



## PROYECTO PARA LA **ASOCIACIÓN PABLO UGARTE**

**Título del proyecto: Creación de un registro/centro de caracterización de sarcomas similares al sarcoma de Ewing (*Ewing sarcoma-like*).**

**Investigador principal: Dr. Enrique de Álava.**

**Grupo de Patología Molecular de Sarcomas**

**Hospital Universitario Virgen del Rocío-Instituto de Biomedicina de Sevilla**

**Sevilla, Enero de 2015**



## **Introducción**

El Sarcoma de Ewing (SE) es una neoplasia agresiva de hueso y de partes blandas en la que la tasa de supervivencia actual es aún inferior al 20% en los pacientes con enfermedad primaria diseminada o recaída (*Haesler J et al., 2010*).

Los sarcomas de células redondas son un grupo heterogéneo de tumores que a menudo afectan a niños y adultos jóvenes y, si no se tratan, pueden seguir un curso clínico muy agresivo. Existen subtipos específicos de sarcoma de células redondas, como el sarcoma de Ewing o el rhabdomyosarcoma, que responden a los regímenes terapéuticos bien definidos, por lo que la clasificación adecuada es crucial para una gestión idónea del paciente. Un subconjunto de los sarcomas de células redondas, sin embargo, carece de características clínicas, morfológicas e inmunofenotípicas específicas, y no pueden ser inequívocamente clasificadas sobre la base de tales características. La aplicación sistemática de las técnicas de citogenética y genética molecular ha permitido la identificación de un número cada vez mayor de subgrupos definidos genéticamente en esta categoría de tumores indiferenciados.

Existe un subgrupo de neoplasias que se asemejan al microscopio al sarcoma de Ewing. Se componen de células primitivas pequeñas redondas y surgen en los grupos pediátricos o jóvenes, y no presentan reordenamientos del gen EWSR1, SS18 (SYT), DDIT3 (CHOP) y FOXO1 (FKHR). Un pequeño número de estos casos con la apariencia indiferenciada, denominados *sarcoma similar a sarcoma de Ewing* ("Ewing like sarcoma") se han caracterizado recientemente por llevar fusiones BCOR-CCNB3 o CIC-DUX4. Sin embargo, basado en el número algo limitado de casos, no está claro si estas entidades genéticas recién definidas pertenecen a cualquiera de las entidades clinicopatológicas pre-existentes o representan condiciones totalmente novedosas.

La fusión CIC-DUX4 está emergiendo como el evento genético más frecuente en el *sarcoma similar a sarcoma de Ewing*. Los informes iniciales describen casos individuales de tales tumores, y, más recientemente, dos grandes series (*Italiano et al., 2011; Graham et al., 2012*) han identificado traslocaciones CIC-DUX4 consistentes en hasta dos tercios de *sarcoma similar a sarcoma de Ewing*. Creemos que la alta prevalencia de reordenamientos del gen CIC en *sarcoma similar a sarcoma de Ewing* EWSR1-negativos merece que se pongan en marcha pruebas sistemáticas para detectar esta anomalía genética cuando las características histológicas de un tumor son similares a un sarcoma de Ewing pero no se encuentra reordenamiento de EWSR1. El hallazgo de un reordenamiento CIC en pacientes no pediátricos con un *sarcoma similar a sarcoma de Ewing* EWSR1-negativo puede ofrecer apoyo para la adopción de un plan terapéutico similar al de un sarcoma de Ewing, en lugar de uno basado en los sarcomas de tejidos blandos de tipo adulto.

La reciente identificación de los sarcomas con fusión BCOR-CCNB3 dentro del grupo problemático y heterogéneo de *sarcoma similar a sarcoma de Ewing* es otro ejemplo del poder de la tecnología de alto rendimiento, que está expandiendo rápidamente el número de sarcomas asociados a translocaciones (Pierron *et al.*, 2012). El espectro morfológico de los sarcomas BCOR-CCNB3 es bastante variado. Otra característica es el pleomorfismo pronunciado visto en las recidivas y las metástasis locales, que ocurre después de la quimioterapia y / o radioterapia y que simula un sarcoma pleomórfico indiferenciado y que no se encuentran típicamente en el sarcoma de Ewing. La experiencia de los pocos casos publicados indica que la inmunohistoquímica de CCNB3 para el cribado de casos y la RT-PCR o la FISH para su confirmación parecen ser la manera más adecuada de afrontar el diagnóstico de estos tumores (Puls *et al.*, 2014).

En la tabla que se incluye a continuación, se muestran algunas características de los dos tipos de *sarcoma similar a sarcoma de Ewing* en los que se centra nuestra propuesta.

	<b>CIC-DUX4</b>	<b>BCOR-CCND3</b>
<b>Edad</b>	Adulto joven (media 24 años)	Adolescente (media 14 años)
<b>Sexo</b>	Varón>>>mujer 4:1	Varón>mujer 2:1
<b>Localización preferente</b>	Solo partes blandas: (50% extremidades)	Solo hueso
<b>Comportamiento clínico</b>	Agresivo: 50% recidivas. Menos sensibilidad a terapia neoadyuvante que Ewing	Menos agresivo: 30% recidivas
<b>Morfología</b>	Diferente a Ewing (núcleolos, células fusiformes, pleomorfismo focal, muchas mitosis)	Similar a Ewing
<b>CD99</b>	A veces intenso y difuso (70%). A veces débil, focal, de membrana (30%)	Intensa, focal, puntiforme
<b>WT1</b>	Sí, nuclear	¿?
<b>Genómica/patrón de expresión</b>	Similar a Ewing	Diferente a Ewing
<b>Técnicas complementarias</b>	FISH para CIC	IHQ para CCND3 (o FISH para BCOR)



### **Justificación:**

El conocimiento de estos sarcomas supone un reto considerable. Es muy importante contar con colecciones ordenadas y bien caracterizadas de muestras y datos clínicos. Esto es especialmente relevante porque si el SE es ya de por sí una entidad de baja incidencia (aproximadamente 3 casos nuevos al año por cada millón de habitantes; *Esiashvili et al., 2008*), la incidencia de los sarcomas 'Ewing-like' es probablemente una décima parte de la del sarcoma de Ewing.

Además de la escasa prevalencia, en el *sarcoma similar a sarcoma de Ewing* se añade el desconocimiento de su evolución clínica, específicamente, cuáles son las diferencias con un sarcoma de Ewing convencional.

Demás, para evitar la dispersión de los recursos y de la experiencia parece necesario dotar de un equipo que pueda servir de centro de referencia para diagnóstico anatomopatológico y molecular de *sarcoma similar a sarcoma de Ewing*. Los recursos e información disponibles se pondrán inmediatamente a disposición de otros investigadores españoles a través de la Red Temática de Investigación de cáncer ([www.rticc.org](http://www.rticc.org)) y de la Plataforma nacional de Biobancos ([www.redbiobancos.org](http://www.redbiobancos.org)), entre otras.

### **Objetivo general:**

Creación y caracterización de una colección de muestras y datos de sarcomas de células redondas 'Ewing-like' abierta a todos los centros españoles. Esto implica: Reunir, caracterizar, dotar de datos clínicos y fabricar TMAs. Esto nos permitirá el estudio sistemático de marcadores retrospectivos en esta entidad así como la colaboración con otras entidades con intereses similares.

### **Objetivos específicos:**

1. Puesta a punto y ejecución de las técnicas necesarias para el diagnóstico de *sarcoma similar a sarcoma de Ewing* con fusiones CIC-DUX4 en material parafinado.
2. Puesta a punto y ejecución de las técnicas necesarias para el diagnóstico de *sarcoma similar a sarcoma de Ewing* con fusiones BCOR-CCNB3 en material parafinado.



## **Metodología:**

### **Objetivo general: Creación de una colección de muestras y datos de *sarcoma similar a sarcoma de Ewing* en el Hospital U. Virgen del Rocío-IBiS**

Dentro del Biobanco del HUVR-IBiS se creará una colección integrada de muestras y datos de SE. Nuestro centro recibe todas las muestras de material parafinado de los pacientes españoles con sarcoma de Ewing dentro del protocolo EuroEwing. Desde el punto de vista informático no se creará un fichero nuevo, sino que se abrirá una nueva colección dentro del fichero informático del Biobanco, explotado por la aplicación informática Bio-e-Bank. El Biobanco está inscrito en el Registro Nacional de Biobancos con nº B.0000415 y fecha 03/12/2012 (<https://biobancos.isciii.es/ListadoBiobancos.aspx>). Creemos que el uso de una base de datos de *sarcoma similar a sarcoma de Ewing* facilita la anotación precisa y proporciona una visión transparente de la disponibilidad de la muestra, las características del paciente y los datos clínicos; el uso de una base de datos común fomenta la colaboración entre los componentes básicos y clínicos del equipo investigador, y fomenta también la colaboración entre los diversos grupos de investigación que trabajan en España específicamente en este tumor.

Para cada caso que cuente con consentimiento informado del paciente o sus representantes legales para su almacenamiento y uso en investigación, se creará una entrada, en la que constarán los datos clínicos pertinentes. Se diseñará un cuestionario con datos clínicos y anatomopatológicos asociados a la misma, que se cumplimentará para cada caso. Los datos se revisarán y actualizarán de manera periódica.

Se construirán una o varias matrices de tejidos a partir de cada una de las muestras parafinadas incluidas en la colección. Las matrices de tejido se generarán tomando tres cilindros de 0,6 mm de calibre de cada uno de los bloques donantes mediante un instrumento *Beecher manual tissue arrayer*. Se generarán secciones, que se utilizarán posteriormente para los estudios inmunohistoquímicos y moleculares.

### **Objetivo específico 1. Puesta a punto y ejecución de las técnicas necesarias para el diagnóstico de sarcoma similar a sarcoma de Ewing con fusiones CIC-DUX4 en material parafinado.**

- Puesto que por el momento no existen sondas comerciales disponibles, pondremos a punto una sonda de FISH para detección de reordenamientos del gen CIC. Para ello emplearemos el sistema de sondas sureFISH de Agilent. Este sistema permite diseñar y encargar el diseño a un proveedor de sondas. Tras el diseño, nuestro equipo pondrá a punto la técnica en casos controles, y lo aplicará a casos de *sarcoma similar a sarcoma de Ewing* que lo requieran.



Objetivo específico 2. . Puesta a punto y ejecución de las técnicas necesarias para el diagnóstico de *sarcoma similar a sarcoma de Ewing* con fusiones BCOR-CCNB3 en material parafinado.

En este caso, siguiendo las recomendaciones de la literatura, pondremos a punto la técnica de inmunohistoquímica para CCNB3 como herramienta de cribado de casos de *sarcoma similar a sarcoma de Ewing* que lo requieran, y la técnica de FISH para reordenamientos de BCOR y de CCNB3

- Pondremos a punto, en primer lugar, un método para la detección inmunohistoquímica para CCNB3. Para ellos seleccionaremos los controles positivos y negativos adecuados, adquiriremos los anticuerpos primarios óptimos (existen al menos dos comerciales: Santa Cruz y Abcam, que muestran anticuerpos en sus catálogos), y variaremos las condiciones del experimento hasta conseguir el resultado esperado (tiempo de incubación, dilución y temperatura de incubación del anticuerpo primario, duración, tipo de buffer, pH y temperatura del desenmascaramiento antigénico). Los estudios inmunohistoquímicos se llevarán a cabo sobre cortes completos de los casos y/o sobre el material incluido en las matrices de tejido. Para cada resultado se valorarán: la localización subcelular de la expresión, su intensidad y su extensión en el conjunto de las células tumorales o estroma tumoral. La cuantificación se llevará a cabo de manera independiente por al menos dos observadores.
- En segundo lugar, pondremos a punto un sistema de detección mediante técnica de FISH, de forma análoga a lo especificado en el objetivo 1, y dirigido a la detección de reordenamientos de BCOR y de CCNB3.



### **Trayectoria del grupo investigador:**

El grupo de Patología Molecular de Sarcomas (lab-PMS) está dirigido por el Dr. Enrique de Álava desde 2003. Nuestro grupo se acaba de trasladar al Hospital Universitario Virgen del Rocío/Instituto de Biomedicina de Sevilla (HUVR/IBiS). Se trata de un hospital terciario de referencia para el diagnóstico y tratamiento de aproximadamente 12 millones de personas residentes en Andalucía, Sur de Extremadura y de Castilla-La Mancha, y Canarias. En este hospital de referencia no existe de momento un catálogo de muestras y datos de *sarcoma similar a sarcoma de Ewing* que puedan aprovecharse para la investigación traslacional. Cuenta con cinco investigadores postdoctorales (Dr. José Luis Ordóñez, Dr. Juan Díaz, Dra. Lourdes Hontecillas, Dr. Daniel J. García y Dra. Ana T. Amaral, que leyeron sus tesis en orden cronológico entre 2003 y 2013), un investigador senior (Dr. Michele Biscuola), un patólogo especializado en sarcomas (Dr. David Marcilla) y un investigador pre-doctoral (Pablo Rodríguez). Además, otros tres postdoctorales se encuentran realizando formación postdoctoral en centros de reconocido prestigio.

**Experiencia:** Esta propuesta supone la continuidad de la línea de investigación sobre sarcoma de Ewing que el Investigador principal (IP) comenzó en los EE.UU. en 1994. De manera más directamente relacionada con el objetivo del proyecto, el IP en su etapa postdoctoral publicó los primeros análisis sistemáticos del valor pronóstico de alteraciones génicas secundarias en esta entidad: p53 (Cancer 2000;89:783-92 y Cancer 2000;89:793-9). A su vuelta a España, en el Departamento de Patología de la Clínica Universitaria de Navarra (Dr. J. Pardo) el IP colaboró en el proyecto FIS 96/2102 donde se realizó un estudio de caracterización de la variabilidad molecular en la familia de tumores de Ewing. A partir de 1999 el IP obtuvo del FIS financiación independiente para su línea de investigación centrada en nuevas dianas terapéuticas y marcadores diagnósticos del sarcoma de Ewing, mediante seis proyectos consecutivos: 99/0646 PI020828, PI052524, PI081828, PI1100018, PI14/01466. Desde el año 2006 el IP fue coordinador de un nodo de la Red de Excelencia de investigación en sarcomas óseos financiada por la Comisión Europea (NoE EUROBONET). En esta red, coordinó el *work package* de Biología Molecular del tumor de Ewing y las plataformas horizontales de proteómica e inmunohistoquímica. Fruto de estos estudios, el grupo de Patología Molecular ha encontrado entre otros los siguientes hallazgos: 1. El fármaco ADW742 inhibe *in vitro* la proliferación del sarcoma de Ewing, mediante la inhibición de la ruta de señalización de IGF1R (Martins et al., 2006) 2. La proteína de shock térmico HSP90 contribuye *in vitro* e *in vivo* de manera decisiva a la resistencia a los inhibidores de IGF1R (Martins AS, et al. 2008; patente). 3. Mediante estudios de interferencia con shRNAi se ha identificado una nueva diana de EWS-FLI1 denominada TOPK (Herrero-Martín D, et al., 2009). 4. La endocitosis dependiente de CAV1/Clatrina tiene un impacto relevante en la señalización a través de IGF1R (Martins et al. Plos One). 5. Se ha caracterizado un grupo de pacientes de Sarcoma de Ewing con recidivas y metástasis cuyos tumores presentan ganancias de 1q (1qG) y desregulación del ciclo celular. La sobreexpresión de DTL parece explicar en parte ese fenotipo (Mackintosh et al. Oncogene, 2012). 6. Hemos evaluado un fármaco dirigido contra una de las proteínas relacionadas con los efectos funcionales más notables de la ganancia 1q (Mackintosh, García Domínguez et al.,



Oncogene 2013). En el desarrollo de todos estos estudios, hemos utilizado un amplio abanico de técnicas de Biología Molecular entre otras (RT-PCR, *Western blotting*, citometría de flujo, inmunoprecipitación, transfección, siRNA, soft agar y ensayos de movilidad, arrays de expresión, real-time PCR, ChiP, estudios in vivo, etc.).

Publicaciones sobre el tema. El equipo investigador ha publicado 60 artículos originales en los últimos 6 años relacionados con el tema de este proyecto en revistas en lengua inglesa.

Patentes: dos.





### **Cronograma**

Todas las actividades se iniciarán en el momento del comienzo del proyecto, y se realizarán de manera ininterrumpida hasta el final del mismo.

	Mes 1-12	Mes 12-24	Mes 24-30
Objetivo general			
Objetivo 1: FISH			
Objetivo 2: IHQ			
Objetivo 2: FISH			



### **Recursos disponibles:**

En la unidad de gestión de Anatomía Patológica contamos con los instrumentos necesarios para la construcción de las matrices de tejidos y los ensayos de inmunohistoquímica:

TMA workstation manual (Beecher Instruments)

Autostainer Link 48 (DAKO).

En nuestro nuevo laboratorio en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) disponemos de todo el pequeño aparataje necesario para el desarrollo del proyecto:

Termocicladores (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems), nanodrop 2000 (Thermo Scientific), multiskan spectrum (Thermo Scientific), PCR a tiempo real (7900 HT, Applied Biosystem), microcentrífugas, vortex, etc...

Dentro de las instalaciones del IBiS disponemos de los demás instrumentos necesarios, integrados en los diferentes Servicios de Apoyo del instituto:

- Servicio de Citometría de Flujo y Separación Celular: Citómetros analizadores Cytomics FC500 (Coulter) y LRS II Fortessa (Becton Dickinson); Separador magnético automático AutoMACS ProSeparator (Miltenyi Biotec); Separador celular High Speed MoFlo Cell Sorter (Beckman Coulter).
- Servicio de Histología: Procesador Automático de Tejidos LEICA ASP300S, para la deshidratación e inclusión de tejidos en parafina. Microtomos monitorizados LEICA RM2255. Criostatos LEICA CM1950, para cortes por congelación. Vibratomos LEICA VT1000S.
- Servicio de Microscopía: Microscopios de fluorescencia directos, Microscopios de fluorescencia invertidos, Microscopios de fluorescencia directos con programa CAST GRID para estereología, Disector por láser, Cariotipador, Microscopios confocales de barrido por láser.
- Servicio de Cultivo de Tejidos, Células y otros Microorganismos patógenos: Disponemos de varios espacios para cultivo en los laboratorios de nivel de contención biológica 2 (NCB-2), y en el laboratorio de nivel de contención biológica 3 (NCB-3).
- Servicio de Genómica y Secuenciación: Secuenciador automático 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems); Plataforma SEQUENOM MassArray; Plataforma GeneChip (AFFYMETRIX).



### **Justificación de la ayuda solicitada:**

#### **Personal**

No se requiere

#### **Material fungible**

Necesitamos adquirir reactivos para la realización de las técnicas de inmunohistoquímica para CCNB3 previstas en el proyecto. Estos incluyen anticuerpos primarios (aproximadamente 700€ para cada uno; suponemos 3 anticuerpos para hallar el óptimo: 2100€) y reactivos auxiliares para revelado (900€). Total: 3000€

El coste del sistema de diseño SureFish y de la producción de sonda suficiente para 40 casos es de 7000€. El proyecto requiere la fabricación de 3 sondas (DUX4, BCOR, CCNB3; 21000€). Se necesitan también algunos reactivos auxiliares para la hibridación FISH (2000€). Total: 24000€

Por último necesitamos reemplazar con cierta frecuencia las agujas del *tissue arrayer* manual, así como otro material auxiliar de laboratorio. Total 3000€



**Ayuda mínima solicitada (en Euros):**

	<b>Año 1</b>	<b>Año 2</b>	<b>Año 3</b>
<b>Personal técnico</b>	0	0	0
<b>Material fungible</b>	12000	12000	6000
<b>TOTAL</b>	12000	12000	6000

A este importe habrá que añadir los costes indirectos que se acuerden entre la Asociación y FISEVI

**Nota importante:**

En caso de que la aportación exceda las cifras expuestas, se plantearía la realización de alguna de las siguientes actividades:

- Realización de análisis de copia génica (Oncoscan Affymetrix) de casos seleccionados (500 €/caso).
- Confección de xenoinjertos tumorales derivados de pacientes (*pdx mice*). (2500€/caso).
- Cofinanciación de la compra de un instrumento de fabricación de matrices tisulares automatizado (<60.000€).



## **Bibliografía**

Esiashvili N, Goodman M, Marcus RB Jr. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results data. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2008 ;30(6):425-30

Graham C, Chilton-MacNeill S, Zielenska M, Somers GR. The CIC-DUX4 fusion transcript is present in a subgroup of pediatric primitive round cell sarcomas. *Hum Pathol.* 2012 Feb;43(2):180-9.

Italiano A, Sung YS, Zhang L, Singer S, Maki RG, Coindre JM, Antonescu CR. High prevalence of CIC fusion with double-homeobox (DUX4) transcription factors in EWSR1-negative undifferentiated small blue round cell sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012 Mar;51(3):207-18.

Pierron G, Tirode F, Lucchesi C, Reynaud S, Ballet S, Cohen-Gogo S, Perrin V, Coindre JM, Delattre O. A new subtype of bone sarcoma defined by BCOR-CCNB3 gene fusion. *Nat Genet.* 2012 Mar 4;44(4):461-6.

Puls F, Niblett A, Marland G, Gaston CL, Douis H, Mangham DC, Sumathi VP, Kindblom LG. BCOR-CCNB3 (Ewing-like) sarcoma: a clinicopathologic analysis of 10 cases, in comparison with conventional Ewing sarcoma. *Am J Surg Pathol.* 2014 Oct;38(10):1307-18