

1.- Presentación del proyecto

Nombre del proyecto: Estudio de caracterización de sarcomas similares al Sarcoma de Ewing. Fusiones génicas en sarcomas y biopsia líquida.

Hospital: Virgen del Rocío, Sevilla

Investigador/a Principal: Enrique de Álava, Juan Díaz Martín

2.- Necesidades previas del proyecto

El proyecto que desarrollamos requiere un gasto elevado en reactivos para preparación de librerías, secuenciación masiva (NGS) y personal cualificado técnicamente para estas actividades. Tenemos otros gastos de menor cuantía para reactivos empleados en otras técnicas: TMA-IHC, FISH, RT-PCR, Sanger seq, ddPCR...

3.- ¿En qué os ayuda APU?

La financiación que recibimos de APU se utiliza para la adquisición de los **reactivos** necesarios para los ensayos de NGS, IHQ, FISH, RT-PCR, Sanger seq, ddPCR...

También dedicamos una parte a **financiar contratos de personal** implicado en el proyecto.

Gastos derivados de la **publicación de artículos científicos**. What's in a name? Molecular subclassification of sarcomas creates fresh challenges[†]

Journal of Pathology
J Pathol 2019

Juan Díaz-Martín[‡], Michele Biscuola[‡], Jonatan Benoit, David Marcilla, Gema Civantos and Enrique de Álava^{*†}

Asistencia a congresos nacionales e internacionales para comunicar nuestros resultados.



SeAP-IAP



OFP-01-014

Detection of NAB2-STAT6 gene fusions in solitary fibrous tumour by targeted RNA-seq

J. Díaz-Martín*, E. Aguado, M. Biscuola, M. Delgado, M. Hernández-Barrera, D. Marcilla, J. Martín-Broto, E. de Alava

[‡]IBiS-HUVR, Molecular Pathology, Lab203, Sevilla, Spain

OFP-07-007

Experience in differential diagnosis of Ewing sarcoma and Ewing-like sarcoma by targeted RNA-seq

J. Díaz-Martín*, M. Biscuola, E. Aguado, M. Delgado, A. Blaco-Lobo, D. Marcilla, E. de Alava

[‡]IBiS-HUVR, Molecular Pathology, Lab203, Sevilla, Spain

4.- Logros

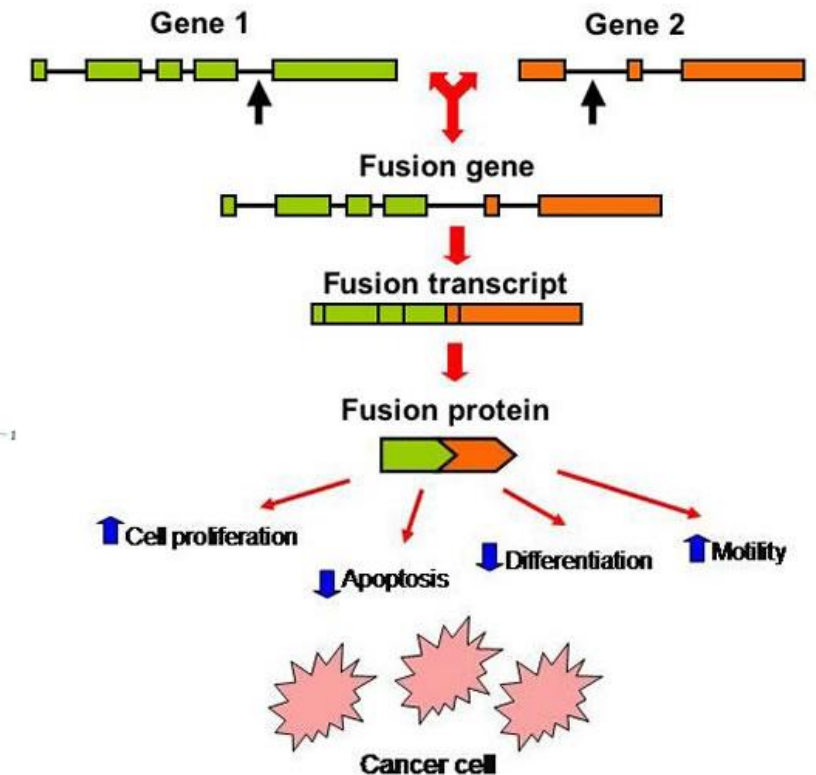
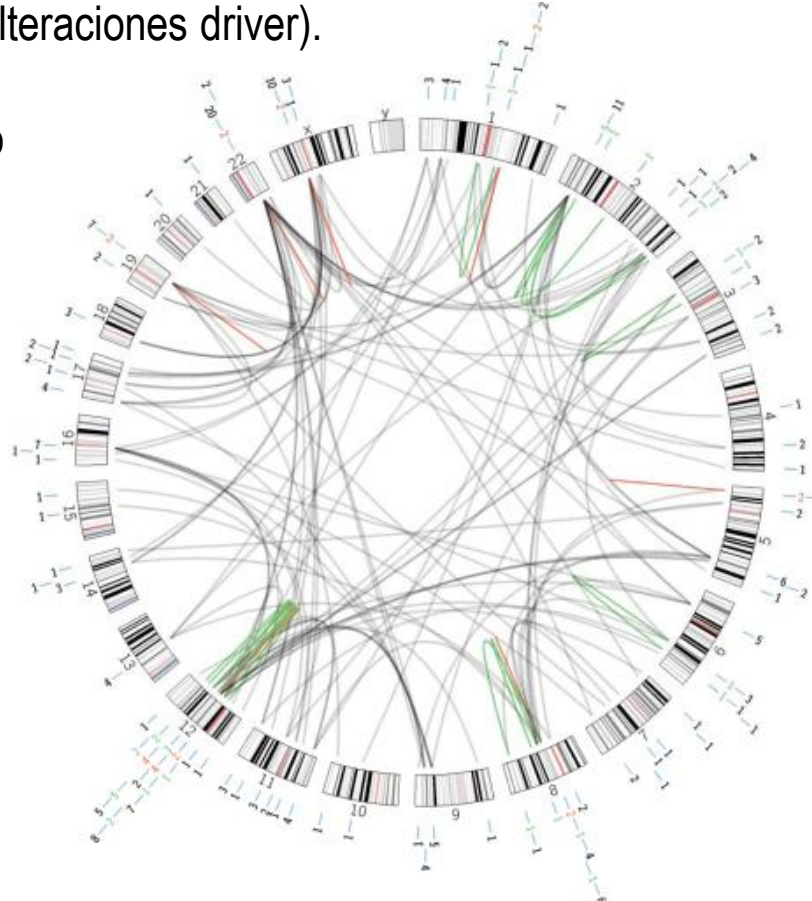
- Implementación de la tecnología de secuenciación dirigida de RNA para el diagnóstico de precisión de sarcomas con translocaciones: Estudio de validación y evaluación prospectiva de muestras en la rutina asistencial.
- Caracterización y algoritmo para el diagnóstico diferencial de Sarcoma de Ewing y Ewing-like.
- Estudio de concordancia entre determinaciones moleculares en el Tumor Fibroso Solitario.
- Puesta a punto para la detección de transcritos de fusión en muestras de biopsia líquida.

Diagnóstico de precisión de Sarcomas con translocaciones

Es importante un diagnóstico preciso y temprano para establecer el tratamiento adecuado lo antes posible. El diagnóstico de los Sarcomas óseos y de tejidos blandos suele ser complicado: Entidades raras y grupo heterogéneo de neoplasias con más de 100 tipos diferentes, que a menudo presentan características histomorfológicas solapantes.

Aprox. la mitad de los Sarcomas se caracterizan por la presencia de fusiones génicas (GF) recurrentes derivadas de translocaciones cromosómicas. Estos genes de fusión tienen un papel muy relevante en el proceso de sarcomagénesis (alteraciones driver).

Los GF recurrentes son útiles como marcadores diagnósticos.



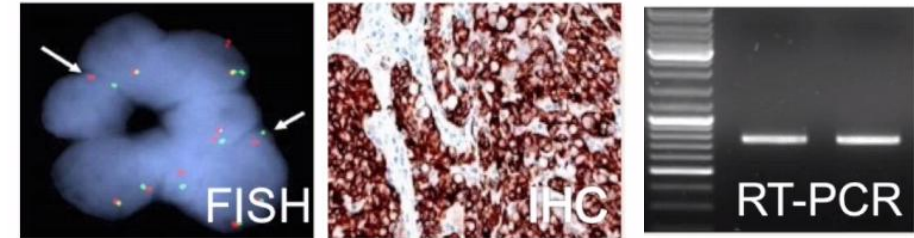
Las técnicas standard / de rutina para identificar GF son RT-PCR y FISH



Técnicas laboriosas que no permiten la determinación de más de un GF en cada ensayo cuando el diagnóstico es incierto

RT-PCR: ambos genes de la fusión y el punto de rotura deben ser conocidos para el diseño del ensayo

FISH: baja resolución, cuando los dos genes se localizan próximo es difícil de evaluar. No da información sobre el otro gen implicado



Secuenciación masiva dirigida de RNA (Targeted RNA-seq)

Permite detectar simultáneamente en un mismo ensayo todas las fusiones conocidas.

Permite identificar nuevos GF y nuevas variantes de GF.

Información sobre el nivel de expresión.



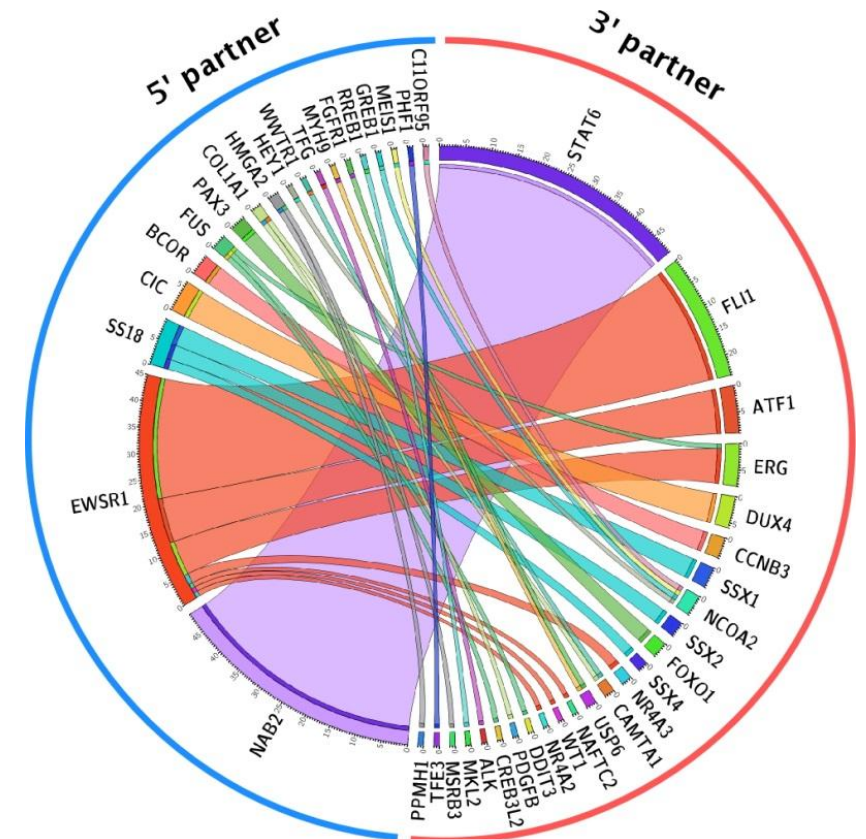
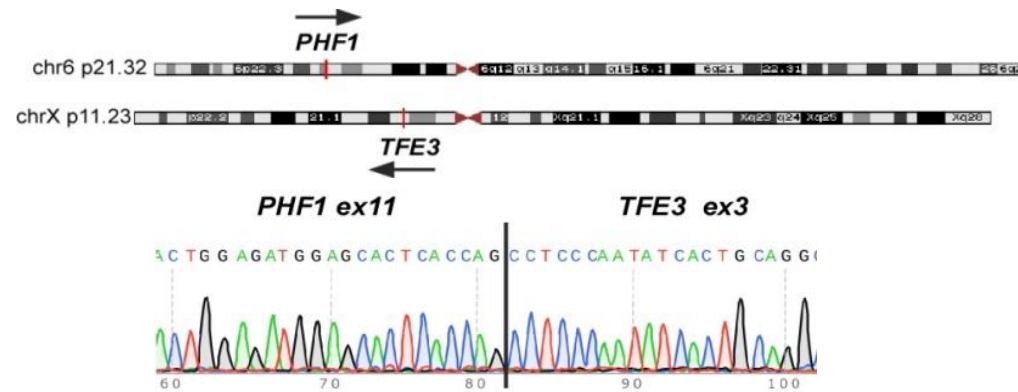
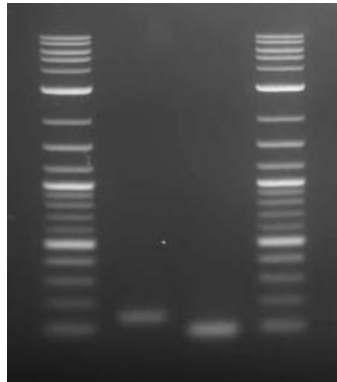
Diagnóstico de precisión de Sarcomas con translocaciones. Estudio de validación RNA-seq

210 tumor samples analyzed by RNA-seq, comprising specimens from 2011-2018

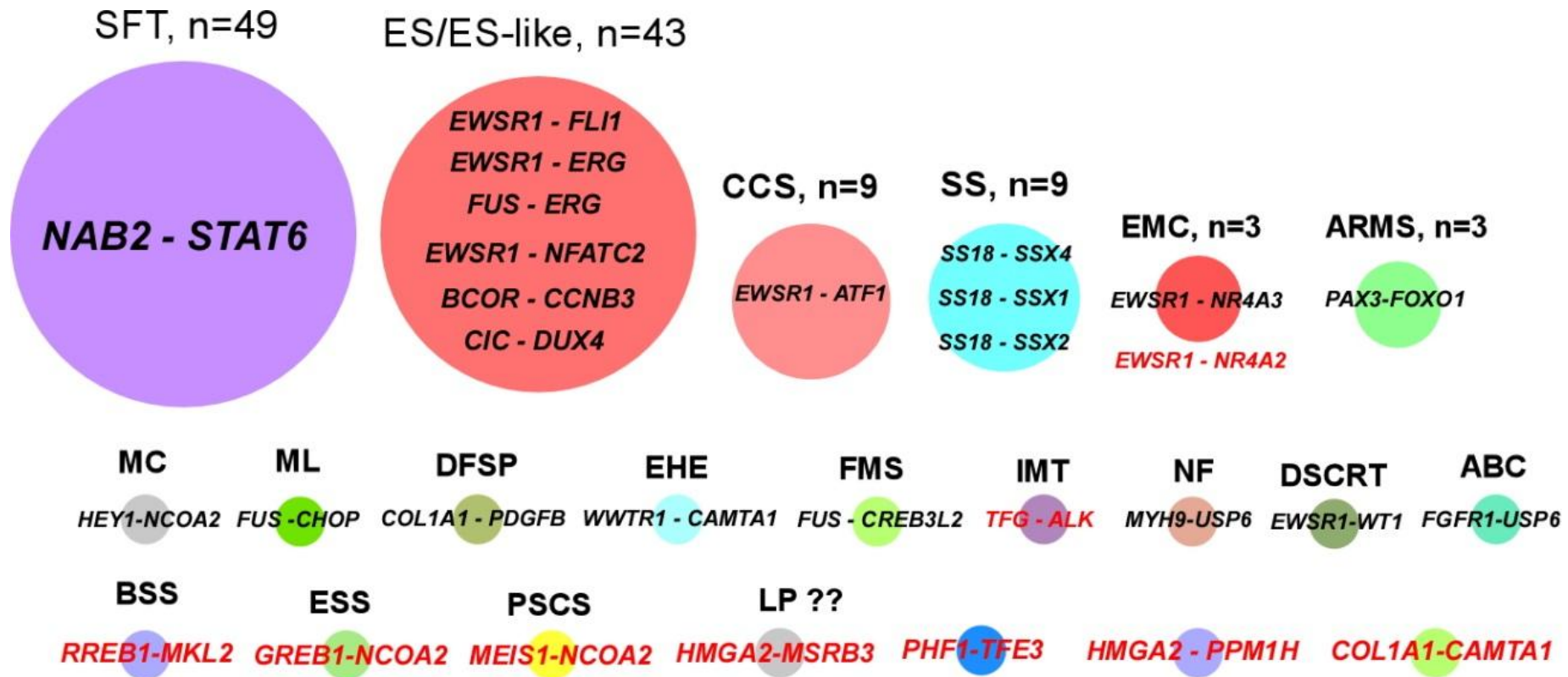
163 samples passing QC (80%), most of failing samples >5years

136 samples with GF, 27 samples without GF (many of them UPS)

9 novel or rare GFs, confirmed by FISH or RT-PCR-Sanger seq



Diagnóstico de precisión de Sarcomas con translocaciones. Estudio de validación RNA-seq

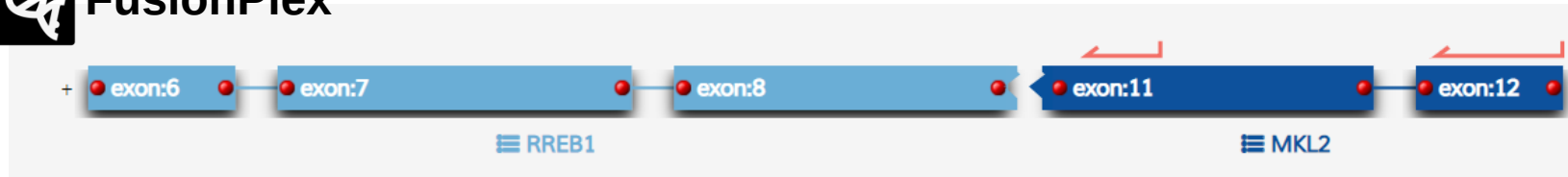


- Buena concordancia entre FISH y RNA-seq (66/67) en un subconjunto de casos, excluyendo SFT.
- Las GF son consistentes con el diagnóstico morfológico previo.

Diagnóstico de precisión de Sarcomas con translocaciones en la rutina asistencial



FusionPlex



RREB1ex8-MKL2ex11



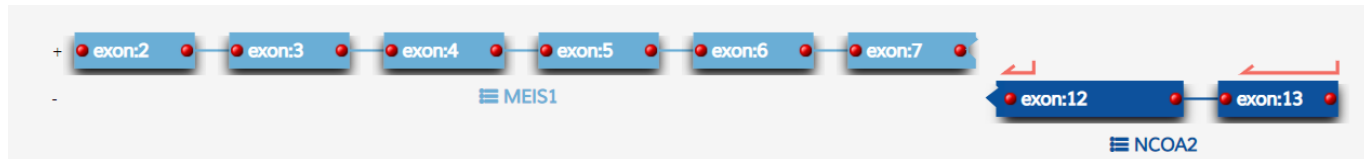
Biomarker for a new entity??

Ectomesenchymal Chondromyxoid Tumor
A Neoplasm Characterized by Recurrent RREB1-MKL2 Fusions

Dickson et al, 2018



FusionPlex



MEIS1-NCOA2



Biomarker for a new entity??

Expanding the Spectrum of Intraosseous
Rhabdomyosarcoma
Correlation Between 2 Distinct Gene Fusions and Phenotype

Agaram et al, 2019

Diagnóstico de precisión de Sarcomas con translocaciones en la rutina asistencial

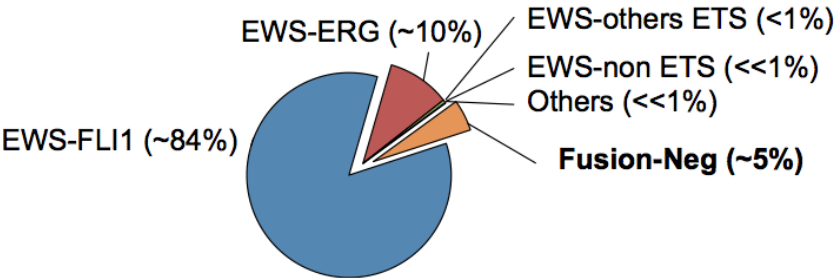
Cartera de Biomarcadores en Cáncer Sistema Sanitario Público de Andalucía, SSPA Parte I

Enero 2019

Hemos conseguido incorporar la secuenciación de
Sarcomas en la cartera de servicios del SAS

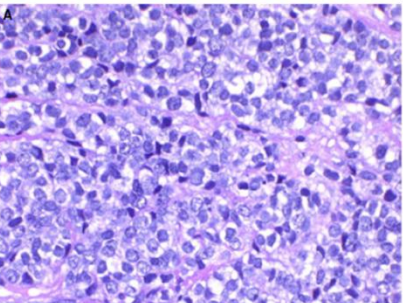
NEOPLASIAS DE HUESO Y PARTES BLANDAS
Línea somática
FOS-B: hemangioma epiteliode
ROS-1: tumor miofibroblástico inflamatorio
CAMTA-1: hemangioendotelioma epiteliode (HEE)
EWSR1 22q12: sarcoma de Ewing
FOXO1-FKHR: rabdomiosarcoma alveolar
SYT/SS18: sarcoma sinovial
FUS 16q11: liposarcoma mixoide/sarcoma fibromixioide bajo grado/histiocitoma
CHOP 12q13: liposarcoma mixoide
RMSE 11q15.5: rabdomiosarcoma embrionario
MDM2: liposarcoma pleomórfico
RB-1: miofibroblastoma, lipoma fusocelular....
CDk4: liposarcoma bien diferenciado/ desdiferenciado
TFE3: hemangioendotelioma epiteliode y Sarcoma alveolar
NGS secuenciación masiva de fusiones génicas
USP6: quiste óseo aneurismático
NR4A3: condrosarcoma mixoide extraesquelético
JAZF1: sarcoma del estroma endometrial de bajo grado
YWHAE: sarcoma andometrial de alto grado
STAT-6: tumor fibroso solitario, por inmunohistoquímica
IDH1/2: condrosarcoma
BCOR: sarcomas con reordenamiento de BCOR, por inmunohistoquímica
ETV4 : sarcomas CIC-DUX, por inmunohistoquímica
H3G34W: tumor de células gigantes
H3K36M: condroblastoma
H3K27ME: tumor maligno de vaina neural periférica
WWTR1: hemangioendotelioma epiteliode

Diagnóstico diferencial de Sarcoma de Ewing y Ewing-like

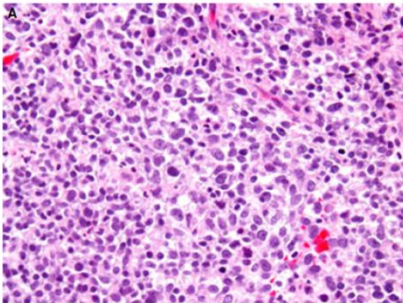


	Ewing Sarcoma	Ewing-like Sarcoma		
Fusion Gene	EWSR1-ETS	BCOR-CCNB3	CIC-DUX4	EWS-NFATc2
Genetics	Translocation t(11;22) 85% Translocation t(21;22) 10%	Inversion X(p11.4;p11.22)	Translocation t(4;19) Translocation t(10;19)	Translocation t(20;22)
Age	 Child Teenager Adult	 Child Teenager Adult	 Child Teenager Adult	 Child Teenager Adult
Sex ratio	 Male : female 1,4 : 1	 2 : 1	 2 : 1	 7 : 1
Primary tumor tissue	 Soft tissue : Bone 0.12 : 1	 Soft tissue : Bone 0.2 : 1	 Soft tissue : Bone 1 : 0	 Soft tissue : Bone 0.14 : 1
Metastases	Frequent: lung, bone, bone marrow	Frequent: lung, bone, bone marrow	Frequent: lung	Rare
Histology	SRBC tumors, CD99+	SRBC tumors, CD99 +/- CCNB3+	SRBC tumors, CD99 +/- ETV4+	SRBC tumors, CD99+ lymphocytes infiltrates unknown
Prognosis	Poor if metastatic disease	Poor if metastatic disease	Poor	unknown

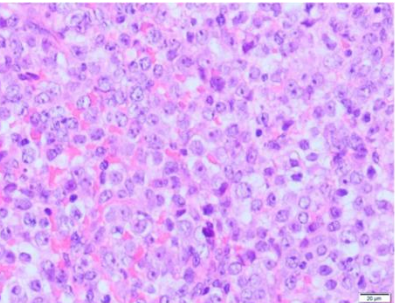
Franck Tirode
INSERMU830 / Institut Curie



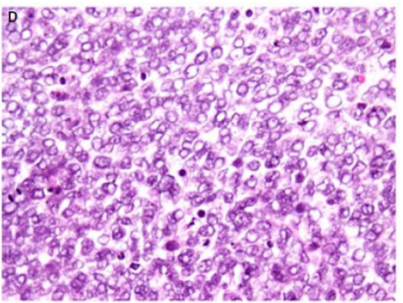
Classic ES



EWSR1-NFATC2

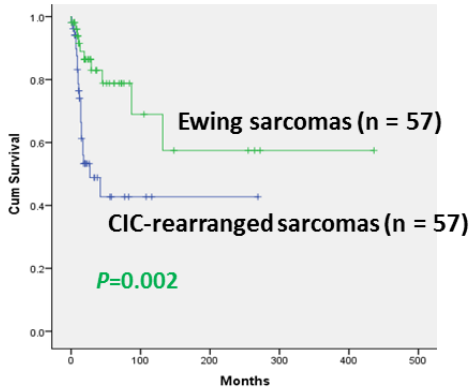


CIC-DUX4



BCOR-CCNB3

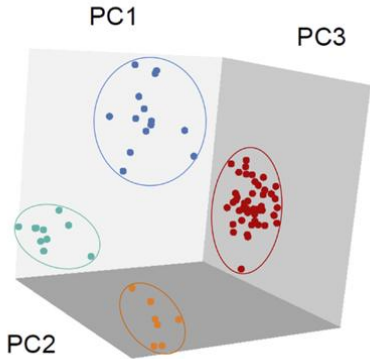
Antonescu CR, Amer J Surg Pathol 2017



poor response to
Ewing sarcoma neo-
adjuvant protocol

5-yr survival CIC : 43%
5-yr survival Ewing: 77%

Baldauf MC. et al., 2018



- Ewing sarcoma EWSR1-ETS
- Ewing-like sarcoma BCOR-CCNB3
- Ewing-like sarcoma CIC-DUX4
- EWSR1-NFATc2 sarcoma

Diagnóstico diferencial de Sarcoma de Ewing y Ewing-like

Series, n=35 casos con morfología compatible con ES / ELS

EWSR1 FISH+, n=18

EWSR1-FLI1, n=16

EWSR1-ERG, n=1

EWSR1-NFATC2, n=1

EWSR1 FISH -, n=10

EWSR1-FLI1, n=1

EWSR1-ERG, n=3

CIC-DUX4, n=3

BCOR-CCNB3, n=2

no fusion, n=1

EWSR1 FISH n/a, n=7

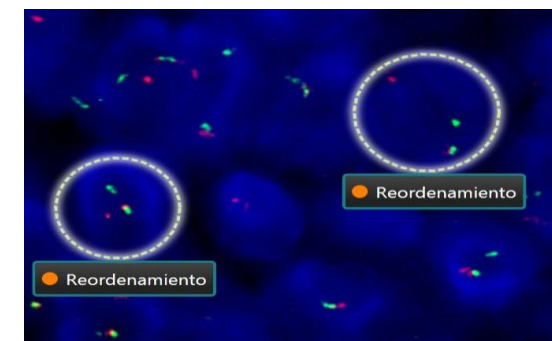
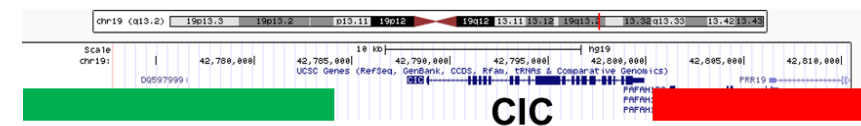
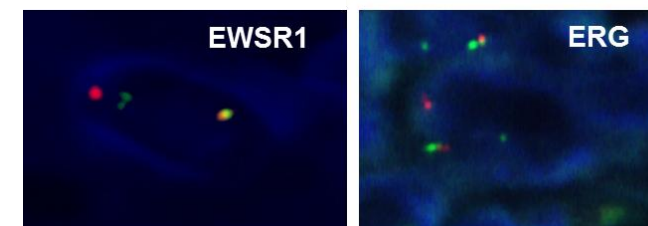
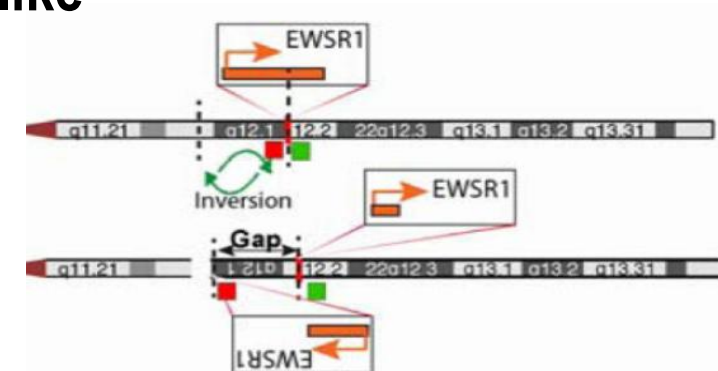
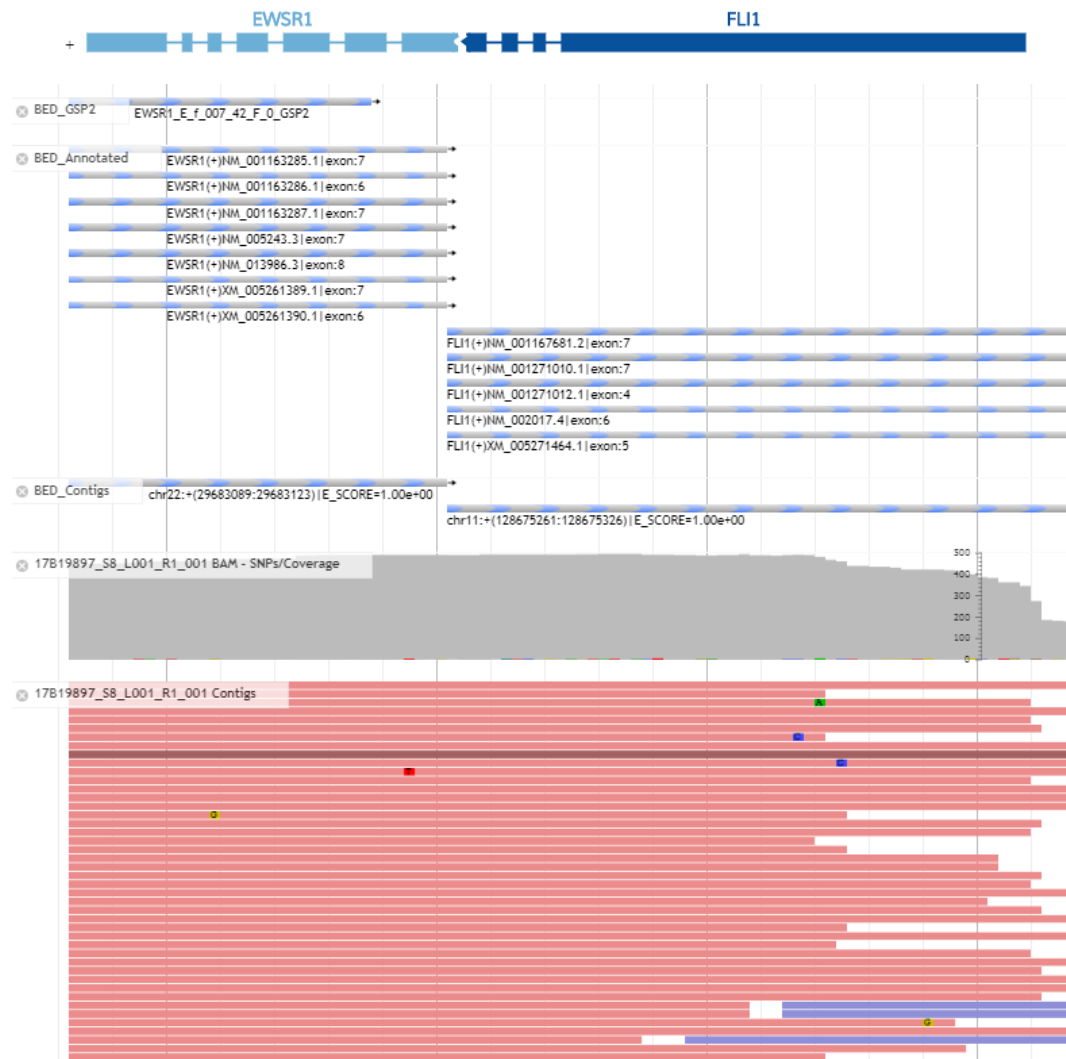
EWSR1-FLI1, n=1

EWSR1-ERG, n=2

CIC-DUX4, n=2

BCOR-CCNB3, n=1

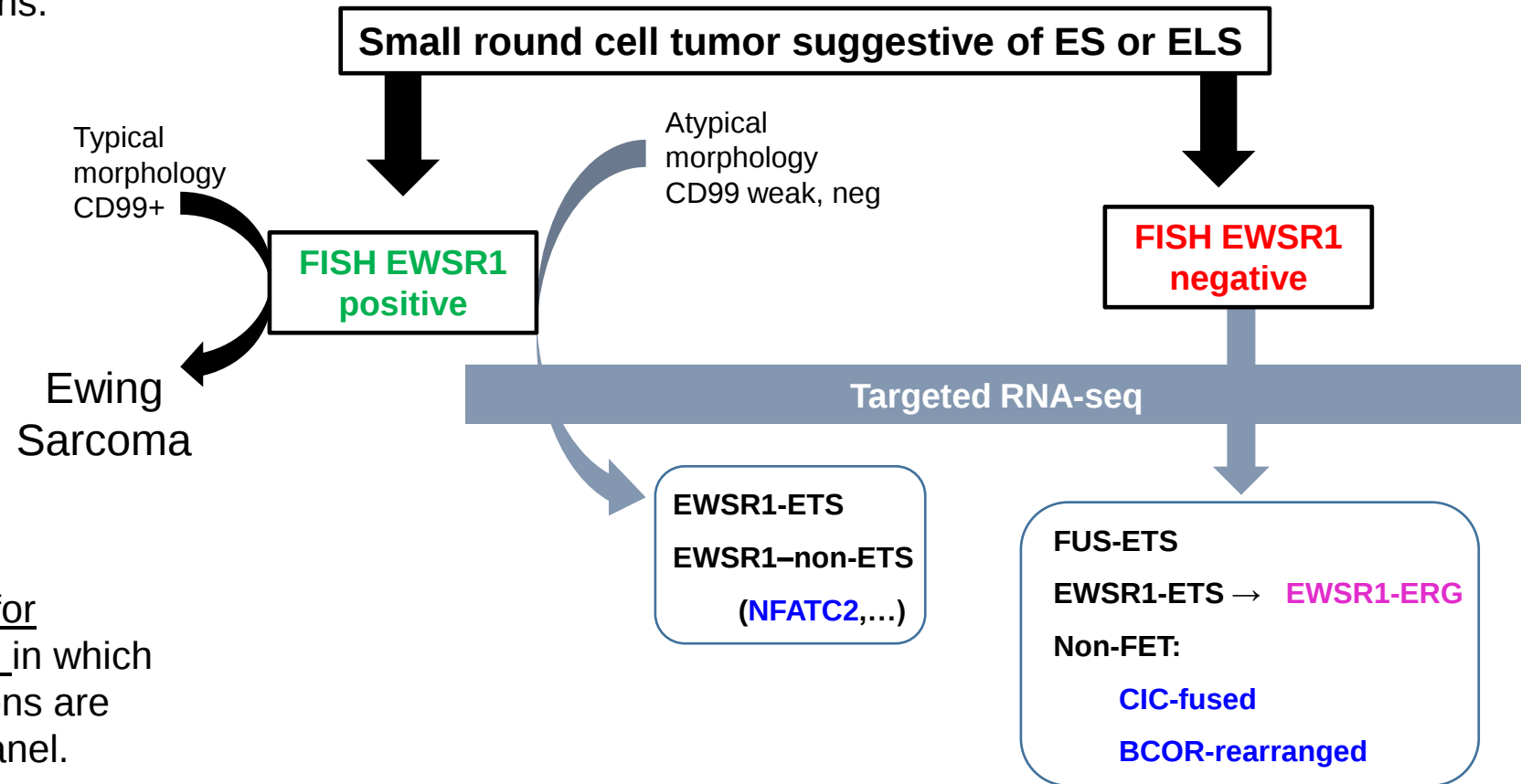
FUS-ERG, n=1



Diagnóstico diferencial de Sarcoma de Ewing y Ewing-like

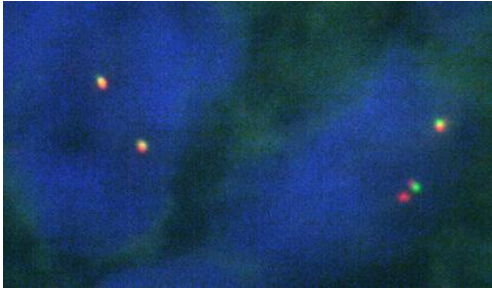
- Targeted RNA-seq outscores EWSR1 FISH determinations in the identification of ES pathognomonic gene fusions, overcoming common pitfalls such as low performance of FISH in detecting *EWSR1-ERG* fusions.
- RNA-seq panel simultaneously detects and identifies ELS pathognomonic gene fusions at reduced costs, circumventing tedious singleplex FISH probing.
- We propose a diagnostic algorithm for differential diagnosis of ES and ELS in which negative EWSR1 FISH determinations are followed by an RNA-seq targeted panel.

Algorithm for molecular diagnosis of ES / ELS

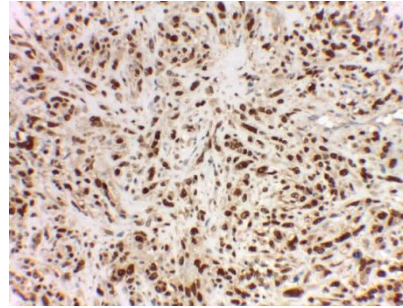


Estudio de concordancia entre determinaciones moleculares en el Tumor Fibroso Solitario

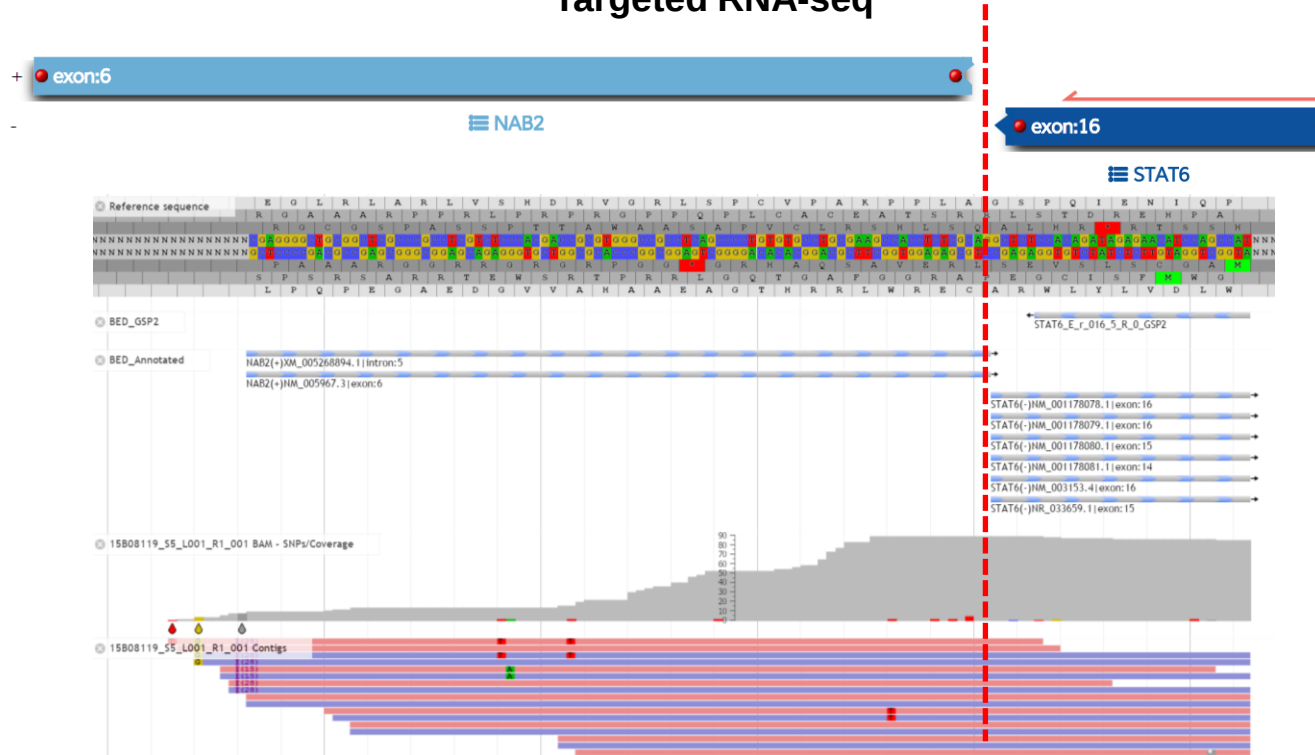
FISH *STAT6*



IHC *STAT6*



Targeted RNA-seq



- FISH assessment of NAB2-STAT6 is technically challenging.
- Targeted RNA-seq detects with high accuracy different variants of *NAB2-STAT6* fusion, not related to different histology.
- Targeted RNA-seq could be useful when SFT diagnosis is uncertain, and may prevent misdiagnosis of other mesenchymal tumors mimics expressing STAT6 protein.

THE LANCET
Oncology

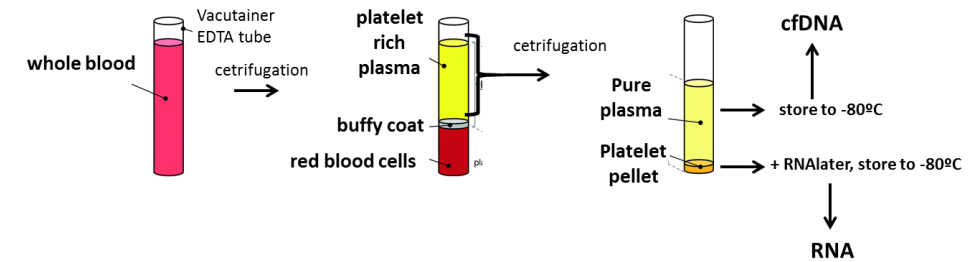
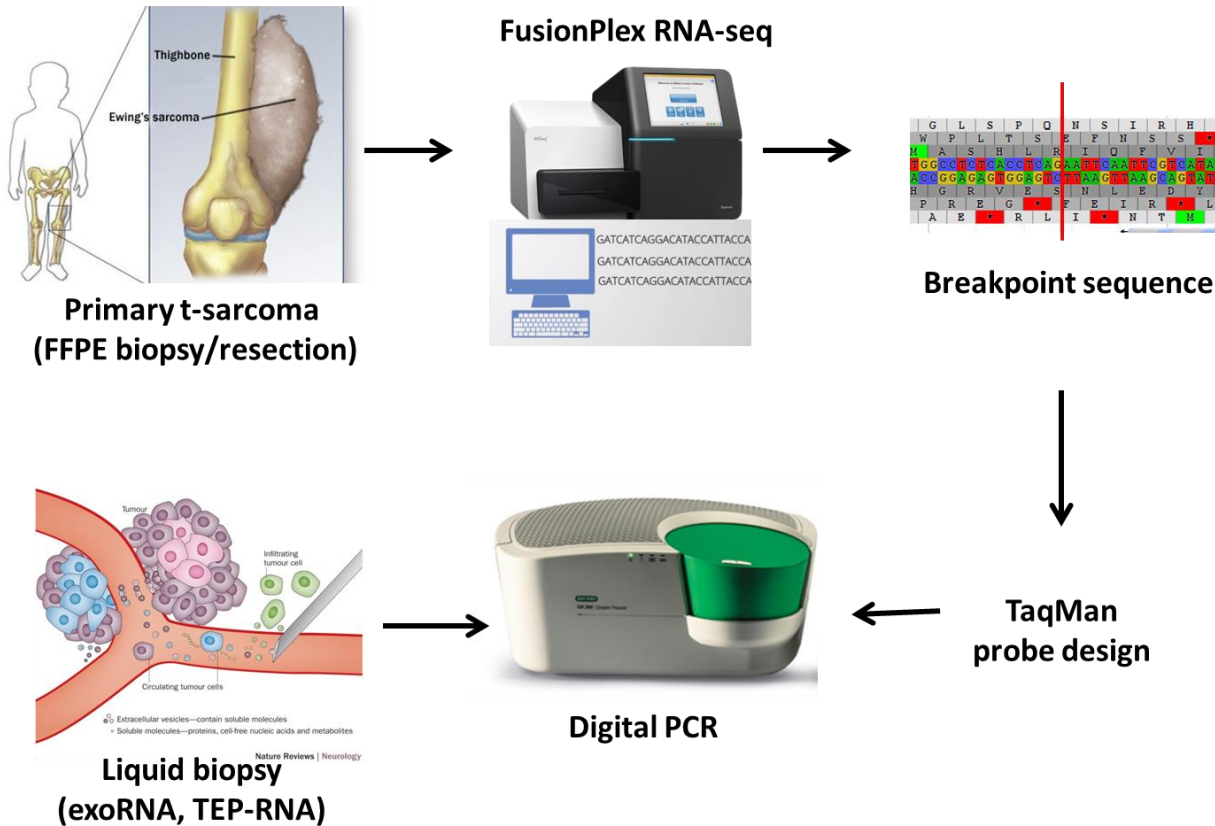
Pazopanib for treatment of advanced malignant and dedifferentiated solitary fibrous tumour: a multicentre, single-arm, phase 2 trial

Lancet Oncol 2019; 20: 134-44

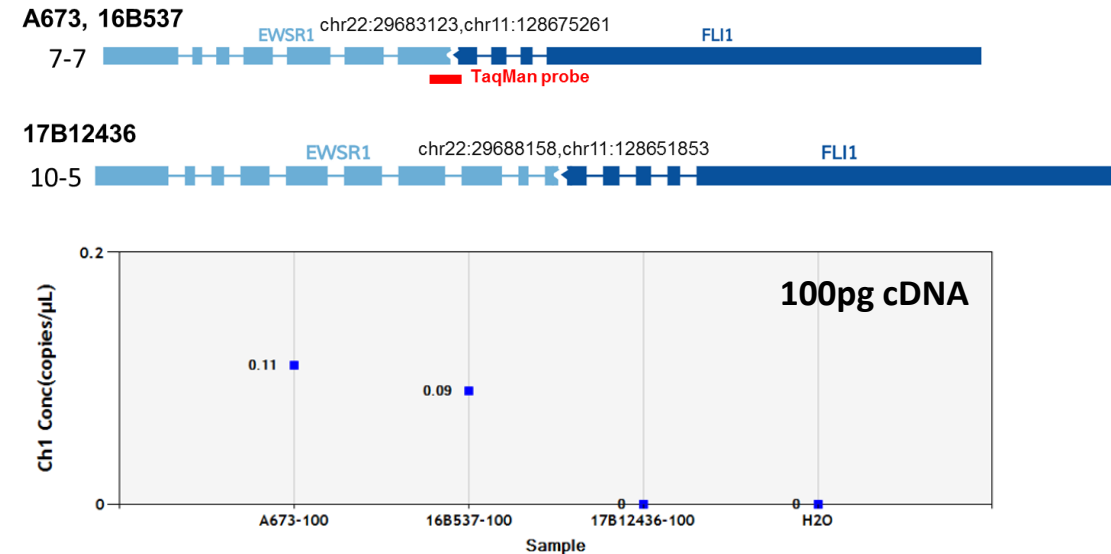
Javier Martin-Broto, Silvia Stacchiotti, Antonio Lopez-Pousa, Andres Redonda, Daniel Bernabeu, Enrique de Alava, Paolo G Casali, Antoine Italiano, Antonio Gutierrez, David S Moura, Maria Peña-Chilet, Juan Diaz-Martin, Michele Bisavola, Miguel Taron, Paola Collini, Dominique Ranchere-Vince, Xavier Garcia del Muro, Giovanni Grignani, Sarah Dumont, Javier Martinez-Trufero, Emanuela Palmerini, Nadia Hindi, Ana Sebio, Joaquin Dopazo, Angelo Paolo Dei Tos, Axel LeCesne, Jean-Yves Blay, Josefina Cruz

Detección de transcritos de fusión en muestras de biopsia líquida

La detección temprana de recidivas podría cambiar radicalmente la evolución de pacientes con alto riesgo, que tendrían más posibilidades de supervivencia



ddPCR: Detection of *EWSR1ex7-FLI1ex7* fusion transcript



5.- Visión de futuro

En base a nuestra experiencia, las determinaciones moleculares en Sarcomas deberían tener más implantación para un manejo clínico adecuado de los pacientes. En el futuro evaluaremos prospectivamente si los pacientes con diagnóstico preciso en el ámbito del CSUR presentan mejor pronóstico.

Participación en estudios internacionales multicéntricos para contribuir a la definición / caracterización de nuevas entidades clínico patológicas. *GRACeUI - Global collaboRAtion on CIC-DUX4 BCOR-CCN3 URCSs study*.

Armonización de criterios inclusión / diseño de ensayos clínicos. Iniciativa internacional *COG-Europe Bone Sarcoma Data Harmonization*

Nueva Edición WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone prevista para finales de año, en la que se incorporarán los últimos avances en la caracterización molecular de los Sarcomas.

Publicaciones científicas sobre los resultados obtenidos.

6.- Conclusiones

El RNA-seq dirigido es una solución óptima para la detección de GF en términos de coste y complejidad. Proporciona mejor sensibilidad y especificidad en la detección de GF en el entorno clínico.

Como centro de referencia de sarcomas (CSUR) en el sur de España, nuestro departamento recibe un volumen significativo de neoplasias mesenquimales, lo que permite la implementación efectiva de esta determinación molecular innovadora de forma centralizada.

La identificación de nuevos GF contribuirá a la caracterización y mejor clasificación molecular de los tumores mesenquimales.



Dept. Pathology

Enrique de Álava

Elena Aguado

David Marcilla

Michele Biscuola

Mercedes Delgado

María José Hernández

Angela Blanco



Biobank SSPA

Carolina Castilla

Fernando

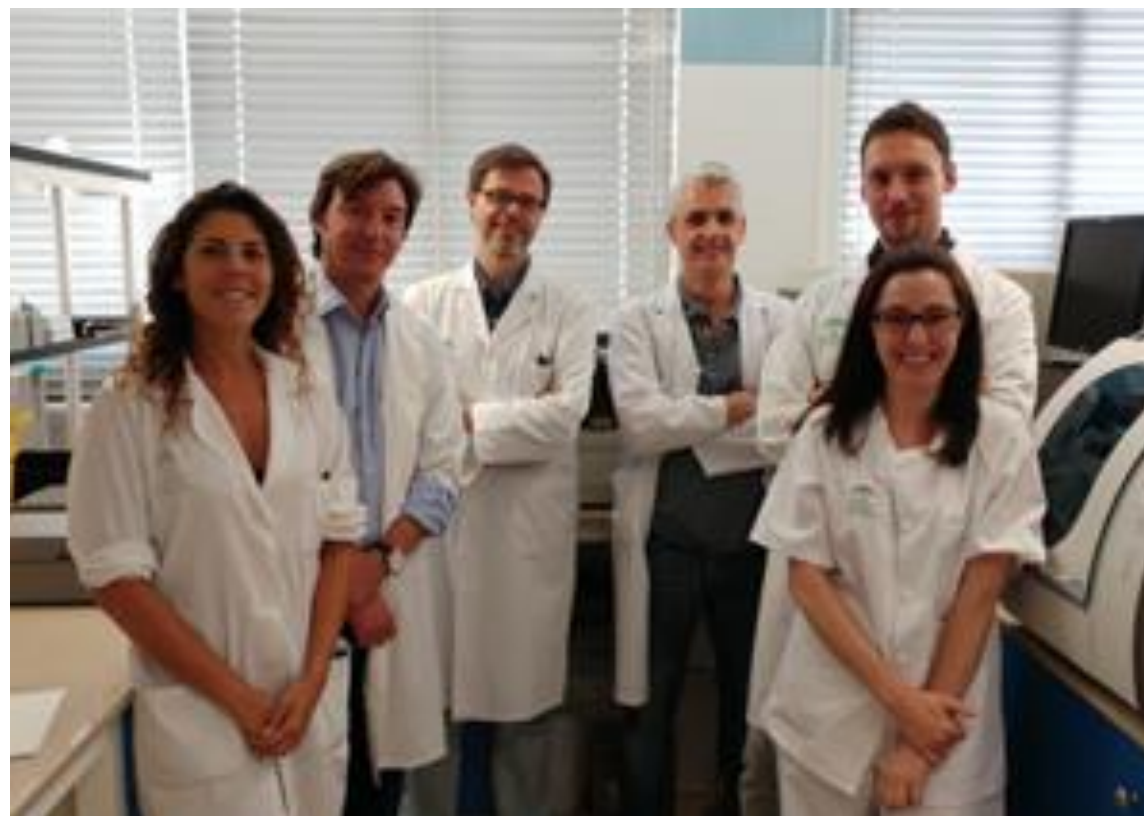
Carmona

Cristina Tous

Dept. Oncology

Javier Martín Broto

David Moura



Gracias!!!!!!!

