ejercicio físico en pacientes pediátricos y en ratones con neuroblastoma podría resultar una herramienta complementaria al tratamiento farmacológico usado contra esta enfermedad. Consideramos que el ejercicio mejorará la fuerza muscular, y la capacidad funcional y cardiorrespiratoria, lo cual influirá positivamente sobre la calidad de vida del paciente. Además, el ejercicio también podría favorecer la respuesta inmune contra el tumor y crear un cierto ambiente anti-inflamatorio que mejore la evolución clínica de la enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los posibles efectos de un programa de ejercicio físico de 8 semanas de duración sobre la respuesta fisiológica, inmune y tumoral en pacientes pediátricos con neuroblastoma y en un modelo murino (TH-MYCN) con la misma enfermedad.

Objetivos específicos

1. Evaluar los posibles efectos de un programa supervisado de ejercicio físico (combinando ejercicios aeróbicos, de fuerza dinámica muscular y específicos de los músculos respiratorios) realizado en un ambiente intrahospitalario por pacientes pediátricos con neuroblastoma, sobre las siguientes variables: calidad de vida, capacidad cardiorrespiratoria y funcional, fuerza muscular dinámica y de los músculos respiratorios, composición corporal y niveles de actividad física (*variables primarias*); y sobre marcadores inmunológicos (recuento de leucocitos, monocitos y linfocitos, y subpoblaciones linfocitarias y células dendríticas) y de inflamación (perfil en sangre de citoquinas proinflamatorias o antiinflamatorias y/o moduladoras del sistema inmune a

nivel local y sistémico) (*variables secundarias*). Establecer en qué medida se mantienen los efectos obtenidos con el entrenamiento tras un periodo de inactividad de 8 semanas.

2. En ratón TH-MYCN, estudiar cómo un programa de ejercicio físico (incluyendo ejercicios de fuerza y aeróbicos) incide sobre la progresión del tumor (marcadores biológicos) y la respuesta inmune antitumoral, tanto a nivel local como sistémico.

2.2. Parte clínica: pacientes con neuroblastoma

2.2.1. Metodología

Pacientes

Los pacientes fueron reclutados mediante cribado de los registros médicos del departamento de Oncología y Hematología del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús y del Hospital Universitario La Paz. Fueron candidatos a participar en el estudio todos los pacientes de ambos sexos que cumplían con los siguientes criterios de inclusión: a) edad comprendida entre 4 y 18 años, b) diagnosticados con neuroblastoma, c) sin presentar contraindicaciones médicas incompatibles con la práctica de ejercicio físico, d) comprensión de la lengua española, y e) entrega/firma del consentimiento informado por los padres/tutores responsables del paciente. Los criterios de exclusión en este estudio fueron: a) paciente ingresado en la Unidad de Vigilancia Intensiva (UVI), e b) indisposición o malestar del paciente. El protocolo del estudio se adhirió a las directrices de ética de la Declaración de Helsinki.

Diseño de estudio

Se trató de un estudio longitudinal de intervención, dividido en tres grandes fases: (i) pre-intervención (2 semanas), (ii) intervención (8 semanas), y (iii) post-intervención (8 semanas) (ver **Figura 1**).

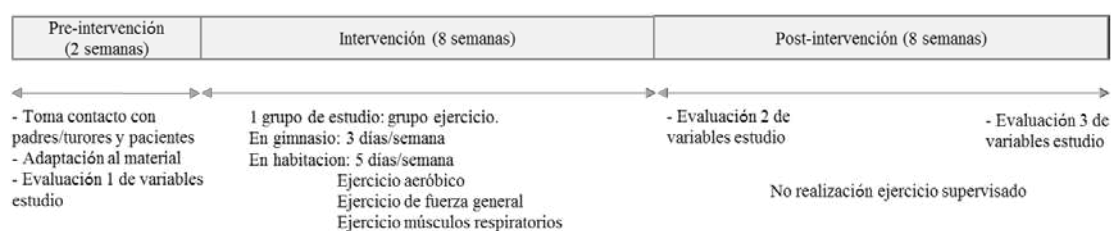


Figura 1. Diseño experimental del estudio en pacientes pediátricos con neuroblastoma.

(i) Fase de pre-intervención

Durante esta fase, contactamos con los padres/tutores y con los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión para explicarles el estudio, y le proporcionamos el consentimiento

informado. Con los que aceptaron a participar se realizó: (a) la recogida de muestras de sangre, para obtener los valores basales de las variables inflamatorias e inmunes; (b) la familiarización con el material utilizado en el estudio, con el objetivo de aprender su correcto uso, minimizando así el error en las evaluaciones; y (c) la medición basal de las variables de estudio (evaluación 1 de las variables de estudio, **Figura 1**), para conocer el estado físico y psicológico del paciente.

(ii) Fase de intervención

El programa de ejercicio tuvo una duración de 8 semanas, siendo realizado en el gimnasio del hospital (3 días/semana) o en la habitación del paciente (5 días/semana) dependiendo de sus necesidades. Se trató de un programa progresivo, supervisado e individualizado, siguiendo las normas de las instituciones de referencia para entrenamiento aeróbico³ y de fuerza en niños y adolescentes⁴, y también basado en nuestra experiencia previa². Cada sesión de ejercicio duró ~60–90 minutos y estuvo formada por:

- a) Un periodo de acondicionamiento (10 minutos), formado por un calentamiento general con movilizaciones articulares dinámicas.
- b) Una parte principal, formada por:
 - b.1) Ejercicio aeróbico (10–30 minutos), donde la carga se incrementó gradualmente hasta alcanzar el primer umbral ventilatorio, utilizando bicicleta o manivela de brazos (en función del estado del paciente).
 - b.2) Ejercicios de fuerza (30 minutos) a modo de circuito, integrado por 5 ejercicios (prensa de pecho y piernas, dorsal remo y alto, y extensión rodillas) realizados contra resistencia y con un amplio rango de movilidad articular. Se hicieron 3 series de 12–15 repeticiones, con un descanso entre repeticiones de 20 segundos y entre series de 2 minutos, a una intensidad del 50% de 1 repetición máxima (RM) la cual se estimó a través de un test de 5 RM para cada grupo muscular trabajado.
 - b.3) Ejercicios para el entrenamiento de los músculos respiratorios (5 días/semana, 2 de ellos de forma auto-administrada), basado en 2 series de 30 inspiraciones + 30 espiraciones utilizando un dispositivo específico de entrenamiento de la musculatura respiratoria (Power breathe, Biocorp Europa, Andoain, Basque Country, España). La intensidad de la carga correspondía al 40% durante las semanas 1 y 2, y al 50% durante las semanas 3 y 4 de la presión inspiratoria ($PI_{m\acute{a}x}$) y espiratoria máximas ($PE_{m\acute{a}x}$); tras esas 4 semanas se reajustaron las cargas trabajando hasta el final de la intervención al 40% de la $PI_{m\acute{a}x}$ y $PE_{m\acute{a}x}$.
- c) Un periodo de vuelta a la calma (10 minutos), con estiramientos y ejercicios de

flexibilidad, controlando el descenso de pulsaciones y el estado general del paciente.

(iii) Fase post-intervención

Al finalizar las 8 semanas de ejercicio, se realizó una segunda medición de las variables físicas y psicológicas (durante 1 semana) para conocer el efecto de la intervención sobre la evolución del paciente (evaluación 2 de las variables de estudio, **Figura 1**). Cuarenta y ocho horas después de las evaluaciones físicas se extrajo sangre periférica para la evaluación de los parámetros inmunológicos e inflamatorios. Además, en esta fase, los pacientes paraban de entrenar durante 8 semanas con el objetivo de conocer la duración del efecto del ejercicio producido durante la intervención. Finalizado este periodo, se volvió a repetir la evaluación de las variables de estudio, completando así la recogida de datos (evaluación 3 de las variables de estudio, **Figura 1**).

Medición de las variables de estudio

Calidad de vida

Tanto los pacientes como sus padres/tutores completaron el Cuestionario sobre Calidad de Vida Pediátrica PedsQL (*“The Spanish Version of Health-Related Quality of Life Questionnaire”*, PedsQL™ 3.0), cuyo módulo general consta de 23 ítems distribuidos en cuatro escalas: funcionamiento físico (8 ítems), emocional (5 ítems), social (5 ítems) y escolar (5 ítems). También utilizamos el módulo para pacientes oncológicos (*“The Pediatric Quality of Life Inventory Acute Cancer Modul”*, PedsQL 3.0), <http://pedsql.org/>, el cual evalúa las siguientes dimensiones: dolor y molestias, presencia de náuseas, ansiedad previa, ansiedad por tratamientos, preocupaciones, problemas cognitivos, percepción del aspecto físico y comunicación⁵.

Capacidad cardiorrespiratoria

Los parámetros ergoespirométricos fueron medidos con un ergoespirómetro (Vmax 29C; SensorMedics Corp., Yorba Linda, California) y en cicloergómetro pediátrico (Ergoline, Sanro Electromedicina, España), aplicando el siguiente protocolo incremental: comienzo con 0 watos, incremento de carga de 1 watio cada 30 segundos (6 watos/minuto) y con una cadencia de pedaleo entre 40–60 revoluciones por minuto (rpm). Cuando el estado físico del paciente no permitió el uso del cicloergómetro de piernas, se utilizó el ergómetro de brazos (Monark Rehab Trainer model 881E, Monark, Varberg, Suiza) aplicando el siguiente protocolo: comienzo con 0 watos, incrementando 5 watos cada 30 segundos mientras la cadencia se mantenía constante a 50 rpm. Durante la prueba se registraron, respiración a respiración, los siguientes parámetros de intercambio gaseoso: consumo de oxígeno (VO) pico (VO_{2pico}), VO₂ en el umbral anaerobio, ventilación pico (VE_{pico}), el consumo de dióxido de

carbono (VCO_2), equivalente de oxígeno y de dióxido de carbono en el umbral anaerobio, y la presión parcial de oxígeno y de dióxido de carbono basal, en el umbral anaerobio y en el pico del esfuerzo.

Los criterios de finalización de la prueba fueron: la interrupción voluntaria por parte del paciente, incapacidad de mantener una cadencia ≥ 40 rpm en cicloergómetro de piernas o ≥ 30 rpm en ergómetro de brazos, o cuando apareciesen signos o síntomas indicativos de interrumpir una ergometría (dolor torácico, cambios en el electrocardiograma sugerentes de problema cardiológico, disnea severa desproporcionada al esfuerzo, taquiarritmias, desaturación [Saturación de $O_2 < 85\%$], o síntomas del sistema nervioso central como ataxia o temblores).

Fuerza muscular dinámica

Empleamos máquinas de fuerza pediátricas (Strive Inc., PA, EE.UU.) con el objetivo de determinar el nivel de fuerza muscular en miembros inferiores, pectoral y dorsal, aplicando el test de 5 RM⁶. En este test, los pacientes realizan primero un calentamiento que consiste en la aplicación de 3 series al 50%, 70% y 90% del test de 5 RM percibido (15, 12 y 10 repeticiones mínimas, respectivamente), descansando 1 minuto entre las series. Después de dicho calentamiento y tras 2 minutos de descanso, se realiza otra serie al 100–105%, dependiendo del esfuerzo empleado en la última serie de calentamiento. Las repeticiones válidas serán aquellas que se realizan en un rango de movimiento completo.

Fuerza de los músculos inspiratorios y espiratorios

Con el paciente sentado y con un clip de nariz, determinamos la $PI_{m\acute{a}x}$ y la $PE_{m\acute{a}x}$ con un medidor de presión en la boca (Micro Medical Inc., Chatham, Kent, Reino Unido) a través de la realización de 3 inspiraciones y 3 espiraciones máximas, con periodos de descanso ≥ 1 minuto entre cada maniobra. Registramos el valor máximo obtenido y que variase menos del 20% ya que, considerar una menor variabilidad no puede garantizar que se hayan hecho esfuerzos máximos⁷.

Capacidad funcional

- Test de la marcha de 2 minutos. En un pasillo de 15 metros de longitud (7,62 metros ida y 7,62 metros vuelta) y sin pendiente, con giros de 180° en cada extremo, el paciente camina lo más rápido posible sin correr. Se anotó la distancia recorrida a los 2 minutos.
- Test de agarre de la mano dominante o *Hand Grip Strength test*. Utilizando un dinamómetro electrónico portátil, se midió 3 veces la fuerza de agarre de la mano dominante. Calculamos el promedio como el valor máximo de la fuerza de agarre.

- Test de flexibilidad o *Sit and reach*. Con esta prueba, medimos la flexibilidad de la zona lumbar, de los extensores de la cadera y de los músculos flexores de la rodilla, utilizando un flexómetro en cuya parte superior se dispone de un listón y una cinta métrica. El paciente se sienta con las piernas rectas, tocando el flexómetro con la planta de los pies. Se mide la distancia máxima (en centímetros) que el paciente logra alcanzar con la punta de sus dedos después de realizar una flexión frontal, punto en el cual debe mantenerse durante un par de segundos. Los pacientes realizaron 2 veces el test, anotando el mejor de ambos intentos.

Índice de masa corporal

Calculado como la ratio entre peso (kg) y talla (m)², determinados con una balanza y un tallímetro, respectivamente (Ano Sayol SL, Barcelona, España).

Niveles de actividad física

Fueron medidos durante 7 días utilizando un acelerómetro triaxial (modelo Actigraph GT3X; Manufacturing Technology Inc., Fort Walton Beach, Florida), programado con *epochs* de 15 segundos y 30 Hz, y considerándose válidas las mediciones realizadas con un mínimo de 10 horas/día registradas durante 5 días (2 festivos y 3 laborables). Analizamos los datos con el programa ActiLife6 (Actigraph) utilizando puntos de corte previamente definidos⁸. Las variables de estudio se expresaron como intensidad media (en *counts*·min⁻¹).

Marcadores inmunológicos

En sangre venosa periférica, medición de leucocitos, monocitos y linfocitos en un analizador hematológico, y las subpoblaciones linfocitarias (linfocitos T, B, T reguladores, CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺) y células dendríticas mediante citometría de flujo. El número de células de cada subpoblación linfocitaria se obtiene multiplicando los leucocitos totales por el porcentaje de cada subpoblación.

Marcadores inflamatorios

Con el sistema Bio-Plex y siguiendo el procedimiento recomendado por los fabricantes, se cuantifican en suero las siguientes citoquinas: IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, PDGF, TGF- β , TNF- α .

2.2.2. Resultados

Con el objetivo de poner en marcha el proyecto de investigación, a fechas de 15 de Marzo y de 23 de Junio del 2018, enviamos información detallada del proyecto al Comité de Ética

de la Investigación con Medicamentos del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús y del Hospital Universitario La Paz, respectivamente. Obtuvimos la aprobación por parte de ambos Comités los días 26 de Junio en el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús y el 8 de Octubre de 2018 en el Hospital Universitario La Paz, después de responder a las modificaciones solicitadas.

Pese a los esfuerzos orientados a incrementar el tamaño muestral, sólo un paciente fue diagnosticado de neuroblastoma durante la duración total del estudio. A continuación, explicaremos de manera detallada la intervención realizada en el citado paciente.

Paciente

El paciente fue un niño de 4 años de edad diagnosticado de un neuroblastoma metastásico sin amplificación del gen MYCN en Mayo del 2019, en el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Después de comprobar que cumplía los criterios de inclusión e, a los padres y al paciente se le aportó información sobre el estudio y se les ofreció participar. Estos aceptaron, entregando el consentimiento informado firmado. El paciente recibió quimioterapia como terapia de tratamiento farmacológico, previa cirugía para la extirpación del tumor.

Intervención realizada

Durante la fase de pre-intervención (evaluación 1, **Figura 1**), las pruebas físicas que pudieron ser realizadas en este paciente fueron la prueba de esfuerzo, el test de *hand grip*, el test de fuerza de 5 RM y el test de flexibilidad, además de las medidas antropométricas (peso, talla e IMC). Debido a la temprana edad del paciente (4 años), no pudimos evaluar la $PI_{m\acute{a}x}$ y la $PE_{m\acute{a}x}$ por dificultades en la coordinación de los movimientos respiratorios necesarios para realizar la prueba. Tampoco evaluamos los niveles de actividad física realizados por el paciente al estar ingresado en ambos momentos de la evaluación. No pudo recogerse la muestra de sangre fresca periférica del paciente por dificultades en su extracción, por lo que las variables inmunes e inflamatorias no pudieron ser realizadas. Esta fase tuvo una duración total de 2 semanas.

En la fase de intervención se aplicó el programa de ejercicio en el gimnasio pediátrico del Hospital Universitario Niño Jesús y en la habitación del paciente hospitalizado (3 ó 5 sesiones/semana, respectivamente) durante la fase de quimioterapia de inducción, que tuvo una duración de 8 semanas. El programa de ejercicio constó de un entrenamiento aeróbico, de fuerza y respiratorio, integrado por sesiones de ~1 hora de duración y donde la intensidad estaba planificada en función de la semana de entrenamiento (ver **Tabla 1** para una descripción pormenorizada de las cargas de entrenamiento).

- El entrenamiento aeróbico fue tanto continuo (de intensidad moderada y de 20–25 minutos duración) como de alta intensidad (*High Interval Intensive Training* o HIIT).

Incorporamos el HIIT en la parte aeróbica de los entrenamientos dado que aporta grandes mejoras a la capacidad cardiorrespiratoria de los sujetos⁹. Las sesiones de HIIT (de 2 a 3 veces por semana) fueron aplicadas a una intensidad de 70–90% de la frecuencia cardíaca máxima y al 100–130% de la velocidad aeróbica máxima⁹. En cada sesión, se realizaron de 2 a 3 series de 6–8 repeticiones (duración de la repetición: 10–40 segundos) con recuperación 1:1 entre repeticiones y de 3 minutos entre series⁹.

- La fuerza muscular se trabajó 3 días/semana, aplicando 5 ejercicios (press de banca, extensión de piernas, polea al pecho, remo y prensa de pierna) realizados contra resistencia y con un amplio rango de movilidad articular. La primera semana, que correspondió al periodo de adaptación anatómica, se hicieron 2 series, progresando a 2-3 series a lo largo de las 8 semanas posteriores al 60–80% de 1 RM. El número de repeticiones efectuadas no superó la mitad de las máximas realizables por el paciente, con el objetivo de aportar un estímulo de mayor calidad, minimizar la fatiga y acelerar la recuperación después del entrenamiento de fuerza¹⁰. De hecho, mayores incrementos del grado de esfuerzo dentro de la serie no producen mayores ganancias, e incluso este exceso de repeticiones podría producir descensos en el rendimiento neuromuscular¹¹, especialmente en niños cuyo control motor puede verse afectado al realizar un número elevado de repeticiones.
- Los músculos inspiratorios se entrenaron 5 veces/semana, de 2 series de 30 inspiraciones a través de un dispositivo específico (Power Breathe, Biocorp Europa; Andoain, España) y contra una resistencia del 40% de la $PI_{máx}$ las 4 primeras semanas y del 50% las últimas 4 semanas, con reevaluación de la $PI_{máx}$ en la semana 4.

Las sesiones en la habitación fueron planificadas considerando las realizadas en el gimnasio, incluyendo la parte aeróbica, en la que se utilizó bicicleta estática o manivela portátil, y la parte de fuerza, aplicando ejercicios funcionales y el propio peso corporal como resistencia.

Tabla 1. Planificación del programa de ejercicio físico para pacientes con neuroblastoma.

S.1	Aeróbico continuo: 20 min al 50% de la $FC_{máx}$ Fuerza: 2 series de 8 repeticiones al 60% de 1 RM Respiratorio: 40% de la $PI_{máx}$, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico HIIT: 2x (6x 20 s al 65% de la $FC_{máx}$ / 40 s al 40% de la $FC_{máx}$) Fuerza: 2 series de 8 repeticiones al 60% de 1 RM Respiratorio: 40% de la $PI_{máx}$, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico continuo: 25 min al 50% de la $FC_{máx}$ Fuerza: 2 series de 8 repeticiones al 60% de 1 RM Respiratorio: 40% de la $PI_{máx}$, 2 x30 inspiraciones/día.
S.2	Aeróbico HIIT: 2x (6x 30 s al 70% de la $FC_{máx}$ / 30 s al 40% de la $FC_{máx}$) Fuerza: 2 series de 8 repeticiones al 65% de 1 RM Respiratorio: 40% de la $PI_{máx}$, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico continuo: 25 min al 60% de la $FC_{máx}$ Fuerza: 2 series de 8 repeticiones al 65% de 1RM Respiratorio: 40% de la $PI_{máx}$, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico HIIT: 2x (6x 30 s al 70% de la $FC_{máx}$ / 30 s al 40% de la $FC_{máx}$) Fuerza: 2 series de 8 repeticiones al 65% de 1 RM Respiratorio: 40% de la $PI_{máx}$, 2 x30 inspiraciones/día.

S.3	Aeróbico HIIT: 2x (6x 30 s al 75% de la FCmáx / 30 s al 40% de la FCmáx) Fuerza: 2 series de 7 repeticiones al 70% de 1 RM Respiratorio: 40% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico continuo: 25 min al 60% de la FCmáx Fuerza: 2 series de 7 repeticiones al 70% de 1 RM Respiratorio: 40% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico HIIT: 2x (6x 30 s al 80% de la FCmáx / 30 s al 40% de la FCmáx) Fuerza: 2 series de 7 repeticiones al 70% de 1 RM Respiratorio: 40% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.
S.4	Aeróbico continuo: 25 min al 60% de la FCmáx Fuerza: 2 series de 8 repeticiones al 70% de 1 RM Respiratorio: 40% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico HIIT: 3x (6x 30 s al 70% de la FCmáx / 30 s al 40% de la FCmáx) Fuerza: 2 series de 8 repeticiones al 70% de 1 RM Respiratorio: 40% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico continuo: 25 min al 60% de la FCmáx Fuerza: 2 series de 8 repeticiones al 70% de 1 RM Respiratorio: 40% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.
S.5	Aeróbico HIIT: 2x (6x 30 sg al 80% de la FCmáx / 30 s al 40% de la FCmáx) Fuerza: 3 series de 7 repeticiones al 70% de 1 RM Respiratorio: 50% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico continuo: 25 min al 60% de la FCmáx Fuerza: 3 series de 7 repeticiones al 70% de 1 RM Respiratorio: 50% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico HIIT: 2x (6x 30 s al 80% de la FCmáx / 30 s al 40% de la FCmáx) Fuerza: 3 series de 7 repeticiones al 70% de 1 RM Respiratorio: 50% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.
S.6	Aeróbico HIIT: 2x (8x 30 s al 80% de la FCmáx / 30 s al 40% de la FCmáx) Fuerza: 3 series de 6 repeticiones al 75% de 1 RM Respiratorio: 50% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico continuo: 25 min al 60% de la FCmáx Fuerza: 3 series de 6 repeticiones al 75% de 1 RM Respiratorio: 50% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico HIIT: 2x (8x 30 s al 80% de la FCmáx / 30 s al 40% de la FCmáx) Fuerza: 3 series de 6 repeticiones al 75% de 1 RM Respiratorio: 50% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.
S.7	Aeróbico HIIT: 2x (8x 30 s al 80% de la FCmáx / 30 s al 40% de la FCmáx) Fuerza: 3 series de 5 repeticiones al 80% de 1 RM Respiratorio: 50% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico HIIT: 2x (6x 30 s al 70% de la FCmáx / 30 s al 40% de la FCmáx) Fuerza: 3 series de 5 repeticiones al 80% de 1 RM Respiratorio: 50% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico HIIT: 2x (6x 30 s al 85% de la FCmáx / 30 s al 40% de la FCmáx) Fuerza: 3 series de 5 repeticiones al 80% de 1 RM Respiratorio: 50% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.
S.8	Aeróbico continuo: 25 min al 60% de la FCmáx Fuerza: 2 series de 5 repeticiones al 80% de 1 RM Respiratorio: 50% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico HIIT: 2x (6x 30 s al 75% de la FCmáx / 30 s al 40% de la FCmáx) Fuerza: 2 series de 5 repeticiones al 80% de 1 RM Respiratorio: 50% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.	Aeróbico continuo: 25 min al 60% de la FCmáx Fuerza: 2 series de 5 repeticiones al 80% de 1 RM Respiratorio: 50% de la PImáx, 2 x30 inspiraciones/día.

Abreviaturas: FCmáx, frecuencia cardiaca máxima; min, minuto; PImáx, presión inspiratoria máxima; RM, repetición máxima; S, número de semana de entrenamiento; s, segundos.

Cuando al paciente se le concedió el alta hospitalaria, se le proporcionó una planificación del programa de ejercicio físico adaptada a sus necesidades, a los medios disponibles en su domicilio y a los objetivos del entrenamiento. En la **Figura 2** se muestra un ejemplo de planificación del programa de ejercicio adaptada al paciente durante el alta hospitalaria.







	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
Entrenamiento aeróbico	Caminar 15 minutos seguidos a velocidad media.	Caminar 15 minutos seguidos a velocidad media.	Caminar 15 minutos seguidos con velocidad media.	Caminar 15 minutos seguidos a velocidad media.	Caminar 20 minutos seguidos a velocidad media.	Bicicleta 20 minutos seguidos Jugar durante 10 minutos.	Caminar 30 minutos seguidos con velocidad media.
Fuerza de fuerza	Sentadillas estáticas (foto) 5 veces x 10 sg. Pesas (1 kg de arroz, pasta...) -3 x 6 repeticiones de ejercicio de hombro -3x6 repeticiones de ejercicio de bíceps. -Plancha a tocar el hombro: 3 x 6 repeticiones.  	Salir a jugar al menos 10 minutos	Sentadillas estáticas (foto) 5 veces x 10 sg. Pesas (1 kg de arroz, pasta...) -3 x 6 repeticiones de ejercicio de hombro -3x6 repeticiones de ejercicio de bíceps. -Plancha a tocar el hombro: 3 x 6 repeticiones.  	Salir a jugar al menos 10 minutos.	Sentadillas estáticas (foto) 5 veces x 10 sg. Pesas (1 kg de arroz, pasta...) -3 x 6 repeticiones de ejercicio de hombro -3x6 repeticiones de ejercicio de bíceps. -Plancha a tocar el hombro: 3 x 6 repeticiones.  		

Figura 2. Ejemplo de planificación del programa de ejercicio físico adaptada a los medios disponibles por el paciente en estado de alta hospitalaria en su domicilio (fuera de la Comunidad de Madrid). Abreviaturas: kg, kilogramos; sg, segundos.

El paciente asistió al 90% de las sesiones de ejercicio físico planificadas, realizando el 50% en su vivienda habitual y el otro 50% en el hospital.

Al finalizar las 8 semanas de ejercicio, se hizo la segunda medición de las variables de estudio para conocer el efecto de la intervención sobre la evolución del paciente (Fase de post-intervención). A continuación, se muestran los cambios en los parámetros antropométricos (**Tabla 2**) alcanzados con el programa de entrenamiento.

Tabla 2. Mediciones antropométricas del paciente diagnosticado de neuroblastoma

	Peso (kg)		Talla (cm)		IMC (kg/m ²)	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Paciente	14,4	14,8	100	100	14,4	14,8

Abreviaturas: kg, kilogramo; cm, centímetro; IMC, índice de masa corporal; m, metro; Post, evaluación de las variables realizada después de finalizar el programa de ejercicio; Pre, evaluación de las variables al comienzo del estudio.

En cuanto a la capacidad cardiorrespiratoria, los valores del VO₂pico alcanzados por el paciente al inicio y al final del estudio fueron similares (40 mL/kg/min y 39 mL/kg/min al inicio y al final del programa de entrenamiento, respectivamente). Además, mostró unos mayores niveles de fuerza muscular en el tren inferior al final del programa de ejercicio en comparación con los valores obtenidos en el momento del diagnóstico del cáncer (**Tabla 3**). Sin embargo, aunque los niveles de fuerza en miembros superiores medidos a través del test de agarre manual se mantuvieron estables a lo largo de las 8 semanas de entrenamiento (13 kg movilizados, tanto al inicio como al final del

entrenamiento), observamos una reducción de la fuerza en miembros superiores utilizando el test 5 RM después de la aplicación del programa de ejercicio (**Tabla 3**). Estos resultados reflejan la capacidad del paciente entrenado para mejorar sus niveles de fuerza muscular en miembros superiores, y preservar su función cardiovascular y metabólica después de haber recibido 8 semanas de tratamiento quimioterápico, y cuya agresividad repercute negativamente sobre los aparatos y sistemas previamente mencionados. Sin embargo, se necesita hacer hincapié en el trabajo de fuerza en miembros inferiores a lo largo del entrenamiento.

Tabla 3. Resultados de los ejercicios de fuerza (expresados como repetición máxima o 1 RM).

	Press pecho (kg)			Prensa piernas (kg)			Jalón delante (kg)			Extensión rodillas (kg)			Remo (kg)		
	Pre	Post	Cambio (%)	Pre	Post	Cambio (%)	Pre	Post	Cambio (%)	Pre	Post	Cambio (%)	Pre	Post	Cambio (%)
Paciente	25,7	18,0	-29	25,7	46,4	+80,5	5,1	5,1	0	10	15,5	+50	15,5	12,9	-16

Abreviaturas: kg, kilogramo; Post, evaluación realizada al finalizar el estudio; Pre, evaluación realizada al inicio del estudio; RM, repetición máxima.

2.3. Parte preclínica: modelo murino de neuroblastoma

2.3.1. Metodología

Empleamos ratones hembras TH-MYCN heterocigotos (con fondo genético 129SvJ) de 6 semanas de edad, los cuales procedieron del *National Cancer Institute* (Frederick, Maryland EE.UU.). Se mantuvieron en el Animalario del Centro de Investigaciones Energéticas y medioambientales (CIEMAT, Registro Número 28079-21A) cumpliendo con las recomendaciones y las leyes españolas y europeas relacionadas con el uso del animal de laboratorio (FELASA: Federación Europea de Asociaciones de Laboratorio de Animales en la Ciencia). Los ratones vivieron en jaulas micro-aisladas euro-estándar tipo IIL, en un máximo de 5 ratones por jaula, en condiciones controladas de temperatura y humedad (reguladas a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $55\pm 10\%$, respectivamente), con iluminación fluorescente de 07:00 a 19:00 horas, recibiendo comida (Harlan Teklad Global Diets 2914) y agua (filtrada $50\ \mu\text{m}$ e irradiada con luz ultravioleta) *ad libitum*.

Diseño de estudio (indicado inicialmente)

El diseño de estudio se dividió en 3 grandes fases: (i) pre-intervención (2 semanas), (ii) intervención (8 semanas), y (iii) post-intervención (2 semanas) (ver **Figura 3**).

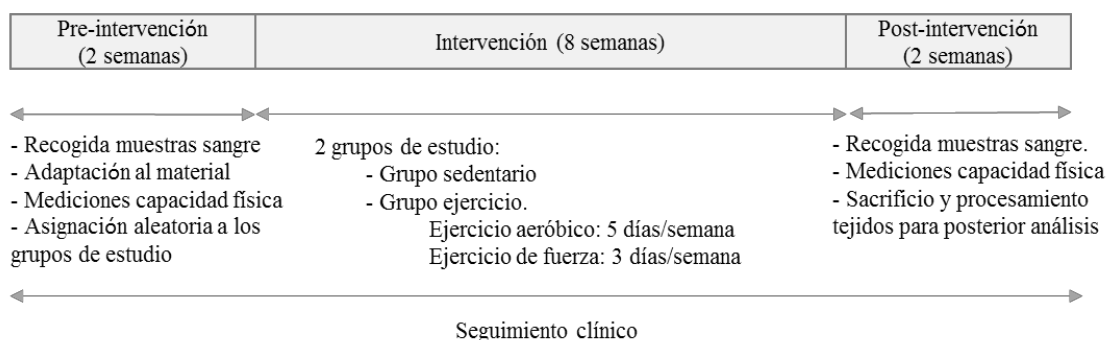


Figura 3. Diseño experimental del estudio en el modelo murino de neuroblastoma.

(i) Fase de pre-intervención

En esta fase tiene lugar: (a) la recogida de muestras de sangre, para obtener los valores pre- intervención de las variables inflamatorias e inmunes; (b) la adaptación de los ratones al material que va a ser usado en el estudio; y (c) la evaluación inicial de la capacidad cardiorrespiratoria y fuerza de los ratones (ver más adelante).

(ii) Fase de intervención

Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en los siguientes 2 grupos, con un bloqueo en el nivel de capacidad cardiorrespiratoria: grupo de ejercicio (realizan un programa de ejercicio individualizado) o grupo sedentario (cuyo movimiento queda limitado al espacio de la jaula). El programa de ejercicio comenzó 48 horas después de haberse realizado la evaluación de la capacidad cardiorrespiratoria, y consistió en un entrenamiento combinado (ejercicio aeróbico y de fuerza) de 8 semanas de duración, realizado entre las 07:15–12:00 horas.

Ejercicio aeróbico

El entrenamiento aeróbico interválico (intensivo–extensivo) se realizó de lunes a viernes utilizando un tapiz rodante (Harvard Apparatus, Panlab, Barcelona, España). La velocidad de carrera, la inclinación del tapiz y la duración del ejercicio aumentaron progresiva e individualmente para cada ratón desde las primeras sesiones [25 minutos de duración, intensidad ~35% de la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) alcanzada en la prueba de esfuerzo y 0% de pendiente] hasta las últimas (1 hora de duración, intensidad ~70% de la $V_{m\acute{a}x}$, y 15% de pendiente). Con el fin de mantener las habilidades de carrera, pero sin llegar a provocar adaptaciones fisiológicas, los ratones del grupo sedentario corrieron 5 minutos a una velocidad constante de 5 cm/s y sin pendiente, 1 día por semana (lunes).

Ejercicios de fuerza

Esta parte de la sesión fue realizada después del ejercicio aeróbico, 3 días/semana (lunes, miércoles, viernes), e incluyó los siguientes ejercicios:

Plancha horizontal y volteo. El ratón fue colocado en la parte superior de una plancha de fácil agarre, la cual se invierte cuidadosamente colocándolo boca abajo. El ejercicio consiste en que el ratón vuelva a colocarse en la parte superior de la plancha. Cuando alcanza este objetivo, se repite el proceso durante un tiempo que fue progresivamente incrementado a lo largo del estudio (desde 30 segundos al comienzo hasta 90 segundos al final de la fase de entrenamiento). Dicho ejercicio se repitió un total de 6 veces, con 2 minutos de descanso entre repeticiones.

Ejercicio de agarre con dos patas. Los ratones tienen que agarrarse, solo con las patas delanteras, a una percha (de 2 mm de espesor) durante el mayor tiempo posible. La percha está colocada ~40 cm por encima de una superficie blanda para amortiguar las caídas, distancia suficiente tanto para motivar al ratón a permanecer agarrado a la percha como para prevenir lesiones en el momento de la caída. Este ejercicio se realizó 6 veces/sesión, con 10 minutos de descanso entre repeticiones.

(iii) Fase post-intervención

En esta fase se mide la capacidad cardiorrespiratoria y la fuerza de ambos grupos de estudio. Cuarenta y ocho horas después de las evaluaciones físicas se procede a la recogida de muestras de sangre periférica y al sacrificio de los ratones a través de dislocación cervical. De cada ratón se extirpan los siguientes tejidos: el tumor, para estudios de inmunidad celular; el bazo y la médula ósea, para analizar la posibilidad de metástasis; y músculo esquelético y cardíaco, para identificar adaptaciones moleculares al ejercicio.

Medición de las variables de estudio

Seguimiento clínico diario

Evaluamos diariamente la supervivencia y el peso de los ratones.

Inmunidad celular tumoral y metástasis

Se valoró la existencia de tumor mediante estudio anatómico macroscópico de la cavidad abdominal. A continuación, se extirpó la pieza tumoral, que se usó para realizar diferentes estudios. Una parte se fijó en formaldehído (10%) y se incluyó en parafina, para la posterior tinción con hematoxilina-eosina y el estudio de anatomía patológica con microscopio de luz. El resto del tumor se procesó para la detección del infiltrado leucocitario (CD45⁺) y el

estudio de subpoblaciones (inmunidad innata y adaptativa, células mieloides supresoras, linfocitos reguladores y efectores, marcadores de activación y agotamiento) mediante la realización de citometría de flujo (FACS Canto II, Beckton Dickinson), y para el estudio de la expresión génica de mediadores moleculares del microambiente tumoral (citoquinas Th1 y Th2, “quimioquinas”, moléculas inmunosupresoras, metaloproteasas de matriz, moléculas co-estimuladoras e inhibitoras) mediante qRT-PCR (*quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*).

Gen	Sinónimo	Referencia
<i>CCL2</i>	Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)	Mm00441242_m1
<i>CCL3</i>	Proteína inflamatoria de macrófagos 1-alpha (MIP-1- α)	Mm00441258_m1
<i>Icam-1</i>	Molécula de adhesión molecular-1	Mm00516023_m1
<i>Ifn-γ</i>	Interferón gamma	Mm01168134_m1
<i>Mmp9</i>	Metalopeptidasa de matriz-9	Mm00442991_m1
<i>Tnf-α</i>	Factor de necrosis tumoral alfa	Mm00443258_m1
<i>Tgf-β</i>	Factor de crecimiento tumoral beta	Mm01178820_m1
<i>Vcam-1</i>	Molécula de adhesión endotelial-1	Mm01320970_m1
<i>Vegf-α</i>	Factor de crecimiento endotelial vascular A	Mm01281449_m1
<i>Vegf-R1</i>	Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular	Mm00517546_m1
<i>Vegf-R2</i>	Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular	Mm01222421_m1
<i>GAPDH</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Mm99999915_g1

Perfil inflamatorio sistémico

Las muestras de suero recogidas antes y después de la intervención fueron utilizadas para cuantificar los niveles de las siguientes citoquinas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BioPlex Pro™, Mouse Cytokine Standard Group I 23-Plex Laboratories Inc., Hercules, CA, EE.UU.): IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ y TNF- α .

Capacidad cardiorrespiratoria

Se utiliza un tapiz para determinar de forma indirecta la capacidad cardiorrespiratoria máxima y para calcular la intensidad de las cargas del entrenamiento a través de la $V_{\text{máx}}$ alcanzada en el último estadio completado por el ratón¹². Antes de la realización de esta prueba y durante 3 sesiones, los ratones aprenden a correr en el tapiz. Durante el primer contacto, la velocidad es de 0 cm/s, con una inclinación del 0% y sin aplicación de estímulo eléctrico; posteriormente, la adaptación consiste en 15 minutos de ejercicio continuo a una velocidad

incremental desde 5 cm/s hasta 15 cm/s, con una inclinación del tapiz del 15% (estímulo eléctrico de 0,1 mA, 1 Hz, 200 ms). Durante la prueba, y después de un calentamiento de 10 minutos a 8 cm/s, la velocidad inicial del tapiz, que es de 5 cm/s, se incrementa en 2 cm/s cada 2 minutos. La inclinación del tapiz es del 15% porque permite obtener la mejor carga cardiovascular y minimizar las lesiones.

Consideramos como criterio de parada de prueba el momento en el que el ratón permanece más de 5 segundos seguidos en la rejilla electrificada y no es capaz de seguir corriendo a una velocidad superior. Determinamos la capacidad cardiorrespiratoria como la diferencia de la distancia total recorrida en las pruebas de esfuerzo realizadas al inicio y al final del estudio.

Fuerza muscular de las patas anteriores

El test de agarre o *Hand Grip Strength Test* permite conocer la fuerza de las patas delanteras de los ratones a través de un aparato especializado que posee una barra (de diámetro de 3 mm) conectada a un sensor de fuerza isométrica (Panlab, Harvard apparatus, Barcelona, España). La prueba consiste en que el ratón agarre dicha barra, a la vez que el evaluador tira ligeramente de la cola hacia atrás en un plano horizontal para que el propio ratón realice una fuerza contraria a la aplicada externamente (será registrada en gramos)¹³. Se hacen 3 intentos, con 5 minutos de descanso entre ellos, considerando el mejor valor como la fuerza máxima alcanzada por cada ratón. También calculamos la máxima fuerza relativa al peso¹³.

Adaptaciones musculares al entrenamiento.

Determinamos la actividad del enzima *citrato sintasa*, un marcador clásico de adaptación muscular aeróbica y de biogénesis mitocondrial espectrofotométricamente en músculo esquelético homogeneizado^{14, 15}.

2.3.2. Resultados

Obtención del consentimiento informado

El consentimiento informado de la parte preclínica fue obtenido durante los 6 primeros meses del proyecto (código PROEX 186/15). Todos los procedimientos fueron aprobados por el CIEMAT (Número de Registro 28079-21A) y por el Órgano Habilitado (OEBA) en la Comunidad de Madrid, y desarrollados cumpliendo con las leyes de protección animal en investigación europeas (*European Convention ETS 123*) y españolas (32/2007 y R.D. 1201/2005).

Dificultades encontradas en el diseño de estudio para la realización de la actividad investigadora y estrategias para la resolución de las mismas

Inicialmente, nos planteamos utilizar ratones TH-MYCN hemicigotos (fondo genético 129/SvJ), los cuales representan un modelo espontáneo de neuroblastoma en huésped inmunocompetente, reproduciendo las características genéticas y clínicas del neuroblastoma de alto riesgo con amplificación de *N-MYC* humano. Sin embargo, por la poca eficacia obtenida a la hora de presentar tumores los ratones (en 6 meses, sólo el 15% de ellos desarrollaron de manera espontánea el tumor), durante el primer semestre del proyecto se optó por utilizar un modelo inducido de enfermedad dado la dificultad de disponer de ratones suficientes para llevar a cabo el estudio, y también teniendo en cuenta la experiencia previa del Dr. Manuel Ramírez Orellana y de su equipo (incluidos en entre los investigadores de este proyecto). El nuevo modelo murino inducido de neuroblastoma se genera a través de la inoculación ortotópica de neuroesferas 36769 en la glándula adrenal de ratones *wild type* con fondo genético 129/SvJ. A continuación, explicaremos las fases experimentales realizadas para efectuar la puesta a punto del nuevo diseño de estudio.

Primer experimento: determinación del número de células para inducir el neuroblastoma

En una primera aproximación, necesitábamos determinar el número de esferas de neuroblastoma a inocular para que el tumor se desarrollase en todos sino la mayoría de los ratones y, a la vez, se alcanzase una supervivencia de ~10 semanas (necesitamos 4 semanas para la recuperación post-cirugía del ratón más 6 semanas para realizar la intervención). En este primer experimento con n=9 ratones, ejecutamos los procedimientos siguientes:

- 1) Cirugía. Para realizar la cirugía, el ratón fue anestesiado con Ketamina–Dexmedetomidina (5 μ L/gr) vía intra-peritoneal, además de aplicar en los ojos una pomada epitelizante (Oftalmolosa cusí Gentamicina, 3 mg/gr). Tras verificar el plano de anestesia, se realizó una incisión a la altura del abdomen, inyectando las neuroesferas en la glándula adrenal izquierda en números de 300.000, 30.000 y 3.000 células/ratón (3 grupos de n=3 ratones/grupo). Posteriormente, se cosió el abdomen, se inyectó el reversor anestésico (5 μ L/gr de Atipamezol) y se esperó a que el ratón fuera despertándose de forma paulatina.
- 2) Fase de cicatrización y seguimiento post-cirugía (12 semanas). Durante esta fase, se pesó diariamente a los ratones y se hizo un seguimiento observacional del estado del pelo del ratón, así como de la postura y actividad espontánea. También evaluamos macroscópicamente *in vivo* la aparición del tumor (si era palpable o no) y el estado de la cicatriz.

Los resultados obtenidos en este primer experimento de puesta a punto del diseño de

estudio fueron los siguientes: los ratones a los que se les inocularon 300.000 células tuvieron un 100% de incidencia del tumor; con una inoculación de 30.000 células, 2 de los 3 ratones desarrollaron tumor; y en los ratones en los que se inoculó 3.000 células, desarrollaron tumor 1 de 3 animales. Durante el seguimiento clínico diario, se pudo observar cómo los ratones del grupo de 300.000 células empeoraban a partir de la 3ª semana de recuperación post-cirugía, teniendo que ser sacrificados en la 8ª semana. Sin embargo, los ratones de los grupos de 30.000 y 3.000 células empeoraron a partir de la 5ª semana post-cirugía, siendo sacrificados en la 12ª semana. Aunque la cantidad de 300.000 células/ratón fue la única que obtuvo una incidencia de aparición del tumor del 100%, éste era excesivamente grande en la 8ª semana post-cirugía, por lo que la consideramos como una cantidad excesiva a utilizar teniendo en cuenta la duración del nuevo diseño de estudio (con una duración total de ~10 semanas). Por tanto, en base a los resultados descritos, se decidió inyectar 100.000 células/ratón.

Segundo experimento: determinación de la viabilidad del nuevo diseño de estudio

En este experimento, utilizamos n=19 ratones machos *wild type*, de 8–10 semanas de edad. Nuestro objetivo era conocer la respuesta de los ratones al nuevo protocolo de estudio después de la inoculación de 100.000 esferas de neuroblastoma. Las fases del diseño de estudio aplicado fueron las siguientes:

1) Fase pre-intervención.

1.1) Cirugía.

La cirugía tuvo lugar el viernes 15 de junio y el lunes 18 de junio del 2018, y se realizó según lo explicado en el primer experimento, inyectando 100.000 esferas de neuroblastoma en la glándula suprarrenal izquierda. Un ratón no sobrevivió al procedimiento, por lo que comenzamos la fase siguiente con 18 ratones.

1.2) Seguimiento post-cirugía.

Durante las 3 semanas posteriores, se evaluó el peso, pelo, postura y actividad espontánea (de lunes a viernes la 1ª semana post-cirugía, y los lunes, miércoles y viernes durante las semanas sucesivas). También evaluamos macroscópicamente *in vivo* la aparición del tumor y el estado de la cicatriz.

La duración final de esta fase fue de 4-5 semanas por problemas en el proceso de cicatrización. Dos ratones fueron descartados del estudio por haber desarrollado masas anómalas a la altura de la cicatriz, las cuales no habían sido observadas en el experimento previo. Consideramos que pudo existir algún problema durante la cirugía o durante la cicatrización de la herida. Sin embargo, se trataban de metástasis de neuroblastoma, como explicaremos más adelante. Empezamos, por tanto, la fase de intervención con 16 ratones.

1.3) Familiarización con el material y mediciones basales *in vivo*.

Realización de la obtención de muestras de sangre, la familiarización de los ratones con el material que van a utilizar durante el protocolo de estudio, y la evaluación de la capacidad cardiorrespiratoria y de la fuerza muscular. La duración de esta fase fue de 1 semana.

2. Fase de intervención.

Los ratones fueron distribuidos en: 1. Grupo sedentario sin *Celyvir*; 2. Grupo ejercicio sin *Celyvir*; 3. Grupo ejercicio con *Celyvir*; y 4. Grupo sedentario con *Celyvir*.

El programa de ejercicio consistía inicialmente en un entrenamiento combinado (ejercicio aeróbico y de fuerza), 4 días/semana, durante 8 semanas. Sin embargo, debido al rápido crecimiento del tumor, la duración de la fase de intervención tuvo que limitarse a 6 semanas. Además, entre los ejercicios de fuerza utilizados, hemos tenido que omitir el definido en la metodología inicial como “plancha horizontal y volteo”. De manera resumida, el ratón está colocado en la parte superior de una plancha, la cual se invierte, colocándolo boca abajo. El objetivo es que el ratón se mantenga en esa posición de agarre un tiempo determinado, en función de los objetivos del entrenamiento. Cuando el ratón no se agarra correctamente a la plancha o no tiene fuerza suficiente, se produce su caída en una superficie blanda para evitar daño o lesión. Sin embargo, debido al tamaño del tumor y a su excesiva vascularización, observamos que en algunos ratones cuya caída tenía lugar sobre el tumor, se producía muerte por desangramiento. Decidimos finalmente, omitir este ejercicio debido al riesgo asociado.

Por otro lado, el tratamiento utilizado en el estudio es una terapia llamada *Celyvir* que consiste en la administración de células mesenquimales autólogas infectadas con un adenovirus oncolítico, 1 día/semana, previa anestesia (5 μ L/gr de Ketamina- Dexmedetomidina). Durante las 2 primeras semanas de su administración, nos encontramos con que 5 ratones no fueron capaces de revertir el plano de anestesia (el cual es necesario para la inyección de *Celyvir* por el seno retro-orbital) y murieron. Por lo tanto, durante las siguientes semanas, se realizó exclusivamente la intervención con ejercicio físico sin administrar el tratamiento.

Durante esta fase, los ratones fueron sacrificados a medida que se aproximaban a criterios de punto final humanitario, llegando a la 6ª semana de intervención sólo 2 de los 16 ratones iniciales.

Con la realización de los experimentos de puesta a punto llegamos a las siguientes conclusiones:

- La cantidad de esferas de neuroblastoma a inocular en la glándula suprarrenal izquierda de los ratones *wild type* es de 100.000 células/ratón.
- Se produce la aparición de masas anómalas y desconocidas en distintas partes corporales diferentes a la glándula suprarrenal izquierda donde son inyectadas las esferas de neuroblastoma.
- La técnica de administración del *celyvir* tiene que ser modificada ya que los ratones

mueren al no ser capaces de revertir el plano de anestesia. Probamos a anestesiarnos a los ratones a través de inyección intra-peritoneal; sin embargo, se produjeron lesiones graves en la masa tumoral del ratón, la cual ocupaba casi toda la cavidad abdominal incluso durante las primeras semanas de la intervención, lo que limita también el realizar dicha técnica. También consideramos administrar el tratamiento utilizando la vena lateral de la cola. Sin embargo, al tener que suministrar el tratamiento durante 6 semanas, la cola del ratón puede verse deteriorada. Por lo tanto, comprobamos que las técnicas de administración del *cealyvir* no eran las adecuadas en este modelo murino.

- Es necesario reducir la duración de la intervención con ejercicio, de 8 a 6 semanas, ya que el empeoramiento de los ratones es muy acentuado a partir de la 5ª semana post-cirugía (por razones éticas, es obligatorio restar tiempo de duración a los experimentos).
- Se necesita eliminar alguno de los ejercicios de fuerza planteados inicialmente debido al riesgo de caídas sobre el lado en el que está el tumor, lo que conlleva un traumatismo severo sobre el animal (e incluso, su fallecimiento).

Establecimiento del diseño final del estudio

Basándonos en los resultados descritos anteriormente, concluimos que el mejor diseño de estudio adaptado a nuestros objetivos y a las bondades del modelo inducido de neuroblastoma es el definido a continuación. Este experimento fue desarrollado desde finales de septiembre del 2018 hasta principios de julio del 2019, y comprende las siguientes fases:

1) Fase pre-intervención.

Esta fase comprende lo siguiente:

1.1) Cirugía.

Las cirugías fueron realizadas en 42 machos *wild type* con fondo genético 129/SvJ de 9 semanas de edad siguiendo la misma metodología explicada en apartados previos. En la **Figura 4** mostramos el diagrama de flujo de la muestra utilizada.

1.2) Seguimiento post-cirugía.

Durante la primera semana después de la cirugía, se evaluó diariamente el peso, y también el pelo, la postura y la actividad espontánea de los ratones. Estos parámetros fueron valorados con un *score* individual desde 0 (reflejando el mínimo grado de afectación) a 1 (máximo grado de afectación). Posteriormente, se generó un *score* total a través de la suma de los *scores* individuales (rango de 0 a 4). También evaluamos macroscópicamente *in vivo* la aparición del tumor (es decir, si era palpable o no) y el estado de la cicatriz. Las evaluaciones fueron hechas los lunes, miércoles y viernes durante las 2 semanas posteriores. La evolución de la enfermedad fue evaluada durante las fases posteriores del estudio.

1.3) Familiarización con el material y mediciones basales *in vivo*.

Después de confirmar la correcta cicatrización de la herida, tuvo lugar la familiarización de los ratones al material durante 3 días (semana 4 post-cirugía). A la semana siguiente, se obtuvo sangre venosa periférica (200 µL en total/ratón) vía submandibular y se efectuaron las pruebas físicas para evaluar la capacidad cardiorrespiratoria y la fuerza muscular. Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente a los siguientes grupos (pareados según su capacidad cardiorrespiratoria): a) grupo ejercicio (n=21); y b) grupo sedentario (n=18).

2) Fase de intervención.

El grupo ejercicio desarrolló un entrenamiento combinado (ejercicio aeróbico y de fuerza), 4 días/semana, durante 5 semanas en vez de 8, ya que en los anteriores experimentos observamos un empeoramiento severo del ratón a partir de la semana 5 post-cirugía. El entrenamiento se realizó según lo descrito anteriormente, limitando el trabajo de fuerza al ejercicio de agarre con las patas delanteras (el ratón se mantenía colgado de una percha el máximo tiempo posible; el número de series siguió una progresión incremental de 3 a 5).

El grupo sedentario llevó a cabo una sesión aeróbica de intensidad muy ligera en tapiz rodante que consistió en andar 5 minutos a 5 cm/s, 1 día/semana. Al ser un entrenamiento de intensidad tan baja, no se considera que pueda haber adaptaciones al ejercicio. Sin embargo, con la realización de esta sesión, los ratones del grupo sedentario recibieron los mismos estímulos de luz, contacto y ruido que el grupo ejercicio.

Durante esta fase, observamos la aparición de parálisis en las patas traseras de algunos ratones: 3 ratones en el grupo sedentario y 2 ratones en el grupo ejercicio.

3) Fase de post-intervención.

Cuando el ratón estaba cerca de cumplir con los criterios de punto final (3-4 días antes de su cumplimiento), se realizaron las pruebas de esfuerzo y el test de fuerza; si se producía la presencia de parálisis en las patas traseras, también se procedía al sacrificio del animal. Después de un descanso de 24 horas tras las pruebas físicas, se obtuvieron muestras de sangre y, seguidamente, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Durante las disecciones, se recogieron varios tejidos:

- Músculo esquelético del tren inferior (bíceps femoral) conservado a -80°C para analizar las adaptaciones moleculares producidas por la realización del programa de ejercicio.
- Tumor primario de neuroblastoma: se recogió el tumor entero junto con el riñón donde se produjo la inoculación de las esferas de neuroblastoma. A continuación, el tumor fue pesado y medido con un calibre (AA846R, Aesculap AG, Tuttlingen, Alemania) y, posteriormente, se diseccionó en varias partes, conservadas en formol, a -80°C, en HBSS y en OCT para posteriores análisis.
- Masas desconocidas: se recogieron tejidos y masas anómalas detectadas durante la necropsia. En estudios previos, no se han descrito metástasis en el modelo inducido con

el que estamos trabajando. Sin embargo, a lo largo de los experimentos, observamos masas que podrían ser consideradas como metástasis del tumor primario.

- Otros órganos: diseccionamos el riñón contralateral y el hemisferio cerebral derecho (conservados en formol), el hígado, el hemisferio izquierdo del cerebro y la grasa (mantenidos a -80°C) para comprobar su grado de afectación a consecuencia del tumor.

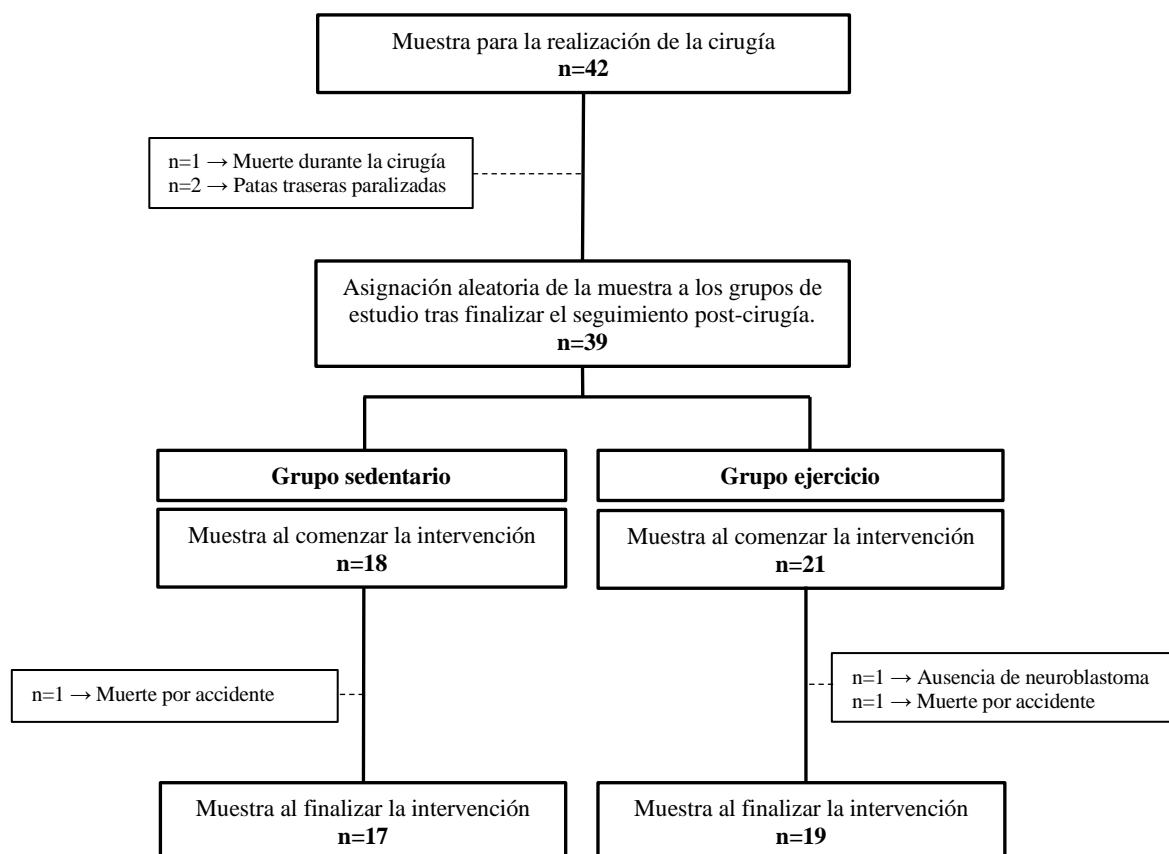


Figura 4. Diagrama de flujo.

A continuación, definiremos los **resultados** obtenidos:

Eficiencia en la inoculación de las esferas de neuroblastoma

Inyectamos en la glándula suprarrenal izquierda 100.000 esferas de neuroblastoma por ratón. Durante la cirugía, se produjo una baja. De los 19 ratones que formaron parte del grupo sedentario, el 100% de ellos desarrollaron el tumor primario. En el grupo ejercicio, un total de 20 de 21 ratones presentaron dicho tumor (eficiencia alcanzada: 95%) (**Figura 4**).

Evolución clínica

En la **Figura 5** se puede observar el estado de la cicatriz (Figura 5A) y la evolución clínica de los ratones desde el momento de la cirugía hasta la finalización de la fase de pre-intervención (duración: 5 semanas). La evolución fue similar en los ratones evaluados, a excepción de 2 de ellos, que tuvieron que ser sacrificados al mostrar parálisis en las patas

traseras (**Figura 4**). Los 39 ratones restantes presentaron un estado de salud adecuado para comenzar con la fase de intervención del estudio.

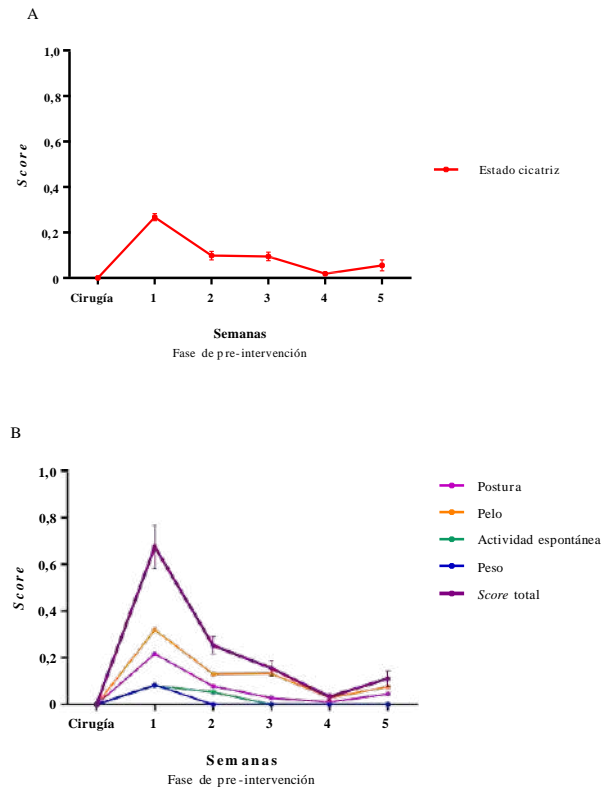


Figura 5. En la parte superior (A) se observa la evolución del estado de la cicatriz desde la realización de la cirugía hasta 5 semanas después de la misma (fase de pre-intervención). En la parte inferior (B), se muestra la evolución del *score* total o suma de los *scores* individuales (peso, postura, pelo y actividad espontánea individualmente valorados con rango 0-1, en donde 0 representa afectación mínima y 1 afectación máxima del ratón causada por la cirugía y el crecimiento intra-tumoral).

Finalizada la fase de pre-intervención, los ratones fueron distribuidos a los grupos de estudio. La evolución clínica de la enfermedad mostrada por el grupo ejercicio y el grupo sedentario durante la fase de intervención está representada en la **Figura 6**. No existieron diferencias significativas en la evolución clínica de la enfermedad para la interacción grupo*tiempo entre los grupos de estudio durante esta fase.

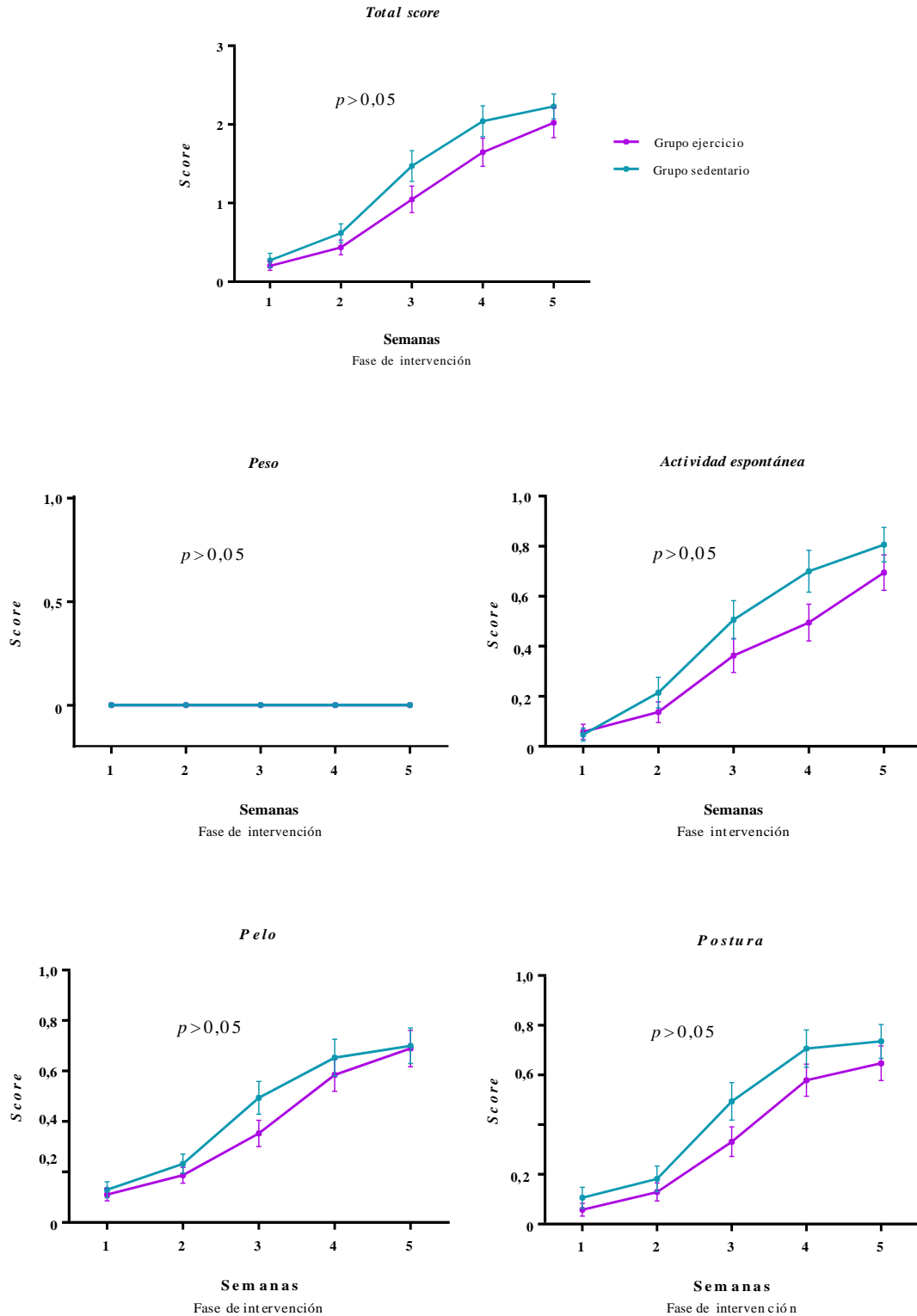


Figura 6. Evolución clínica de la enfermedad durante la fase de intervención en el grupo ejercicio y en el grupo sedentario. A mayor *score* presentado, peor estado clínico del ratón.

Supervivencia

Según el análisis de Kaplan-Meyer, no existieron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia del grupo que realizó ejercicio y del grupo sedentario (prueba de Wilcoxon: $p > 0,05$). El tiempo en riesgo del grupo ejercicio fue de 1037 días mientras que en el grupo sedentario fue de 749 días. La supervivencia media (\pm error estándar) desde la inoculación de las esferas de neuroblastoma fue de 62 ± 2 días en el grupo de ejercicio frente a 56 ± 2 días en el grupo sedentario (**Figura 7**).

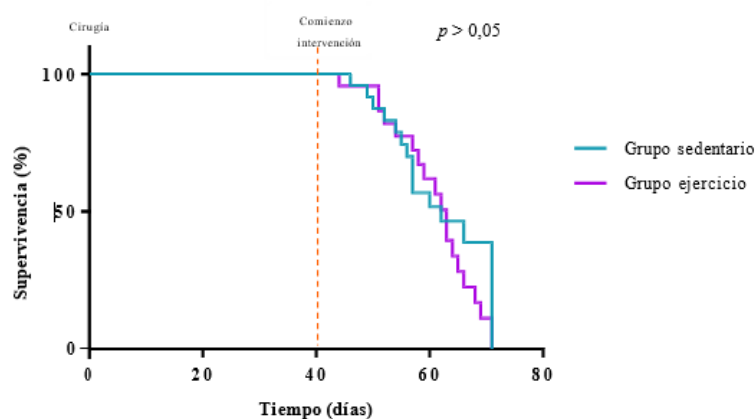


Figura 7. Representación de la tasa de supervivencia de ambos grupos de estudio desde el momento de la cirugía hasta el final del experimento o sacrificio del ratón por cumplir criterios de punto final o por la aparición de parálisis en las patas a través del análisis de Kaplan-Meyer. El valor de p se refiere a la comparación entre grupos a lo largo del tiempo.

Capacidad física

Capacidad aeróbica

La duración total de las pruebas de esfuerzo realizadas por el grupo ejercicio ($n=18$) al inicio y al final de la fase de intervención fue de 2515 ± 124 segundos y 1946 ± 182 segundos, respectivamente, mientras que el grupo sedentario ($n=16$) duró 2555 ± 148 segundos al inicio y 1472 ± 173 segundos al final del mismo, existiendo diferencias significativas para el efecto interacción tiempo*grupo en dicha variable ($p=0,028$; **Figura 8A**). Además, la velocidad máxima alcanzada en las pruebas de esfuerzo por los ratones del grupo ejercicio fue significativamente mayor que la del grupo sedentario ($p=0,033$; **Figura 8B**). Por lo tanto, la capacidad aeróbica del grupo ejercicio fue mayor a la del grupo sedentario al final del estudio, expresado tanto en términos de duración como de velocidad máxima alcanzadas en la prueba de esfuerzo. Estos resultados muestran que los ratones que realizaron el programa de ejercicio sufrieron un menor deterioro de su capacidad aeróbica que el grupo sedentario, por lo que, la intervención aplicada contrarrestó la pérdida de esta capacidad producida por la enfermedad.

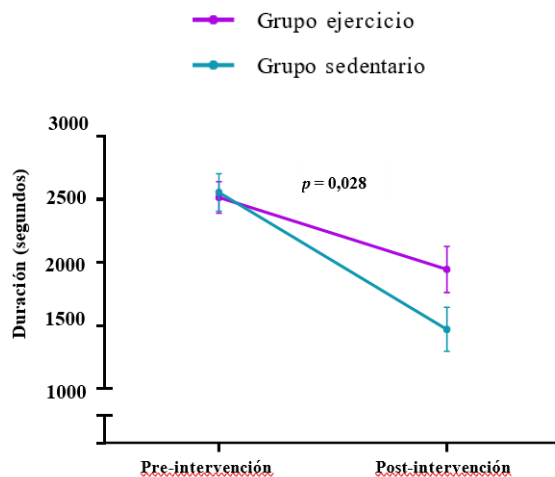


Figura 8. Niveles de capacidad aeróbica (expresada en término de duración alcanzada al final de la prueba de esfuerzo) en ambos grupos de estudio (grupo sedentario en verde *versus* grupo ejercicio en rosa) medidos al inicio (fase de pre-intervención) y al final (fase de post-intervención) del experimento.

Fuerza muscular

Al igual que observamos un deterioro en la capacidad aeróbica de los ratones de ambos grupos a lo largo del experimento, los niveles de fuerza muscular también se vieron reducidos (**Figura 9**), hallando un efecto significativo en el tiempo ($p=0,009$) pero no en la interacción tiempo*grupo para esta variable ($p=0,415$). Estos datos no son de extrañar debido a la gran dificultad para aplicar un entrenamiento de fuerza en el modelo murino empleado en este trabajo: el riesgo de caídas podría producir un incremento de la incidencia en el número de muertes, por lo que eliminamos varios ejercicios de fuerza planificados inicialmente.

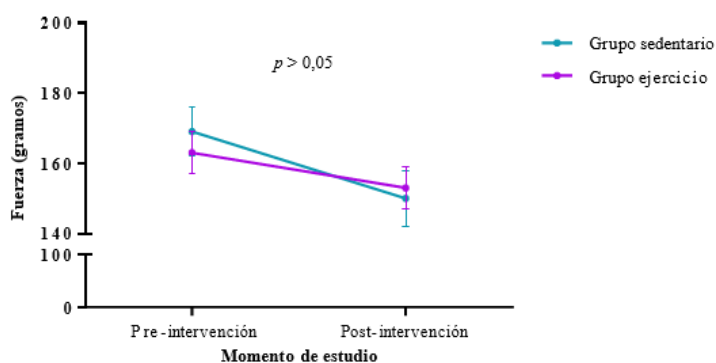


Figura 9. Fuerza de agarre de las patas delanteras (gramos).

Adaptaciones musculares al entrenamiento

Para analizar las adaptaciones músculo-esqueléticas producidas por la intervención, el bíceps femoral de los ratones fue procesado para obtener homogenados totales de proteínas, como se ha descrito previamente¹². A partir de los homogenados, aplicamos la técnica de *western blotting*, en la que alícuotas hervidas y no hervidas con cantidades equivalentes de proteína de los homogenados totales de cada ratón fueron resueltas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) para separarlas por peso molecular y transferirlas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Posteriormente las membranas fueron bloqueadas con BSA o leche desnatada para incubarlas con distintos anticuerpos primarios (**Tabla 4**), seguido de la incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. La detección de las bandas inmunorreactivas se realizó mediante la lectura de la quimioluminiscencia generada al aplicar el sustrato ECL (CheLuminate-HRP PicoDetect, Panreac Applichem, EE.UU.; Novex® ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit, Invitrogen, EE.UU.) en un equipo ChemiDoc™ MP Imager (Bio-Rad, Hercules, CA). La intensidad de las bandas fue evaluada por cuantificación densitométrica (Software ImageJ, National Institutes of Health)¹⁶. La carga total de proteína por carril fue determinada mediante la tinción con azul coomassie de las membranas de PVDF¹⁷ para usarla como control de carga de los homogenados totales.

Tabla 4. Anticuerpos primarios usados durante la técnica de *western blotting*.

Anticuerpo	Proveedor	Referencia	Enlace
P70 S6 quinasa	Cell Signaling	#9202	https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/p70-s6-kinase-antibody/9202
Raptor total	Cell Signaling	#2280	https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/raptor-24c12-rabbit-mab/2280
Phospho Acetyl Coenzima-A Carboxilasa (S79)	Abcam	ab68191	https://www.abcam.com/Acetyl-Coenzyme-A-Carboxylase-phospho-S79-antibody-EP1885Y-ab68191.html
Citrato Sintasa	Abcam	ab96600	https://www.abcam.com/Citrate-synthetase-antibody-ab96600.html

Las proteínas cuantificadas en tejido músculo-esquelético fueron las siguientes:

Citrato sintasa. La proteína citrato sintasa es la responsable de catalizar la primera reacción del ciclo de Krebs en la mitocondria, por lo que es fundamental para la producción de energía en la célula, asegurando el correcto funcionamiento de la misma. El ejercicio físico produce un aumento en la demanda de energía a todos los niveles, por lo que el análisis de esta enzima es útil para comprobar la repercusión a nivel molecular del ejercicio físico.

Fosfo Acetil Coenzima A Carboxilasa (S79) (pACC1). La proteína ACC1 (Acetil-CoA Carboxilasa 1) cataliza la reacción limitante en la biogénesis de los ácidos grasos de cadena larga, por lo que sus funciones se centran en la regulación de la síntesis y metabolismo de los lípidos, así como de los ácidos grasos. Cuando es fosforilada, se inhibe la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, activando su consumo y la β -oxidación, por lo que es de interés conocer los niveles de la proteína fosforilada en respuesta al ejercicio.

P70 S6 quinasa (P70S6Q). La proteína p70 es una proteína quinasa de serina/treonina que actúa en la cascada de señalización de mTOR en respuesta a factores de crecimiento y nutrientes promoviendo la proliferación celular, el crecimiento celular y la progresión del ciclo celular. Se trata de una proteína ribosomal que regula directamente la síntesis proteica, siendo su forma fosforilada la que está activa cumpliendo su función. La actividad física promueve su activación, por lo que es una enzima útil para evaluar el efecto directo del ejercicio a nivel molecular.

Raptor total. La proteína raptor (proteína reguladora asociada a mTOR) está implicada en el control de la actividad del complejo de mTOR 1 (mTORC1), que se encarga de regular el crecimiento celular, la supervivencia celular y la autofagia en respuesta a señales hormonales y nutrientes. Específicamente, su función consiste en servir como andamiaje para reclutar los sustratos de mTORC1, que es desempeñada por su forma fosforilada activa. La cascada de señalización que ayuda a desencadenar la activación de la vía, acaba regulando la síntesis de proteínas mediante la activación, entre otras, de la proteína p70.

Como se puede observar en la **Figura 10**, existen mayores niveles de las proteínas p70 S6 quinasa y raptor total en los ratones entrenados respecto a los que han permanecido sedentarios ($p=0,021$). Estos resultados reflejan un incremento de la síntesis proteica en el tejido músculo esquelético de los ratones del grupo ejercicio. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre grupos ni en la pAAC1 ni en la proteína citrato sintasa.

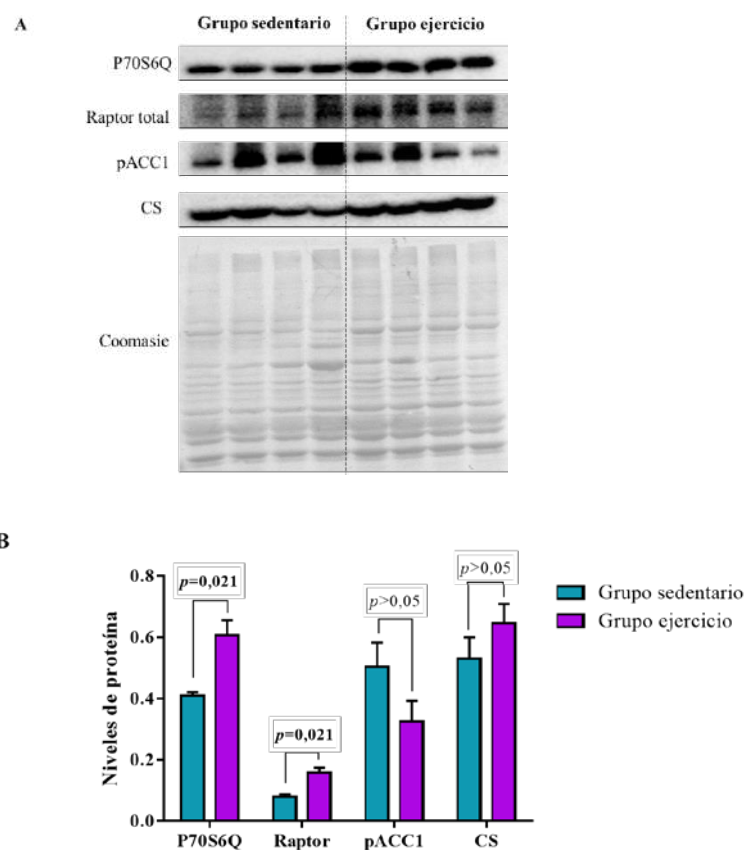


Figura 10. A) Ejemplo ilustrativo de bandas recortadas de *western blot* realizados en homogenados de tejido muscular esquelético (*biceps femoris*) de ratones del grupo sedentario (n=4) y ejercicio (n=4). **B)** Análisis densitométricos que muestran los niveles de proteínas normalizados por la proteína total cargada, cuantificada a través de la tinción azul coomasie. Los datos son expresados como media±error estándar de la media. Abreviaturas: CS: citrato sintasa; P70S6Q: P70 S6 quinasa; pACC1: fosfo Acetil Coenzima A Carboxilasa (S79).

También fueron analizadas enzimas antioxidantes, como son la proteína glutatión reductasa y la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD). La proteína glutatión reductasa es una enzima que mantiene unos niveles altos de glutatión reducido en el citosol, ya que cataliza la reducción del glutatión disulfuro para formar glutatión en su forma sulfhidrilo. Esta molécula es importante para la resistencia al estrés oxidativo, ya que mantiene un ambiente reductor en el interior de la célula. Esta enzima está constitutivamente activa en las células y es inducible en situaciones de estrés oxidativo, por lo que es un buen indicador de las adaptaciones moleculares que se producen en respuesta al ejercicio físico. Por otro lado, la enzima MnSOD es una proteína mitocondrial encargada de destruir radicales aniónicos de superóxido que se producen naturalmente dentro de las células y que son tóxicos para los sistemas biológicos. Así, actúa como un sistema de defensa antioxidante natural de la célula controlando las especies reactivas de oxígeno. Protege de la senescencia celular, el envejecimiento o incluso de roturas de doble cadena

en el ADN producidas por los radicales libres asociados al estrés oxidativo. Por esto, es una proteína candidata a sufrir variaciones en sus niveles en respuesta al ejercicio físico, que supone una fuente de estrés oxidativo, y por tanto es de gran utilidad analizarla en nuestro modelo. No hemos encontrado muestras de diferencias significativas entre grupos de estudio (datos no mostrados).

Volumen tumoral

En el momento del sacrificio, que podía ser tanto a lo largo del experimento (cuando el ratón cumplía criterios humanitarios de punto final o presentaba parálisis en las patas traseras) como en la fase post-intervención (6 semanas post-cirugía), se calcularon los volúmenes tumorales (en mm) utilizando la siguiente fórmula: $(4\pi/3) \times (a/2)^2 \times (l/2)$, siendo a el ancho y l la longitud del tumor primario¹⁸. Un total de 29 tumores fueron incluidos en este análisis. El volumen tumoral presentado por el grupo sedentario (n=14; 11.270±1.352 mm) fue similar al del grupo ejercicio (n=15; 12.305±1924 mm), sin diferencias significativas entre mediciones ($p=0,668$) (**Figura 11**). Por lo tanto, el ejercicio físico aplicado en las fases más agresivas de la enfermedad en seguro en término de desarrollo del tumor.

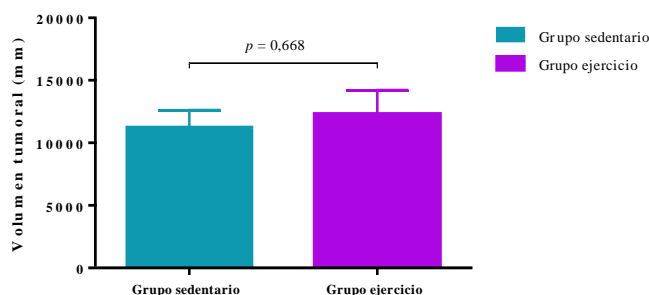


Figura 11. Volumen tumoral de cada grupo de estudio (grupo sedentario en verde, grupo ejercicio en rosa), sin existir diferencias significativas entre ambos. Los datos están representados como media ± error estándar de la media.

Metástasis

En varios ratones, al sacrificio, se detectaron ganglios torácicos con aspecto anómalo que fueron recogidos y procesados. Concretamente, los ganglios se mostraban aumentados de tamaño y algunos de coloración más oscura con respecto a la fisiológica. De estos se sospechaba su afectación e infiltrado tumoral y que, por tanto, se tratara de un modelo de neuroblastoma inducido metastásico.

Una prueba que nos llevaría a identificar estas posibles metástasis a distancia era detectar células tumorales 36769 en el tejido ganglionar, midiendo en un macerado de los mismos el transgen *TH-MYCN*. Para ello, los ganglios se digirieron con colagenasa tras un homogeneizado mecánico y el

resultado de la digestión se pasó a través de un tamiz de 40 μm de poro. De este filtrado se recogió el pellet tras la centrifugación y retirado del sobrenadante, que se almacenó ultracongelado (-80°C) hasta su utilización.

Para la detección del transgén *TH-MYCN*, a partir de los homogeneizados de los ganglios, se extrajo DNA genómico con el kit *NZY Tissue gDNA Isolation Kit* (NZY Tech), y posteriormente fue amplificado mediante PCR convencional con la enzima *Taq* polimerasa y los *primers* correspondientes Chr18F1 y Chr18R2 (N008/N009)¹⁹. Por último, se realizó un gel de agarosa al 2% y se visualizaron las bandas de DNA intercalando con *Midori Green Advanced DNA Stain* (Nipon Genetics). El marcador de peso molecular utilizado fue *100 bp DNA ladder* (Nipon Genetics). Como control negativo se empleó el agua destilada DNasa/RNasa *free*, del kit de amplificación y, como control positivo, el extracto del genotipado de cola de un ratón *TH-MYCN*⁺.

Como se observa en la **Figura 12**, los ganglios de los ratones 22, 34 y 36 con independencia de si *de visu* presentaban coloración oscura o no, fueron claramente positivos para la detección de *TH-MYCN*. Por tanto, se asume que células derivadas del tumor primario, migraron hasta esos tejidos tratándose de metástasis a distancia. En cambio, los resultados del genotipado de los ganglios del ratón 28, no son tan claros, ya que la banda correspondiente al ganglio oscuro (G28dNB) parece intuirse una banda.

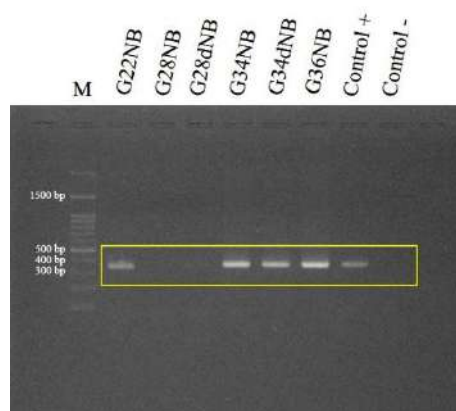


Figura 12. Genotipado por PCR en gel de agarosa. Fragmentos de DNA extraído de ganglios torácicos que contienen el transgen *TH-MYCN* producto de PCR, con un control positivo (+) y un control negativo (-). Abreviaturas: *DNA ladder-marker* (M), ganglio (G), *dark* (d), neuroblastoma (NB).

Debido a los resultados obtenidos, se decidió recoger distintos tejidos para realizar un análisis más profundo del grado de afectación por metástasis en el modelo murino inducido de neuroblastoma utilizado. De cada ratón se recogió: masas subcutáneas, bazo, hígado, mesenterio, páncreas, ganglio axilar, mediastino, riñones, estómago, vértebras, costillas, pulmones y cerebro.

La metástasis fue analizada de la siguiente manera:

- 1) Cuantificando el número total de lesiones por ratón.
- 2) Generando una puntuación total, resultado del sumatorio de cuatro categorías en función del grado de afectación de los tejidos analizados por ratón: 2.1) cuando el tumor primario estaba localizado en la glándula suprarrenal donde se realizó la inoculación de las esferas de neuroblastoma, se otorgaba 0 puntos; 2.2) si existía infiltración del tumor en otros órganos diferentes a la localización del tumor primario, 1 punto; 2.3) presentar invasión de las células tumorales en los órganos adyacentes a la glándula adrenal fue valorado con 2 puntos; y 2.4) mostrar células tumorales en órganos distantes al tumor primario, es decir, presente metástasis *per se*, 3 puntos.
- 3) Determinando el porcentaje de ratones presentes en las cuatro categorías anteriores: localización tumoral, infiltración, invasión y metástasis.
- 4) Estableciendo la incidencia de tumor localizado, infiltración, invasión y metástasis.

Después de analizar la metástasis de la manera anteriormente descrita, observamos que el grupo de ejercicio tuvo una mayor asociación no significativa en el la puntuación total (OR=1,13; $p=0,402$), en infiltración (OR=3,11; $p=0,270$), en invasión (OR=2,5; $p=0,382$), en metástasis (OR=1,75; $p=0,587$) y en el avance de la enfermedad (OR=1,46; $p=0,367$) respecto al grupo sedentario. Así mismo, el grupo ejercicio pareció tener una mayor tasa de incidencia no significativa en el número de lesiones (IRR=1,11; $p=0,587$). En resumen, no se observaron diferencias significativas en cuanto al análisis de metástasis entre los grupos de estudio.

Microambiente tumoral y perfil inflamatorio sistémico

La expresión génica de los siguientes mediadores moleculares del microambiente tumoral fue analizada mediante qRT-PCR: *ccl2*, *ccl3*, *Icam-1*, *Ifn- γ* , *Mmp9*, *Tnf- α* , *Tgf- β* , *Vcam-1*, *Vegf- α* , *Vegf-R1* y *Vegf-R2*. Como gen control endógeno se utilizó GAPDH en todos los ensayos. Después de la realización del análisis, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de ejercicio y el grupo sedentario para ninguno de los genes evaluados ($p>0,05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre grupos en relación a marcadores del ambiente inflamatorio a nivel sistémico ($p>0,05$ para todas las citoquinas evaluadas).

En cuanto al **análisis estadístico** aplicado, los datos son expresados como media \pm error estándar de la media. La supervivencia se analizó a través del método de *Kaplan-Meier* y utilizando la prueba de Wilcoxon para evaluar diferencias entre las curvas de supervivencia de cada uno de los grupos (ejercicio *versus* sedentario). Las comparaciones intra-sujeto [antes *versus* después de la intervención] e inter-sujeto (grupo ejercicio *versus* grupo sedentario) se realizaron con las pruebas no paramétricas de Wilcoxon y *U* de Mann-Whitney, respectivamente. Además, este último fue

usado para establecer comparaciones entre grupos en aquellas variables medidas en un solo momento de evaluación (por ejemplo, mediciones bioquímicas musculares o volumen tumoral). Así mismo, las diferencias en los efectos de la aplicación de la intervención a lo largo del tiempo fueron analizadas utilizando una ANOVA de dos factores (grupo y tiempo). En caso de haber identificado diferencias significativas en el modelo general, se hubiera utilizado la prueba *post-hoc* de Bonferroni para analizar los resultados por pares. Los análisis fueron realizados con el paquete estadístico SPSS 23.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL); el nivel de significación estadística se fijó en $p \leq 0,05$.

3. PARTE 2.- MEDULOBLASTOMA

3.1. Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

En niños con meduloblastoma, el ejercicio físico supervisado realizado durante la radioterapia produce mejoras en las siguientes variables: 1. Capacidad física y funcional, niveles de actividad física, composición corporal y calidad de vida de los pacientes. 2. Función neurocognitiva y neuromotora. 3. Capacidad específica anti-tumoral de sus células NK.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los posibles efectos de un programa de ejercicio físico sobre la respuesta fisiológica, inmune y tumoral en pacientes pediátricos con meduloblastoma.

Objetivo específicos

1. Evaluar los efectos de un programa de ejercicio físico supervisado intrahospitalario para pacientes con meduloblastoma durante el tratamiento con radioterapia, sobre su capacidad física y funcional, niveles de actividad física, composición corporal y calidad de vida.
2. Estudiar los efectos del citado programa sobre la capacidad neurocognitiva y neuromotora de los pacientes con meduloblastoma.
3. Analizar los efectos del citado programa sobre inmunidad celular en sangre y el refuerzo de la respuesta inmune -células NK-.

3.2. Metodología

3.2.1. Objetivo específico 1

Pacientes

Pacientes con meduloblastoma en tratamiento en los siguientes hospitales de Madrid: Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Hospital Universitario La Paz, Hospital Universitario 12 de Octubre y Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Reclutamiento por cribado de los registros médicos del departamento de Oncología de cada uno de los cuatro centros. Criterios de inclusión: 1) ser diagnosticado de meduloblastoma; 2) presentar un rango de edad entre los 4 y los 18 años; 3) sin contraindicaciones médicas para realizar ejercicio físico, como son la alteración de la coagulación, anemias graves, presencia de hipertensión arterial no controlada, arritmias cardíacas no controladas o hipertensión de las arterias pulmonares; 4) comprensión de la lengua española; y 5) entrega/firma del consentimiento informado por los padres/tutores. Criterios de exclusión: ingreso en la UVI y disponer de unos niveles de condición y salud física que no permitan la realización de las pruebas físicas requeridas.

Diseño de estudio

El diseño de este estudio se elaboró teniendo en cuenta los principios éticos para la investigación clínica recogidos en la Declaración de Helsinki, y el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD). Además, la realización de este proyecto implica la utilización de muestras biológicas, las cuales serán tratadas de acuerdo a la Ley de Investigación Biomédica 14/2007 y el Real Decreto 1716/2011.

Se trata de un estudio randomizado y controlado de intervención. Los pacientes son aleatorizados usando un sistema de lista de números al azar generado informáticamente y distribuidos en dos grupos:

- a) Grupo ejercicio: llevan a cabo un programa de ejercicio físico individualizado desde el momento del diagnóstico de meduloblastoma hasta el fin de la fase de inducción.
- b) Grupo control: estos pacientes no realizan la intervención con ejercicio.

El diseño de estudio se divide en 3 fases principales, con 2 tandas de evaluaciones (pre- y post-intervención) las cuales son realizadas tanto por el grupo de ejercicio como por el grupo control (**Figura 13**):

- 1) Fase de pre-intervención (evaluaciones basales). Puesta en contacto con los padres/tutores y con los pacientes candidatos para la explicación del estudio, entrega del consentimiento

informado, familiarización con todos los test, y realización de las evaluaciones basales de las variables de estudio definidas a continuación.

2) Fase de intervención (ejercicio). Los pacientes pertenecientes al grupo de ejercicio participaron en un programa de ejercicio durante la radioterapia (duración ~6 semanas) en el gimnasio pediátrico del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (3 sesiones/semana). Se trató de un programa progresivo, supervisado e individualizado, siguiendo las normas de las instituciones de referencia para entrenamiento aeróbico³ y de fuerza en niños y adolescentes⁴, y también basado en nuestra experiencia previa². La duración de la sesión fue de ~60–90 minutos, incluyendo: *a) calentamiento* (10 minutos, con movilizaciones articulares dinámicas); *b) parte principal: b.1) ejercicio aeróbico* (10–30 minutos, con incrementos graduales de la carga, utilizando bicicleta o manivela de brazos en función del estado del paciente); *b.2) ejercicios de fuerza* (30 minutos) a modo de circuito, con 5 ejercicios (prensa de pecho/extremidades inferiores, dorsal remo y alto, y extensión rodillas) realizados contra resistencia y con un amplio rango de movilidad articular (3 series de 12–15 repeticiones con un descanso entre repeticiones y series de 20 y 120 segundos, respectivamente, a una intensidad del 50% de 1 RM estimada); *b3) ejercicios específicos de los músculos respiratorios*, 5 sesiones/semana (2 en el domicilio del paciente) de 2 series de 30 inspiraciones a través de un dispositivo específico (*Power Breathe*, Biocorp Europa, Andoain, España) y contra una resistencia del 40% (semanas 1 y 2) o 50% de la $PI_{m\acute{a}x}$ (semanas 3 y 4), trabajando hasta el final de la intervención al 40% de la misma²⁰; *c) vuelta a la calma* (10 minutos), con estiramientos y ejercicios de flexibilidad. Respecto a la ejecución del programa de ejercicio en las habitaciones de ingreso, el ejercicio aeróbico se realizó utilizando ergómetro de manivela o ciclo-ergómetro; los ejercicios de fuerza muscular fueron llevados a cabo con mancuernas y gomas elásticas. Ambos tipos de ejercicio siguieron el mismo protocolo de trabajo que el utilizado en el gimnasio.

Durante esta fase, el grupo control recibió la atención hospitalaria habitual pero no participó en el citado programa de ejercicio. Les proporcionamos información sobre la importancia de adquirir un estilo de vida activo y se les ofreció participar en el programa una vez finalizado el estudio.

3) Evaluaciones post-intervención. La medición de las variables de estudio fue realizada por los pacientes de ambos grupos (grupo de ejercicio, grupo control) una vez finalizada la radioterapia.



Figura 13. Diseño de estudio en pacientes con meduloblastoma.

Medición de las variables

La capacidad física (capacidad aeróbica y fuerza muscular), la capacidad funcional, los niveles de actividad física, y la PI_{máx} y PE_{máx} son valorados de la misma manera que ha sido descrita en los pacientes con neuroblastoma.

Niveles de fatiga y calidad de vida

Cuestionario PedsQL 3.0 (versión en castellano).

Composición corporal

La masa magra/grasa y la densidad mineral ósea se midieron mediante absorciometría de rayos X (DXA, Hologic Serie Discovery QDR, EE.UU.). La absorciometría de rayos X se trata de una técnica radiológica que permite una valoración de la composición corporal de forma rápida, precisa y exacta con niveles de radiación muy bajos y sin anestesia. Usa rayos x para determinar la cantidad de grasa del cuerpo y su distribución, la densidad mineral de los huesos, y la cantidad de músculo de un paciente. Requiere permanecer acostado sobre una camilla suave mientras el escáner pasa sobre el paciente. La medición de la composición corporal se hará en colaboración con el Dr. Ignacio Ara Royo, de la Universidad de Castilla-La Mancha (Toledo). Para ello, se pondrá a disposición de los pacientes y acompañantes, el transporte y las condiciones óptimas (día, hora) para la realización de esta prueba.

Función cardíaca

Electrocardiograma, ecocardiografía (fracción de eyección y de acortamiento del ventrículo izquierdo). Antes de la valoración de la capacidad aeróbica, y durante la prueba de esfuerzo definida anteriormente, se realizará un registro electrocardiográfico.

Capacidad pulmonar

La capacidad vital forzada (CVF) y el volumen espiratorio forzado (VEF1) serán analizados con un ergoespirómetro (Vmax 29C).

3.2.2. Objetivo específico 2

Pacientes y Diseño de estudio.

Igual que para el objetivo específico 1.

Medición de las variables

Capacidad neurocognitiva

Dependiendo de la edad del niño, los pacientes y/o padres/tutores completaron los siguientes cuestionarios:

a) *Adaptive Behavior Assessment System-2nd (ABAS-II)*²¹; este cuestionario está validado para ser aplicado desde el nacimiento hasta los 89 años. Su objetivo es proporcionar una evaluación completa de las habilidades funcionales diarias de una persona en distintas áreas o contextos con el fin de determinar si es capaz de desenvolverse en su vida cotidiana sin precisar la ayuda de otras personas, esto es, el nivel de autonomía. Las áreas que evalúa son: comunicación, utilización de los recursos comunitarios, habilidades académicas funcionales, vida en el hogar o en la escuela, salud y seguridad, ocio, autocuidado, autodirección social y motora, y empleo. Aporta también tres índices generales: conceptual, social y práctico, así como un índice global de conducta adaptativa. En el caso de los niños, la información se recoge por medio de cuadernillos que son administrados a padres y profesores.

b) *Behavior Assessment Scale for Children-2nd (BASC-2)*²²; este cuestionario está validado para ser aplicado desde los 2 a los 21 años de edad. Ofrece información sobre la conducta adaptativa y desadaptativa de los niños y los adolescentes. Utilizaremos escalas para padres y profesores, o un autoinforme para niños mayores y adolescentes. Este cuestionario nos ofrece información sobre aspectos desadaptativos de la conducta (agresividad, ansiedad, conductas problemáticas) pero también sobre aspectos adaptativos (resiliencia, liderazgo). El tiempo de aplicación es de aproximadamente 30 minutos por entorno (padres, escuela)

c) *Behavior Rating Inventory of Executive Function (BRIEF)*²³ y d) *Behavior Rating Inventory of Executive Function-Preschool Version (BRIEF-P)*²⁴; de 2 a 5 años el primero y de 5 a 18 años el segundo. El objetivo de esta prueba es evaluar las funciones ejecutivas en el entorno cotidiano, aumentando así la validez ecológica. Existen ejemplares para los padres y para el entorno académico que nos permiten registrar el grado de frecuencia con el que aparecen una serie de conductas. Cuenta con una serie de escalas que permiten evaluar la regulación conductual, emocional y cognitiva, así como un índice global de la función ejecutiva. El tiempo de aplicación es de aproximadamente 30 minutos por entorno.

e) *Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence-4th Edition (WPPSI-IV)*²⁵; f) *Wechsler Intelligence Scale for Children-4th Edition (WISC-IV)*²⁶; y g) *Wechsler Adult Intelligence Scale-4th Edition (WAIS-IV)*²⁷. Son las escalas de inteligencia más utilizadas internacionalmente. Abordan el constructo de inteligencia desde un enfoque multidimensional; además de incluir un índice de inteligencia total, ofrece índices que reflejan el rendimiento en diferentes áreas cognitivas: comprensión verbal, capacidad visoespacial, razonamiento fluido, memoria de trabajo y velocidad de procesamiento. Disponen de una versión para preescolar y primaria (WPPSI-IV), que abarca edades entre 36 meses y 7 años y 7 meses; una versión para niños (WISC-V) de 6 hasta 16 años y 11 meses, y otra para mayores de 16 años y adultos (WAIS-IV). El tiempo aquí es mucho más variable, depende de la capacidad del niño y de las circunstancias puntuales, pero aproximadamente 60 minutos.

Todos ellos tienen versiones estandarizadas en castellano.

Capacidad neuromotora

Actitud postural y equilibrio dinámico medidos mediante posturógrafo (Basic Balance Master 8.6.0. Neurcom; Lawnfield Road Clackmas, OR, EE.UU.)²⁸. Las pruebas que aplicadas son las siguientes:

a) Test modificado de Interacción Sensorial del Equilibrio (mCTSIB). Es un test que evidencia objetivamente la existencia de disfunción sensorial y analiza el control del equilibrio funcional. La velocidad de oscilación postural está cuantificada bajo cuatro condiciones sensoriales. Ojos abiertos superficie fija, ojos cerrados superficie fija, ojos abiertos superficie con 'foam', ojos cerrados superficie con foam. Se analizará la posición del centro de gravedad en cada test registrado. El parámetro que se obtiene es la velocidad media de balanceo del en grados/segundos.

b) Test límites de estabilidad (LOS). Cuantifica la distancia máxima del paciente para desplazar su centro de gravedad voluntariamente dentro del cono de equilibrio. Los parámetros que se obtienen son: a. Tiempo de reacción en segundos; b. Velocidad del desplazamiento del centro de gravedad en grados/segundos; c. Punto de Excursión Final máxima en %; d. Control Direccional (DLC) en porcentaje; e. Porcentaje del desplazamiento máximo alcanzado.

c) Test transferencia rítmica del COG (RWS). Cuantifica la habilidad del paciente para mover rítmicamente su centro de gravedad ante un estímulo dado. Derecha/izquierda (lateral), adelante/atrás (anterior/posterior). Transiciones del estímulo de tres, dos, y un segundo. Los resultados de velocidad y control dirección se compararán con patrones de normalidad por rango control de edad. Los parámetros que se obtienen son: a. Velocidad de coordinación en los ejes, en grados /segundos; y b. Control direccional en porcentaje.

3.2.3. Objetivo específico 3

Pacientes y Diseño de estudio. Igual que para el objetivo específico 1. En muestras de sangre de todos los niños en los momentos pre- y post-intervención, analizar la inmunidad celular el refuerzo de la respuesta inmune. Además, en muestras de tumor, análisis del papel de TIAM1 y Neuropilina1 (NRP1) como dianas terapéuticas en meduloblastoma.

Medición de las variables

Inmunidad celular en sangre

El análisis de esta variable permite conocer: infiltrado leucocitario (CD45+), subpoblaciones (inmunidad innata/adaptativa, células mieloides supresoras, linfocitos reguladores/efectores, marcadores de activación/agotamiento) con citometría de flujo (FACS Canto II, Beckton Dickinson).

Estudio del refuerzo de la respuesta inmune

Identificar marcadores en linfocitos T, B y NK, y analizar la actividad citotóxica de estos últimos.

3.3. Resultados

Para el reclutamiento de los pacientes pediátricos diagnosticados de meduloblastoma, disponemos de la aprobación de todos los Comités de Ética del Hospital Universitario La Paz (N^o PI-3395), Hospital General Universitario Gregorio Marañón (N^o Acta-22/2018), Hospital Universitario 12 de Octubre (N^o 18/388) y Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (N^o R-0028/18).

Un total de 3 pacientes fueron diagnosticados de meduloblastoma: 1 de ellos en el Hospital Universitario Gregorio Marañón y los 2 pacientes restantes, en el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. La primera paciente finalizó su intervención en el estudio mientras que los 2 últimos pacientes diagnosticado tuvieron que interrumpir la intervención a causa del COVID19. A continuación, explicaremos los datos obtenidos en la intervención realizada con la paciente que finalizó el programa de entrenamiento.

Paciente

El paciente es una adolescente de 16 años de edad. Fue diagnosticada de un meduloblastoma de alto riesgo en Junio del 2019. Después de comprobar que cumplía con los criterios de inclusión establecidos en este proyecto, a los padres y a la paciente se les aportó información sobre el estudio y se les ofreció participar en el mismo. Estos aceptaron, entregando el consentimiento informado firmado.

Variables evaluadas y resultados obtenidos

Al inicio del estudio, la paciente presentó un estado de salud muy debilitado. Las limitaciones presentadas en la visión central y periférica, así como los problemas graves de coordinación, agarre y equilibrio dificultaron la posibilidad de realizar un número elevado de pruebas físicas, funcionales y psicológicas. Las siguientes pruebas fueron las efectuadas antes (pre-intervención) y después de la intervención (post-intervención):

1. Medidas antropométricas.
2. Medición de la $PI_{m\acute{a}x}$ y $PE_{m\acute{a}x}$.
3. Ergoespirometría, con análisis de gases en cicloergómetro, siguiendo un protocolo incremental hasta la extenuación.
4. Valoración de la fuerza máxima general en los ejercicios de prensa de piernas, press de pecho y polea al pecho, utilizando la prueba de 5 RM.
5. Valoración de la capacidad funcional, a través del *Timed Up and Down Stairs* (TUDS), *Timed Up and Go* (TUG) y la fuerza de agarre manual o *hand grip*.

No fue posible disponer de una muestra del tumor de meduloblastoma de la paciente.

Los resultados obtenidos se definen a continuación:

La paciente asistió a 8 de las 18 sesiones planificadas, mostrando un grado de cumplimiento de la planificación del entrenamiento de un 44%, todas ellas llevándolas a cabo dentro de un ambiente intra-hospitalario. La razón común para la no ejecución de las sesiones fue el alto nivel de fatiga presentado por la paciente.

En cuanto a las variables antropométricas (**Tabla 5**), el IMC se ubicó por encima de los valores de referencia aconsejados para las adolescentes sanas de su edad (IMC= 20–25), tanto al inicio como al final de la intervención. Durante el programa de ejercicio físico y una vez finalizado el mismo, se le recomendó continuar realizando ejercicio a diario, tanto trabajo aeróbico como de fuerza muscular.

Tabla 5. Resultados antropométricos de la paciente con meduloblastoma.

VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS	RESULTADOS	
	Pre-intervención	Post-intervención
Peso (kg)	68	76
Talla (cm)	1,63	1,63
Índice de Masa Corporal, IMC (kg/m ²)	25	35

En relación con la capacidad cardiorrespiratoria, el VO_2 pico alcanzado al final de la intervención fue igual que al inicio del estudio (14 mL/kg/min en ambos momentos de estudio), estando por debajo de los valores sanos de referencia recomendados para la edad y el género de la paciente.

De hecho, presentar un VO_2 pico con valores iguales o inferiores a 29 ml/kg/min está relacionado directamente con un mayor riesgo de padecer numerosas enfermedades, especialmente, las cardiometabólicas. A pesar de no observarse un incremento de la capacidad cardiorrespiratoria, la paciente mantuvo los niveles de VO_2 pico tras finalizar el agresivo tratamiento de quimioterapia y radioterapia al que estuvo sometida, lo cual se acompañó de un aumento de la duración total de la prueba (5 minutos al inicio del estudio *versus* 6 minutos al final de la intervención), así como de la potencia máxima desarrollada durante la misma (de 50 a 60 vatios al inicio y final de la intervención, respectivamente). Es decir, la paciente fue capaz de soportar esfuerzos elevados durante mayor tiempo. Además, la realización del entrenamiento de los músculos respiratorios produjo un mantenimiento de la $PI_{máx}$, con valores de 24 y 25 cm_{H_2O} al inicio y al finalizar el estudio, respectivamente. Observamos limitaciones por parte de la paciente a la hora de realizar este tipo de pruebas ocasionadas por la falta de coordinación motriz. De hecho, la valoración de la $PE_{máx}$ no fue posible.

Como se indica en la **Tabla 6**, existió un incremento de la fuerza muscular máxima en todos los ejercicios evaluados tanto en miembros superiores como miembros inferiores, es decir, en el press de pecho, prensa de piernas y jalón por delante. De hecho, la paciente consiguió movilizar el doble de peso en el press de pecho al final *versus* al comienzo del programa de ejercicio físico.

Tabla 6. Resultados alcanzados durante test de 1 repetición máxima o RM en la fase de pre-intervención y post-intervención.

Ejercicio	Momento de estudio		Cambio %
	Pre-intervención	Post-intervención	
Press de pecho (kg)	4,0	7,6	+90
Prensa de piernas (kg)	28	43,5	+55
Jalón por delante (kg)	9	11,5	+27,8

Las ganancias en los niveles de fuerza muscular se acompañaron de una mejora en la fuerza de presión manual en ambas manos (**Tabla 7**). Sin embargo, en los test funcionales TUG y TUDS no existieron mejoras con el entrenamiento.

Tabla 7. Resultados obtenidos en la valoración de la capacidad funcional de la paciente con meduloblastoma al inicio y al final de la intervención.

Prueba	Momento de estudio		Cambio %
	Pre-intervención	Post-intervención	
TUG (segundos)	12,7	14	-10,2
TUDS (segundos)	83	90	-8,4
Hand grip (derecha)	16	20	+25
Hand grip (izquierda)	23	26	+13

Abreviaturas. TUG, *Timed Up and Go*. TUDS, *Timed Up and Down Stairs*

4. PARTE 3.- SUPERVIVIENTES DE CÁNCER PEDIÁTRICO

4.1. Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

En supervivientes de tumores sólidos, la previa realización de ejercicio físico supervisado intrahospitalario durante la fase de tratamiento se asocia a una menor tasa de morbilidad/recidivas, a un mejor perfil clínico, sanguíneo y funcional, y a una mayor calidad de vida.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar los efectos del ejercicio físico en el cáncer pediátrico (tumores sólidos) a través de una aproximación epidemiológica en supervivientes de tumores sólidos.

Objetivos específicos

1. Estudiar la asociación de la realización previa (transcurridos 6–8 años) de ejercicio físico supervisado intrahospitalario durante la fase de quimioterapia coadyuvante en niños con tumores sólidos, con: supervivencia, morbilidad/recidivas, capacidad física, estado de salud general y calidad de vida.
2. Comparar las citadas variables en supervivientes con una cohorte de niños sanos.

4.2. Metodología

Sujetos

Casos/supervivientes. Participantes en el ensayo PAPEC (NCT01645436)², el cual fue llevado a cabo por nuestro grupo de investigación desde febrero del año 2013 hasta marzo del año 2015 en el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (número de aprobación del proyecto por el Comité de Ética: R-0007/13). Participaron n=49 pacientes, distribuidos de la siguiente manera: grupo de ejercicio [n original=24 (3 fallecidos a día de hoy), 17 varones; duración media de la intervención con ejercicio físico de 19±2 semanas, a razón de 3 sesiones/semana], y grupo control [n=25 (4 fallecidos), 18 varones]. Por lo tanto, fueron incorporados todos aquellos supervivientes pediátricos de tumores sólidos de ambos sexos que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: 1) haber participado previamente en el ensayo PAPEC, y formado parte bien del grupo control (no realizaron un programa de ejercicio físico intrahospitalario, individualizado y supervisado) o del grupo de ejercicio (realizaron un programa de ejercicio durante la duración de su tratamiento contra el cáncer); y 2) estar libre de cáncer durante, al menos, 1 año (es decir, ser superviviente ≥1 año tras la finalización del tratamiento). Los criterios de exclusión fueron: 1) no disponer de unos niveles de condición física que permitiesen la realización de las pruebas

físicas requeridas en este subproyecto; y 2) no hablar ni comprender la lengua española.

Controles. Niños, adolescentes y adultos jóvenes residentes en Madrid pareados con los casos para edad y sexo (ratio 3:1, n=150). Los controles fueron reclutados entre los participantes al campamento de verano realizado en la Universidad Europea de Madrid en los meses de junio y julio, y entre alumnos (adultos jóvenes) de la misma Universidad a lo largo de la duración del proyecto. Criterios de inclusión: 1) no tener ni haber sido diagnosticado de cáncer previamente; 2) estar libre de enfermedad cardiovascular, hepática, renal y/o respiratoria conocidas; y 3) no presentar contraindicaciones médicas incompatibles con la práctica de ejercicio físico, como son la alteración de la coagulación, anemias graves, presencia de hipertensión arterial no controlada, arritmias cardíacas no controladas o hipertensión de las arterias pulmonares. Criterios de exclusión: 1) no disponer de unos niveles de condición física que permitan la realización de las pruebas físicas requeridas en este subproyecto; y 2) no hablar ni comprender la lengua española.

Diseño de estudio

El diseño de este estudio se elaboró teniendo en cuenta los principios éticos para la investigación clínica recogidos en la Declaración de Helsinki, la Ley Orgánica 15/1999 de protección de datos de carácter personal y el Real Decreto que la desarrolla (RD 1720/2007). Además, la realización de este proyecto implica la utilización de muestras biológicas las cuales serán tratadas de acuerdo a la Ley de Investigación Biomédica 14/2007 y el Real Decreto 1716/2011.

Se trató de un estudio observacional prospectivo de una cohorte de supervivientes de cáncer, y además también se contempla un diseño/estudio transversal *caso-control*, siendo los *casos* la totalidad de la citada cohorte de supervivientes de tumores sólidos (hayan hecho ejercicio o no) y los *controles*, sujetos que no hubiesen padecido cáncer pediátrico (o sanos).

Medición de las variables de estudio

Variables clínicas

Supervivencia, morbilidad/recidivas. Recopilación de información de las historias clínicas correspondiente a cada año adicional de supervivencia del sujeto, desde la finalización de su tratamiento hasta la actualidad o defunción: a) variables relativas al cáncer: tipo y etapa del tumor, tratamiento y duración; b) variables antropométricas: peso, talla, IMC; c) sanguíneas: linfocitos, leucocitos, urea, hemoglobina, hematocrito, plaquetas, transaminasas, fibrinógeno, glucosa, creatinina, albúmina, colesterol, índice HOMA; d) variables cardiológicas: tensión arterial, aparición de eventos cardíacos; y e) variables respiratorias: volumen máximo de aire espirado forzado en el primer segundo y capacidad vital forzada. A partir de la información

obtenida de la recopilación de las variables clínicas, calcularemos la morbilidad relativa a ser superviviente de cáncer pediátrico.

La capacidad física (capacidad aeróbica y fuerza muscular), la capacidad funcional, los niveles de actividad física, la $PI_{m\acute{a}x}/PE_{m\acute{a}x}$ y la composición corporal son valorados de la misma manera que ha sido descrita en los pacientes con neuroblastoma.

Fatiga y calidad de vida

Cuestionario PedsQL 3.0 y el SF-36 (versiones en castellano).

Función cardíaca

Electrocardiograma, ecocardiografía (fracción de eyección y de acortamiento del ventrículo izquierdo).

Capacidad pulmonar.

Capacidad vital forzada (CVF) y volumen espiratorio forzado (VEF1), son analizados con un ergoespirómetro (Vmax 29C).

Perfil sanguíneo/orina

En plasma, perfil hepático (“Human Liver Injury Magnetic Bead Panel”, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y metabólico (“Human Obesity Array Q3”, RayBiotech, Inc., Norcross, Georgia); en orina, función renal (“Human Kidney Injury Magnetic Bead Panel 1”, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). El análisis del perfil hepático y metabólico, y la función renal se realizará siguiendo el protocolo establecido por el fabricante de los kits a utilizar.

4.3. Resultados

La labor de investigación realizada en esta parte del proyecto se resume en las siguientes publicaciones científicas y en otras actividades alcanzadas por el equipo de investigación:

Publicaciones en revistas de impacto nombrando explícitamente a la Fundación Unoentrecienmil y agradeciendo su financiación:

Morales JS, Valenzuela PL, Rincón-Castanedo C, Takken T, Fiuza-Luces C, Santos-Lozano A, Lucia A. Exercise training in childhood cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer Treat Rev.* 2018 Nov;70:154-167. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.08.012. Epub 2018 Sep 3. Review. PubMed PMID: 30218787.

Morales JS, Padilla JR, Valenzuela PL, Santana-Sosa E, Rincón-Castanedo C, Santos-Lozano A, Herrera-Olivares AM, Madero L, San Juan AF, Fiuza-Luces C, Lucia A. Inhospital

exercise training in children with cancer: Does it work for all? *Front Pediatr.* 2018 Dec 19;6:404. doi: 10.3389/fped.2018.00404. eCollection 2018. PubMed PMID: 30619798; PubMed Central PMCID: PMC6305726.

Morales JS, Valenzuela PL, Rincón-Castanedo C, Santos-Lozano A, Fiuza-Luces C, Lucia A. Is health status impaired in childhood cancer survivors? A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2019. 2019;142:94-118.

Morales JS, Santana-Sosa E, Santos-Lozano A, Baño-Rodrigo A, Valenzuela PL, Rincón-Castanedo C, Fernández-Moreno D, González Vicent M, Pérez-Somarrriba M, Madero L, Lassaletta A, Fiuza-Luces C, Lucia A. Inhospital exercise benefits in childhood cancer: A prospective cohort study. *Scand J Med Sci Sports.* 2019 [Epub ahead of print].

Los documentos originales de estos artículos pueden encontrarse en los *documentos adjuntos denominados “Artículo_Cancer Treatment Reviews”, “Artículo_Frontiers in Pediatrics”, “Artículo_Critical Reviews in Oncology/Hematology” y “Artículo_Scand J Med Sci Sports”.*

Premio: Primer galardón en los Premios Nacionales de Investigación en Medicina del Deporte Liberbank (2018). Fecha de publicación: 22 de Marzo de 2019. Título: “Beneficios de un programa de ejercicio físico intrahospitalario en niños con cáncer”. Autores: Santana Sosa, Elena; Santos Lozano, Alejandro; Baño Rodrigo, Antonio; Valenzuela Tallón, Pedro Luis; Rincón Castanedo, Cecilia; Fernández Moreno, David; Martín Ruiz-Valdepeñas, Asunción; Castillo García, Adrián; Pérez-Somarrriba Moreno, Marta; González Vicent, Marta; Madero López, Luis; Lassaletta Atienza, Álvaro; Fiuza Luces, Carmen y Lucía Mulas, Alejandro.

La información relativa al citado Premio puede ser encontrada en los *documentos adjuntos denominados “Premio_Redacción”* (en el que redactamos de manera detallada los resultados obtenidos en esta parte del proyecto) y *“Premio_Carta de Concesión”* (proporcionado por la Universidad de Oviedo).

Congreso: Herrero B, Morales JS, Herrera-Olivares AM, Rincón-Castanedo C, Fiuza-Luces C. Impacto del cáncer y sus terapias sobre la condición física en largos supervivientes de cáncer pediátrico. XII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátricas. Jerez de la Frontera, España, 30 de Mayo–1 de Junio de 2019. El abstract enviado y aceptado por el comité organizador del congreso está en el *documento adjunto denominado “Congreso_SEHOP 2019”.*

Jornada: III Jornada de Investigación Sanitaria de la Comunidad de Madrid. Dirección General de Investigación, Docencia y Documentación de la Comunidad de Madrid. 28 de Noviembre de 2019. Aula Profesor Ortiz Vázquez del Hospital General de La Paz. Título: Ejercicio físico intrahospitalario como tratamiento coadyuvante en pacientes pediátricos. Ponente: Carmen Fiuza-Luces.

5. MEMORIA ECONÓMICA

El importe económico concedido por la Fundación Unoentrecienmil para cada partida del proyecto fue utilizado íntegramente para el desarrollo del proyecto de investigación.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fiuza-Luces, C. *et al.* Effects of Exercise on the Immune Function of Pediatric Patients With Solid Tumors: Insights From the PAPEC Randomized Trial. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **96**, 831–837 (2017).
2. Fiuza-Luces, C. *et al.* Exercise Intervention in Pediatric Patients with Solid Tumors: The Physical Activity in Pediatric Cancer Trial. *Med. Sci. Sports Exerc.* **49**, 223–230 (2017).
3. Braith, R. W. Role of exercise in rehabilitation of cancer survivors. *Pediatr. Blood Cancer* **44**, 595–599 (2005).
4. Faigenbaum, A. D. *et al.* Youth resistance training: updated position statement paper from the national strength and conditioning association. *J. strength Cond. Res.* **23**, S60-79 (2009).
5. Varni, J. W., Burwinkle, T. M., Katz, E. R., Meeske, K. & Dickinson, P. The PedsQL in pediatric cancer: reliability and validity of the Pediatric Quality of Life Inventory Generic Core Scales, Multidimensional Fatigue Scale, and Cancer Module. *Cancer* **94**, 2090–106 (2002).
6. Santana Sosa, E. *et al.* Intrahospital weight and aerobic training in children with cystic fibrosis: a randomized controlled trial. *Med. Sci. Sports Exerc.* **44**, 2–11 (2012).
7. Aldrich, T. K. & Spiro, P. Maximal inspiratory pressure: does reproducibility indicate full effort? *Thorax* **50**, 40–3 (1995).
8. Evenson, K. R., Catellier, D. J., Gill, K., Ondrak, K. S. & McMurray, R. G. Calibration of two objective measures of physical activity for children. *J. Sports Sci.* **26**, 1557–65 (2008).
9. Eddolls, W. T. B., McNarry, M. A., Stratton, G., Winn, C. O. N. & Mackintosh, K. A. High-Intensity Interval Training Interventions in Children and Adolescents: A Systematic Review. *Sport. Med.* **47**, 2363–2374 (2017).
10. Pareja-Blanco, F. *et al.* Evolution of Determinant Factors of Repeated Sprint Ability. *J. Hum. Kinet.* **54**, 115–126 (2016).

11. Pareja-Blanco, F. *et al.* Acute and delayed response to resistance exercise leading or not leading to muscle failure. *Clin. Physiol. Funct. Imaging* **37**, 630–639 (2017).
12. Fiuza-Luces, C. *et al.* Effects of exercise interventions in graft-versus-host disease models. *Cell Transpl.* **22**, 2409–2420 (2013).
13. Aartsma-Rus, A. & van Putten, M. Assessing functional performance in the mdx mouse model. *J. Vis. Exp.* (2014). doi:10.3791/51303
14. Powers, S. K. *et al.* Regional training-induced alterations in diaphragmatic oxidative and antioxidant enzymes. *Respir. Physiol.* **95**, 227–37 (1994).
15. Medja, F. *et al.* Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* **9**, 331–9 (2009).
16. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–5 (2012).
17. Welinder, C. & Ekblad, L. Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J. Proteome Res.* **10**, 1416–9 (2011).
18. Wapnir, I. L., Wartenberg, D. E. & Greco, R. S. Three dimensional staging of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **41**, 15–9 (1996).
19. Haraguchi, S. & Nakagawara, A. A simple PCR method for rapid genotype analysis of the TH-MYCN transgenic mouse. *PLoS One* **4**, e6902 (2009).
20. González-Saiz, L. *et al.* Benefits of skeletal-muscle exercise training in pulmonary arterial hypertension: The WHOLEi+12 trial. *Int. J. Cardiol.* **231**, 277–283 (2017).
21. Ashford, J. M. *et al.* Adaptive functioning of childhood brain tumor survivors following conformal radiation therapy. *J. Neurooncol.* **118**, 193–9 (2014).
22. Saha, A. *et al.* Late effects in survivors of childhood CNS tumors treated on Head Start I and II protocols. *Pediatr. Blood Cancer* **61**, 1644-52; quiz 1653-72 (2014).
23. Bull, K. S. *et al.* Screening for cognitive deficits in 8 to 14-year old children with cerebellar tumors using self-report measures of executive and behavioral functioning and health-related quality of life. *Neuro. Oncol.* **17**, 1628–36 (2015).
24. Casnar, C. L. & Klein-Tasman, B. P. Parent and Teacher Perspectives on Emerging Executive Functioning in Preschoolers With Neurofibromatosis Type 1: Comparison to Unaffected Children and Lab-Based Measures. *J. Pediatr. Psychol.* **42**, 198–207 (2017).
25. Maselko, J. *et al.* Effect of an early perinatal depression intervention on long-term

- child development outcomes: follow-up of the Thinking Healthy Programme randomised controlled trial. *The lancet. Psychiatry* **2**, 609–17 (2015).
26. Saury, J.-M. G. & Emanuelson, I. Cognitive consequences of the treatment of medulloblastoma among children. *Pediatr. Neurol.* **44**, 21–30 (2011).
27. Umfleet, L. G., Ryan, J. J., Gontkovsky, S. T. & Morris, J. Estimating WAIS-IV indexes: proration versus linear scaling in a clinical sample. *J. Clin. Psychol.* **68**, 390–6 (2012).
28. Schoch, B. *et al.* Impact of surgery and adjuvant therapy on balance function in children and adolescents with cerebellar tumors. *Neuropediatrics* **37**, 350–8 (2006).

7. FIRMAS

Quedamos a su entera disposición para atender a cualquier cuestión que desee aclarar.

Firmado a fecha de 20 de Julio de 2020



Investigador Principal
Alejandro Lucía Mulas



Co-Investigadora Principal
Carmen Fiuza Luces