

## TÍTULO DEL PROYECTO

**Detección de fusiones génicas patognomónicas en sarcomas mediante NGS y biopsia líquida para mejorar el diagnóstico, la estratificación y el seguimiento de los pacientes**

## PALABRAS CLAVE

Sarcomas con translocaciones, NGS, Biopsia Líquida, plaquetas educadas por el tumor, PCR digital, nanoString, diagnóstico de precisión, monitorización de la enfermedad, detección temprana

## RESUMEN DIVULGATIVO

Los sarcomas son tumores raros, que en algunas ocasiones son difíciles de diferenciar entre sí. Pe, los sarcomas de células pequeñas y redondas incluyen el sarcoma de Ewing/Ewing-like, el rhabdomyosarcoma, o el sarcoma sinovial indiferenciado entre otros. Todos estos tipos de sarcomas comparten características morfológicas muy similares que pueden dificultar el diagnóstico correcto. Además, se están describiendo continuamente nuevos tipos de sarcomas que antes se consideraban tumores similares a los que ya se conocían, pero que pueden evolucionar de forma distinta o necesitar un tratamiento más específico. Muchos de estos sarcomas tienen una aberración que consiste en la fusión de dos genes para generar un gen híbrido que produce la malignización de la célula. Esta aberración genética es muy útil para identificarlos, porque los genes fusionados son distintos en cada tipo de sarcoma. Desde hace poco tiempo nuestro laboratorio dispone de nuevas tecnologías de secuenciación de ADN y ARN para detectar estas aberraciones distintivas.

Además de tener mayor precisión en el diagnóstico, también es muy importante poder evaluar cómo responde el paciente al tratamiento o anticipar las posibles recaídas. De hecho, la detección temprana de recaídas supondría aumentar las posibilidades de supervivencia. El seguimiento del paciente mediante técnicas de imagen, como la resonancia magnética, no puede realizarse de forma periódica. Las biopsias repetidas del tumor tampoco son buena opción porque pueden ser arriesgadas en zonas con acceso complicado, o cuando el paciente está en condición crítica. Sin embargo, la biopsia líquida puede constituir una solución ideal ya que el procedimiento sería el mismo que para una extracción de sangre. Actualmente estamos desarrollando un sistema para detectar en plasma los mismos genes de fusión que hemos referido en el párrafo anterior.

En este proyecto nos hemos marcado dos objetivos:

- 1. Mejorar la precisión en el diagnóstico**
- 2. Realizar un seguimiento sistemático de los pacientes mediante biopsia líquida**

## RESUMEN

Los sarcomas son tumores raros, que muestran con frecuencia fusiones génicas (FG) específicas. Su diagnóstico requiere combinar técnicas de rutina como la morfología, el inmunofenotipo, la FISH y la RT-PCR. Éstas se aplican en muestras habitualmente muy pequeñas, y no permiten análisis multiplex, es decir, no es posible hacer escrutinios simultáneos de múltiples FG cuando el diagnóstico es incierto. En 2016, nuestro grupo adaptó, en colaboración con ArcherDx, un sistema de NGS (Next Generation Sequencing) basado en ARN, para la detección simultánea de FG en una misma reacción sin conocimiento previo de los dos genes implicados.

Para mejorar la monitorización de la enfermedad, estamos desarrollando un sistema de biopsia líquida (BL) a partir de ARN. Los sistemas de BL habituales se basan en cfDNA (cell free DNA). Sin embargo, la detección de FG es más sencilla con ARN porque los puntos de rotura son intrónicos, y además el ARN procede de células tumorales viables y se puede extraer de plaquetas, que lo preservan bien. Nuestro objetivo es **optimizar un método de BL y acoplarlo con PCR digital y/o nanoString para comparar ambas tecnologías en el seguimiento no invasivo**, mediante estudios de concordancia y validación clínica de ambas en una serie de pacientes con sarcoma en un CSUR (centros, servicios y unidades de referencia del SNS). Las aplicaciones con impacto directo en la práctica clínica son: i) La **monitorización** en tiempo real de la enfermedad y ii) el **diagnóstico diferencial de entidades tumorales específicas**, que permitiría la rápida aplicación de un régimen terapéutico adecuado.

**EQUIPO INVESTIGADOR**

<b>Nombre y apellidos</b>	<b>Especialidad</b>	<b>Tipo de investigador (IP o IC)</b>	<b>Nº años investigando</b>	<b>Nº art. revistas indexadas en JCR del ISI</b>	<b>Nº Patentes</b>
Enrique de Álava Casado	Anatomía Patológica	IP	28	118	4
Juan Díaz Martín	Doctor Biología	IP	18	20	1
Michele Biscuola	Genética Humana	IC	10	14	1
David Marcilla Plaza	Anatomía Patológica	IC	10	10	
Gema Civantos Jubera	Anatomía Patológica	IC	3		
Catalina Márquez Vega	Oncóloga Pediátrica	IC	17	22	
Gema Ramírez Villar	Oncóloga Pediátrica	IC	14	19	
Mª Pilar Puerto Camacho	Biología Molecular y Celular	IC	1		
Fernando Carmona Berraquero	Técnico Biobanco	IC	7		
Carolina Castilla Ramírez	Doctor Biología	IC	15	12	
Mª José Barrera	Técnico Anatomía Patológica	IC	6		
Ángela Blanco Lobo	Técnico Anatomía Patológica	IC	4		
Mercedes Delgado García	Genética Humana	IC	7	1	
Elena Aguado	Bioquímica	IC	4		
Pablo Rodríguez Núñez	Biología Molecular y Celular	IC	4		

## ANTECEDENTES DEL EQUIPO DE INVESTIGACIÓN EN LA APLICACIÓN DE RESULTADOS DE PROYECTOS ANTERIORES

El principal interés del grupo del Dr. **Enrique de Álava (EDA)** (Director UGC Anatomía Patológica HUVR) es la patología molecular de los sarcomas de hueso y partes blandas. Enrique de Álava encabeza uno de los laboratorios líderes en el diagnóstico molecular de sarcomas en España, y coordina la Red Nacional de Biobancos. Enrique de Álava pertenece al panel WHO para la clasificación de tumores de hueso y partes blandas (2013), coordinando todos los esfuerzos en el SE. Su grupo ha sido incorporado regularmente a las sucesivas redes de investigación en cáncer (RITSI, RTICC), siempre trabajando en el programa de tumores sólidos pediátricos. Su grupo de investigación se ha transferido al HUVR-IBiS en el verano de 2013. Durante los últimos 10 años sus resultados se han publicado en 38 artículos centrados específicamente en este tumor, 34 de ellos en el Q1 de sus áreas de conocimiento, muchos de ellos en colaboraciones nacionales e internacionales. En ellos destaca el trabajo de establecer las ganancias de 1q como factor pronóstico adverso en sarcoma de Ewing así como las dianas terapéuticas derivadas de este evento (Oncogene 2013; 32:1441-51, Oncogene 2012;31:1287-98), así como la caracterización y aplicación terapéutica de la señalización de IGF1R (Amaral et al., Clin Canc Res 2014 aceptado; PLoS One 2011;6(5):e19846; Cancer Res 2008;68:6260-70). El grupo participa de consorcios nacionales tales como la CIBER de cáncer o el Grupo español de Investigación en sarcomas (GEIS).

Nuestro grupo cuenta con cuatro patentes, todas ellas han sido fruto de la búsqueda, validación y aplicación a la clínica de biomarcadores diagnósticos, pronósticos o predictivos en sarcomas pediátricos. De especial relevancia para esta propuesta es la patente P201531898, "*Diagnóstico del cáncer de tejidos blandos*", en la que se protege el diseño de una sonda de FISH útil para el diagnóstico de los reordenamientos génicos del gen STAT6 del tumor fibroso solitario, uno de los tumores incluidos en la propuesta, y que va a ser el comparador diagnóstico, para este tipo tumoral con la tecnología de NGS y dPCR que vamos a evaluar en esta propuesta.

Por otra parte, el equipo investigador, notablemente diversificado tras el traslado del grupo de investigación al HUVR-IBiS, tiene un elevado grado de especialización científico-tecnológica, articulando coherentemente en nuestro ámbito local un grupo multidisciplinar y multicéntrico. El grupo cuenta con personal con actividad asistencial en sarcomas (anatomopatólogos, biólogos moleculares) y personal investigador centrado en los mecanismos de sarcomagénesis y señalización en sarcomas. Por otro lado es un equipo multicéntrico, esto se deriva de la pertenencia del grupo a un Instituto de Investigación Sanitaria del ISCIII, el IBiS, que asegura el carácter traslacional de la investigación realizada en el campus Hospital Universitario Virgen del Rocío-IBiS. En concreto el equipo integra tres anatomopatólogos con actividad diagnóstica en sarcomas en el complejo HUVR [ **David Marcilla (DM)**, **Enrique de Álava (EDA)**, **Gema Civantos(GC)** ], el responsable del laboratorio de patología molecular diagnóstica en Anatomía Patológica HUVR (**Michele Biscuola, MB**), junto con una bióloga molecular del mismo laboratorio (**Mercedes Delgado, MD**), tres técnicos de la UGC Anatomía Patológica [ **Ángela Blaco (AB)** y **MªJosé Barrera (MJB)**], un técnico coordinador del nodo del Biobanco (**Fernando Carmona, FC**), dos estudiantes predoctorales [**Pilar**

**Puerto Camacho(PP), Pablo Rodríguez (PR)],** y tres investigadores postdoctorales [ **Juan Díaz Martín (JDM), Carolina Castilla (CC), Laura Romero Pérez (L)**]. **Juan Díaz Martín** desarrolla su actividad investigadora como postdoc desde junio de 2010 en el laboratorio de Patología Molecular del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Durante este periodo ha liderado diversas líneas de investigación integradas en los proyectos del Dr. José Palacios Calvo, como se refleja en su producción científica. Hace cuatro años se ha incorporado al equipo de investigación del Dr. Enrique de Álava, iniciando nuevos proyectos como el que se presenta en esta convocatoria, y participando en las otras líneas iniciadas. Lidera como IP un proyecto financiado por la Fundación Progreso y Salud (convocatoria 2014), cuyos resultados se han traducido en una publicación en preparación, y que constituyen el trabajo de un estudiante predoctoral. Hasta este momento, su implicación principal se ha centrado en el desarrollo de la aplicaciones *high-throughput* para estudios de transcriptómica, epigenómica y aberraciones cromosómicas en tumores SE. Esta actividad la desarrolla en el marco de distintos consorcios europeos enfocados en la búsqueda de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas para el SE (PROVABES, EuroEwing-EEC). Además, el pasado año el Dr. Juan Díaz desarrolló una importante labor impulsando la implementación de la tecnología NGS, para la detección de genes de fusión en tumores sólidos a partir de muestras parafinadas, en estrecha colaboración con la empresa norteamericana ArcherDX. Esta experiencia supone un activo valioso para garantizar la consecución del proyecto que solicitamos.

Destacamos en el equipo investigador a la **Dra. Catalina Márquez (CM)**, oncóloga pediátrica del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Ella es la coordinadora del CSUR sobre sarcomas infantiles del HUVR-HUVM y es la IP en nuestro centro del ensayo EuroEwing-EEC, cuyas muestras serán objeto de estudio en la propuesta. Otro componente clave del grupo que envía esta propuesta es la **Dra. Gema Ramírez (GR)**, oncóloga pediátrica del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

#### **ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA DE ESTUDIO**

El desafío que pretendemos abordar con esta propuesta es facilitar el seguimiento y la precisión en el diagnóstico de los pacientes con sarcomas de tejidos blandos en un CSUR. La atención a los pacientes con sarcomas, por su baja frecuencia y complejidad radiológica e histopatológica, así como por las serias consecuencias que se originan por biopsias y tratamientos inadecuados, requiere técnicas especiales para su correcto diagnóstico anatomopatológico. Aproximadamente la mitad de los sarcomas se caracterizan por la presencia de fusiones génicas (FG) patognomónicas derivadas de translocaciones cromosómicas, para muchas de estos genes de fusión se ha establecido un papel relevante en el proceso de sarcomagénesis, además de ser muy útiles como biomarcadores (Mertens & Tayebwa, 2014; Smith et al, 2015). De hecho, estos genes quiméricos son considerados como *drivers* oncogénicos, porque presentan una clara asociación con tipos tumorales específicos, en los que no se observan otras alteraciones/mutaciones adicionales significativas (Smith et al, 2015). Por ejemplo, tres estudios recientes sobre Sarcoma de Ewing (SE)

han descrito de forma consistente que el genoma de esta entidad es relativamente silente, aunque sí existen diversas variantes del gen de fusión (Brohl et al, 2014;Crompton et al, 2014; Tirode et al, 2014).

La reciente aplicación de las tecnologías *high throughput*, como la secuenciación masiva (NGS, Next Generation Sequencing) está permitiendo identificar nuevos FG como *NAB-STAT6* en el tumor fibroso solitario o *BCOR-CCNB3* en sarcomas Ewing-like, entre otros muchos ejemplos (Deel et al, 2015). En la medida en que la progresión en la caracterización molecular se está acelerando, podría producirse un cambio gradual en el paradigma de la clasificación tradicional de los sarcomas basada en su tejido de origen. De esta forma, la definición de FG recurrentes adquirirá un mayor protagonismo como referencia para la clasificación de estas entidades. La detección a nivel molecular de estas FG es esencial para el diagnóstico anatomopatológico correcto de las distintas entidades, y por tanto para asignar los regímenes de tratamiento adecuados. Aunque bastantes sarcomas pueden identificarse bien en base al inmunofenotipo y la localización anatómica, muchos de ellos son difíciles de diagnosticar usando exclusivamente las técnicas de rutina disponibles actualmente en los laboratorios de anatomía patológica. Algunos tipos concretos de sarcomas presentan particularidades por las que necesitamos herramientas de diagnóstico molecular nuevas y más precisas: i) Es el caso del grupo de sarcomas Ewing-like (SEL) (Fletcher et al, 2013), en los que se están descubriendo nuevos tipos de FG y se desconoce por el momento la prevalencia de las FG ya descubiertas. ii) Una segunda situación de interés, que supone un reto para el diagnóstico, es la heterogeneidad de la estructura molecular de las FG dentro de la misma entidad, según el número de exones que aporta cada uno de los genes implicados en la FG. Es el caso del tumor fibroso solitario (TFS) y las FG *NAB2-STAT6*. Asimismo, carecemos de un conocimiento sistemático que relacione los subtipos moleculares de las FG con la sensibilidad a fármacos.

Los pacientes con este tipo de sarcomas, incluyendo SE, con enfermedad diseminada o recidivante tienen muy mal pronóstico. La detección temprana de las recidivas podría cambiar radicalmente la evolución de pacientes con alto riesgo, que tendrían muchas más posibilidades de supervivencia. Actualmente, los pacientes con riesgo se estratifican en función de parámetros clínicos obtenidos en el momento del diagnóstico, tales como la presencia de metástasis o un elevado volumen tumoral. El diagnóstico molecular se basa en biopsias del tumor, pero en estas entidades la masa tumoral suele presentarse en localizaciones de acceso muy complicado dificultando y haciendo arriesgadas las biopsias repetidas. Por todo esto, la biopsia líquida puede constituir una solución ideal en la práctica clínica, tanto para el diagnóstico como el seguimiento de los pacientes, o para evaluar la aparición de resistencia al tratamiento y cuantificar la enfermedad mínima residual. Debido a la carencia de biomarcadores séricos, la monitorización de estos pacientes se basa esencialmente en técnicas de imagen que no permiten evaluar la respuesta al tratamiento de forma rápida. La evaluación prospectiva mediante estos procedimientos es difícil de realizar en estos pacientes, normalmente muy jóvenes y en condiciones críticas. No existe ninguna herramienta validada que posibilite la detección temprana de recaída o predictiva de la respuesta al tratamiento. Por lo tanto, no es posible individualizar el régimen terapéutico, lo que resulta en sobre-tratamiento o tratamiento con poca

eficacia en muchas ocasiones. El uso de las FG como biomarcadores no invasivos permitiría una monitorización más exhaustiva y podría ayudar a identificar a aquellos pacientes con alto riesgo de recaída durante el curso del tratamiento. Esto facilitaría personalizar y adaptar el tratamiento de forma más efectiva en cada caso. Adicionalmente, la cuantificación de las FG durante este periodo de seguimiento también ayudaría a detectar recaídas. Como se hemos señalado anteriormente, las FG tienen un papel fundamental en la transformación tumoral en sarcomas de tejidos blandos. Por tanto, su presencia en las células tumorales es constante durante la evolución de la enfermedad. Esta circunstancia evita el problema de heterogeneidad inducida por la selección clonal que pueden producir fármacos dirigidos en el tratamiento de otros tumores, como los anticuerpos anti EGFR (Sorensen et al, 2014).

En la sangre pueden detectarse DNA y RNA libre circulante (cfDNA, cfRNA), proteínas, células y vesículas (como los exosomas), que pueden tener su origen en diferentes tejidos, incluyendo los tumores. De hecho, se piensa que la rápida tasa de recambio de las células tumorales resulta en una liberación continua de ácidos nucleicos y vesículas derivados del tumor, así como de células viables que se desprenden del tumor y entran en la circulación sanguínea. Por ejemplo, la cantidad de cfDNA presente en plasma es sustancialmente mayor en pacientes con cáncer que en individuos sanos y parece incrementarse con el estadio y volumen del tumor (Siravegna et al, 2017). En el caso de las entidades tumorales que proponemos estudiar, los biomarcadores son FG originadas como consecuencia de reordenamientos cromosómicos. Para cada FG característica existen diversas variantes en cuanto a los exones implicados en el punto de rotura, y también uno de los partners de la FG puede ser variable, como ocurre p.e. en el SE (Antonescu & Dal Cin, 2014). Por ello, la búsqueda de reordenamientos utilizando DNA es complicada, ya que para la detección de secuencias híbridas se requiere analizar amplias regiones intrónicas, que pueden ser repetitivas. Esto supone un encarecimiento de las técnicas, y la necesidad de contar con más tejido tumoral para el análisis. En cambio, el RNA permite la detección de FG y determinar su grado de expresión de forma más eficiente, ya que durante el procesamiento del mRNA se maduran las secuencias intrónicas. La detección de translocaciones recurrentes utilizando cfDNA se ha realizado ya con éxito en tumores hematológicos, en los que las células malignas son fácilmente accesibles mediante aspiración de médula ósea. Este no es el caso en tumores sólidos, el único ejemplo es la detección de la FG en el ADN en SE (Krumbholz M et al, 2016), pero esta metodología presenta las dificultades técnicas que implica la presencia de extensas secuencias intrónicas. **Hasta la fecha no se ha desarrollado ningún sistema de biopsia líquida para la detección de FG en tumores sólidos basado en RNA.** Además, el cfDNA es liberado por células que están muriendo, mientras que el RNA proviene de células vivas. Así, la biopsia líquida basada en cfRNA daría una visión de la actividad de las células tumorales viables. También hay que destacar que el cfDNA es menos abundante y esto puede limitar la sensibilidad de detección. El inconveniente que encontramos con el cfRNA, es que es mucho menos estable que el DNA y su aislamiento presenta dificultades técnicas. Sin embargo, las vesículas extracelulares como los exosomas constituyen un reservorio de cfRNA. Los exosomas son pequeñas vesículas (entre 100-200 nm) liberadas por las células vivas de forma activa a los fluidos biológicos, como plasma/suero, orina, líquido cefalorraquídeo y saliva.

Estas vesículas tienen una función fisiológica como “mensajeros celulares” que contienen RNA, DNA y proteínas. Por lo tanto, la información molecular contenida en estas vesículas puede ayudar a definir la enfermedad o la respuesta terapéutica de cada paciente. Debido a su estabilidad, estructura y tamaño, estas partículas pueden viajar por el torrente sanguíneo hacia sitios distantes del tumor primario, estando directamente involucradas en la preparación del nicho pre-metastásico que conlleva a la formación de micro-metástasis. Esta capacidad de diseminación permitiría desarrollar técnicas para su aislamiento y detección a partir de plasma. En nuestro grupo hemos desarrollado desde hace tres años una línea de investigación sobre estas vesículas en SE. Contamos con amplia experiencia en el aislamiento de vesículas extracelulares de plasma de ratones xenograft, modelos PDX y plasma de donantes sanos mediante técnicas de precipitación con polímeros y afinidad por columna. Mediante estas técnicas hemos conseguido detectar el transcrito *EWSR1-FLI1*, en exosomas derivados de cultivos celulares de líneas de SE.

Otro reservorio circulante de mRNA tumoral son las plaquetas. Son el segundo tipo de célula más abundante en periférica sangre-son fragmentos de células anucleadas circulantes que se originan de megacariocitos en la médula ósea. Recientemente se ha observado que las plaquetas tienen un papel central en las respuestas sistémicas y locales al crecimiento del tumor. La interacción de las plaquetas con células tumorales puede producir transferencia de biomoléculas como el mRNA, este proceso ha conducido a la creación del término *tumor-educated platelets* (TEP) para denominar a las plaquetas que han incorporado moléculas del tumor (Sol & Wurdinger, 2017).

En el presente proyecto nos planteamos utilizar NGS y PCR digital (dPCR) para la detección no invasiva en plasma del transcrito de fusión. La identificación de los transcritos de fusión con NGS se ha venido realizando mediante la aproximación de librerías de captura con *primers* opuestos. Este sistema requiere conocer previamente los dos *partners* de la FG, para diseñar *primers* específicos para cada uno de ellos. Tras la amplificación con estos *primers*, se realiza la ligación de adaptadores necesarios para la amplificación adicional y para el proceso de secuenciación. La empresa colaboradora (*ArcherDx*) ha desarrollado un sistema alternativo de enriquecimiento de la librería en los genes de interés, que incrementa la sensibilidad la detección de las FG mediante RNA-Seq. La principal ventaja del sistema, denominado *Anchored Multiplex PCR* (AMP), es que no se precisa conocer previamente los dos *partners* del gen de fusión. El sistema utiliza un *primer* específico unidireccional de uno de los genes implicados en la FG, junto con un *primer reverse* que hibrida en una secuencia del adaptador (que se liga a los fragmentos antes de la amplificación). Con esta aproximación, las regiones de interés, conteniendo *partners* conocidos o no, se amplifican selectivamente. Esto aumenta la sensibilidad analítica del ensayo eliminando falsos negativos, que realmente podrían corresponder a variantes de la FG no descritas previamente (*partner* nuevo). El análisis bioinformático posterior determina el segundo *partner* (conocido o no) de la FG. Desde el pasado año contamos con el apoyo de esta compañía (ver convenio colaboración adjunto a la solicitud), y desde entonces hemos adaptado con éxito este sistema de librerías para identificar FG, a partir de material parafinado, expresados en diversos tipos de sarcomas de



tejidos blandos, incluyendo sarcoma sinovial, dermatofibrosarcoma, rhabdomyosarcoma alveolar, liposarcoma mixoide y también los sarcomas que proponemos estudiar en este proyecto: ES, EWL y TFS. Las principales ventajas de esta técnica frente a los *gold standard* RT-PCR y la hibridación fluorescente in situ (FISH) es que no es necesario conocer los dos genes implicados en la FG, y la resolución permite la detección de regiones reordenadas cercanas o adyacentes (este es el caso en las FG *NAB2-STAT6*, ver ejemplo en figura) difíciles de determinar por FISH (Mitelman et al, 2007). Además, FISH y RT-PCR no permiten realizar escrutinios de múltiples FG de forma simultánea (multiplexado) cuando el diagnóstico es incierto.



Como alternativa a NGS, la técnica dPCR posee un mayor rango dinámico, menor coste, menor tiempo de respuesta y mayor sensibilidad según el tipo de ensayo; además de no requerir de análisis bioinformáticos posteriores (Siravegna et al, 2017). El estudio comparativo de ambas tecnologías será útil para comprobar la conveniencia y aplicabilidad práctica de cada una de ellas en nuestra circunstancia particular. El inconveniente que no puede salvarse con dPCR es la necesidad de conocer ambos partners del gen de fusión y las secuencias de cada una de ellos implicadas en el punto de rotura. Esta información es imprescindible para el diseño de los primers necesarios en dicho ensayo. Desde el pasado año estamos obteniendo dicha información mediante NGS con el panel de librerías Sarcoma FusionPlex de ArcherDx. Disponemos ya de los datos de los genes de fusión con la secuencia del punto de rotura en unos **50 casos de TFS, 10 casos de EWL y 30 casos de SE**, incluidos en ensayos clínicos con un seguimiento exhaustivo y tratamiento estandarizado (GEIS-32, GEIS-34).

También hemos aplicado ya este panel con éxito para diagnóstico diferencial de algunos casos contribuyendo a definir el diagnóstico. Además hemos encontrado una fusión no descrita previamente en la literatura (*EWSR1-TCF4*), para la que aún desconocemos el grado de recurrencia y su relevancia biológica. Existen muchos estudios en los últimos años que han empleado diferentes variantes de secuenciación de transcriptoma (RNA-Seq), en tumores más prevalentes, como los carcinomas de mama, pulmón y próstata, que han contribuido a la caracterización de cientos de fusiones génicas. El número de estudios de este tipo es menor en sarcomas, pero ya se han identificado 18 nuevos FG mediante RNA-Seq (Mertens & Tayebwa, 2014). Sin embargo, se estima que existe un gran número de FG por identificar. Por ejemplo, en tumores de partes blandas se han descrito unos 2280 cariotipos aberrantes, de los que 750 son translocaciones balanceadas (Mertens et al, 2016). Además, las FG también pueden originarse a partir de reordenamientos no balanceados. Por lo tanto, estos datos citogenéticos indicarían efectivamente que deben existir muchos más FG que los descritos hasta la fecha. No hay que olvidar que en cualquier caso sí podremos identificar distintas variantes de FG conocidas que podrían tener un impacto diferencial en

el pronóstico o la respuesta a tratamiento en un grupo de pacientes. Reiteramos que la identificación de variantes de FG es mucho más sencilla usando NGS que con las técnicas tradicionales. Además, si encontramos alguna variante de FG conocida con especial impacto en el pronóstico, sería posible diseñar un ensayo FISH específico que también sería patentable, aunque la FG sea entre *partners* ya descritos. La colaboración con la empresa conllevaría con total seguridad la generación de nuevos derechos de propiedad industrial e intelectual compartidos entre el grupo de investigación y la empresa (nuevos usos de una tecnología conocida o incluso una nueva tecnología adaptada al nuevo uso), que permitiría una transferencia directa de la tecnología y del conocimiento generados por parte del grupo a la empresa, que cuenta con una amplia experiencia para desarrollar y explotar comercialmente una tecnología de este tipo.

Antonescu CR, Dal Cin P (2014) Promiscuous genes involved in recurrent chromosomal translocations in soft tissue tumours. *Pathology* **46**: 105-112

Brohl AS, Solomon DA, Chang W, Wang J, Song Y, Sindiri S, Patidar R, Hurd L, Chen L, Shern JF, Liao H, Wen X, Gerard J, Kim JS, Lopez Guerrero JA, Machado I, Wai DH, Picci P, Triche T, Horvai AE, Miettinen M, Wei JS, Catchpool D, Llombart-Bosch A, Waldman T, Khan J (2014) The genomic landscape of the Ewing Sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation. *PLoS Genet* **10**: e1004475

Crompton BD, Stewart C, Taylor-Weiner A, Alexe G, Kurek KC, Calicchio ML, Kiezun A, Carter SL, Shukla SA, Mehta SS, Thorner AR, de Torres C, Lavarino C, Sunol M, McKenna A, Sivachenko A, Cibulskis K, Lawrence MS, Stojanov P, Rosenberg M, Ambrogio L, Auclair D, Seepo S, Blumenstiel B, DeFelice M, Imaz-Rosshandler I, Schwarz-Cruz YCA, Rivera MN, Rodriguez-Galindo C, Fleming MD, Golub TR, Getz G, Mora J, Stegmaier K (2014) The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer Discov* **4**: 1326-1341

Deel MD, Li JJ, Crose LE, Linardic CM (2015) A Review: Molecular Aberrations within Hippo Signaling in Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *Front Oncol* **5**: 190

Krumbholz M, Hellberg J, Steif B, Bauerle T, Gillmann C, Fritscher T, Agaimy A, Frey B, Juengert J, Wardelmann E, Hartmann W, Juergens H, Dirksen U, Metzler M (2016) Genomic EWSR1 Fusion Sequence as Highly Sensitive and Dynamic Plasma Tumor Marker in Ewing Sarcoma. *Clin Cancer Res* **22**: 4356-4365

Mertens F, Tayebwa J (2014) Evolving techniques for gene fusion detection in soft tissue tumours. *Histopathology* **64**: 151-162

Mertens F, Antonescu CR, Mitelman F (2016) Gene fusions in soft tissue tumors: Recurrent and overlapping pathogenetic themes. *Genes Chromosomes Cancer* **55**: 291-310

Mitelman F, Johansson B, Mertens F (2007) The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* **7**: 233-245

Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A (2017) Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*

Smith SM, Coleman J, Bridge JA, Iwenofu OH (2015) Molecular diagnostics in soft tissue sarcomas and gastrointestinal stromal tumors. *J Surg Oncol* **111**: 520-531

Sol N, Wurdinger T (2017) Platelet RNA signatures for the detection of cancer. *Cancer Metastasis Rev* **36**: 263-272

Sorensen BS, Wu L, Wei W, Tsai J, Weber B, Nexø E, Meldgaard P (2014) Monitoring of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-sensitizing and resistance mutations in the plasma DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer during treatment with erlotinib. *Cancer* **120**: 3896-3901

Tirode F, Surdez D, Ma X, Parker M, Le Deley MC, Bahrami A, Zhang Z, Lapouble E, Grossetete-Lalami S, Rusch M, Reynaud S, Rio-Frio T, Hedlund E, Wu G, Chen X, Pierron G, Oberlin O, Zaidi S, Lemmon G, Gupta P, Vadodaria B, Easton J, Gut M, Ding L, Mardis ER, Wilson RK, Shurtleff S, Laurence V, Michon J, Marec-Berard P, Gut I, Downing J, Dyer M, Zhang J, Delattre O (2014) Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations. *Cancer Discov* **4**: 1342-1353

## **HIPÓTESIS, PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

Actualmente no existe ningún sistema de biopsia líquida validado para la detección de genes de fusión en tumores sólidos basado en RNA. Pretendemos desarrollar un sistema de monitorización de la enfermedad que permita la detección temprana de recaídas, y evaluar la respuesta al tratamiento de forma mucho más eficiente en pacientes con sarcomas con translocaciones.

## **OBJETIVOS**

**1. Seguimiento/monitorización** en tiempo real de la enfermedad (mediante extracciones de sangre) en relación a la progresión o resistencia al tratamiento.

1.1. Seguimiento de los pacientes mediante técnicas no invasivas para detección de genes de fusión patognomónicos.

1.2. Estudio comparativo de dos tecnologías (**dPCR** y **nanoString**) para el seguimiento no invasivo, mediante el estudio de concordancia y validación clínica de ambas en una serie de pacientes con sarcoma en el seno de varios ensayos clínicos en un CSUR.

**2. Diagnóstico diferencial mediante NGS de entidades tumorales específicas**, que permitiría la aplicación de un régimen terapéutico adecuado desde etapas tempranas de la enfermedad con más garantías de buena respuesta.

## **METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO**

**1. Seguimiento/monitorización** en tiempo real de la enfermedad (mediante extracciones de sangre) en relación a la progresión o resistencia al tratamiento.

1.1. Seguimiento de los pacientes mediante técnicas no invasivas para detección de genes de fusión patognomónicos.

**1.2.** Estudio comparativo de dos tecnologías (**dPCR** y **nanoString**) para el seguimiento no invasivo, mediante el estudio de concordancia y validación clínica de ambas en una serie de pacientes con sarcoma en el seno de varios ensayos clínicos en un CSUR.

Las muestras de plasma serán obtenidas de los casos locales por el la UGC Oncología Integral y Oncología Pediátrica-HUVR. Para este propósito están ya previstos los documentos pertinentes para el consentimiento informado de los pacientes. Analizaremos muestras de plasma de pacientes con enfermedad localizada y metastásica para cuantificar los niveles del mRNA correspondiente al gen de fusión mediante nanoString y PCR digital, y compararlo con el volumen tumoral calculado a partir de imágenes de resonancia magnética y tomografía axial computarizada. El aislamiento del RNA a partir de plasma se realizará a partir del reservorio exosomal y, opcionalmente, de plaquetas TEP. De esta forma pretendemos comprobar si la cinética del número de copias de los genes de fusión en el plasma correlaciona con el volumen tumoral durante la fase de quimioterapia inicial, y evaluar si es posible predecir el riesgo de recaída y/o diseminación. El estudio se centrará de manera especial en **120 casos** distribuidos en tres cohortes de pacientes, cada uno de ellos con clara aplicabilidad clínica, tomados de sendos ensayos clínicos del Grupo Español de Investigación en sarcomas (GEIS):

- Se estudiarán **50 pacientes** con **TFS**, especialmente de sus variantes maligna y desdiferenciada. En primer lugar realizaremos técnica de FISH usando una sonda no comercial para reordenamientos de *STAT6* que hemos validado y patentado previamente (Nº registro: P201531898). Los pacientes se obtendrán del ensayo clínico **GEIS-32** (*Ensayo clínico abierto fase II con Pazopanib administrado en solitario en pacientes con tumor fibroso solitario (TFS), no operables o metastásico, o pacientes con condrosarcoma mixoide extraesquelético*), de cuyo diagnóstico anatomopatológico somos revisores centrales.

- Analizaremos casos de **SE** y **SEL** del estudio europeo EuroEwing-EEC (**GEIS-34**), del que nuestro grupo coordina a nivel nacional la confirmación diagnóstica centralizada. Para discriminar entre ambos tipos de tumores seguiremos el PNT de la UGC. En primer lugar, determinaremos mediante FISH si existe reordenamiento del gen EWS para identificar los casos de SE. Si el resultado de esta determinación es negativo, estudiaremos los reordenamientos *BCOR* y de *CIC* con sondas no comerciales diseñadas y validadas en nuestro laboratorio en 2015 (**ver anexo**). Esperamos contar con **40 casos de SE y 20 SEL**.

La estrategia que seguiremos consistirá en secuenciar en primer lugar material FFPE del tumor biopsiado o resecado, utilizando el panel Sarcoma FusionPlex adaptado en el equipo MiSeq, como venimos haciendo durante el pasado año. Este paso permitirá identificar variantes de las fusiones

génicas con potencial valor predictivo de respuesta a los tratamientos establecidos en los citados ensayos clínicos. Una vez determinada la presencia del transcrito de fusión y la secuencia del punto de rotura, utilizaremos dicha información para seleccionar o diseñar sondas TaqMan apropiadas con las que realizar las determinaciones mediante dPCR (ver más abajo). Los ensayos en plataforma nanoString se realizarán con el panel pan-sarcoma NanoString CodeSet en el caso de tumores SE y SEL en el caso de que el tumor primario porte las fusiones: BCOR(exon15)-CCNB3(exon5) ó CIC(Exon20)-DUX4(Exon1). Los tumores fibrosos solitarios no serán analizados con nanoString porque el panel carece de la sonda para la fusión NAB2-STAT6

**2. Diagnóstico diferencial de entidades tumorales específicas**, que permitiría la aplicación de un régimen terapéutico adecuado desde etapas tempranas de la enfermedad con más garantías de buena respuesta. En este objetivo proponemos utilizar la herramienta Sarcoma FusionPlex para mejorar el diagnóstico genético de los sarcomas y subsanar posibles los errores en el diagnóstico clínico debidos al solapamiento fenotípico. En este caso realizaremos el estudio en **casos/entidades tumorales** que resulten **especialmente difíciles de diagnosticar** con las herramientas de rutina en el entorno clínico. La información derivada de estos estudios podría conducir a la identificación de nuevas translocaciones no descritas, que ayuden al diagnóstico y estratificación de entidades poco caracterizadas a nivel molecular. Si los *partners* de las nuevas fusiones implican genes accionables (en sarcomas existen ejemplos para *ALK1* o *ROS1*) se abrirían nuevas posibilidades terapéuticas. Estos hallazgos serían validados mediante IHC y FISH.

Selección de los casos para el estudio: La revisión inicial de los especímenes a incluir en el estudio la llevarán a cabo los patólogos EDA, DM y GC (UGC Anatomía Patológica, HUVR). Las gestiones pertinentes con el nodo de Biobanco serán realizadas por FC y CC. La información de los pacientes correspondientes, incluidos en los ensayos clínicos GEIS-32 y GEIS 34 (ver detalles en sección 'objetivos'), será recabada por los oncólogos CM y GR (UGC Oncología Integral y Oncología Pediátrica-HUVR). Todos los protocolos de dichos ensayos incluyen la evaluación periódica de la respuesta al tratamiento con RM y TAC.

Circuito para muestras de plasma: La organización de este recurso se está ya ultimando por parte de nuestro nodo de biobanco (FC, CC)

Determinaciones IHQ y FISH: Todos los casos seleccionados serán estudiados mediante estos ensayos para comprobar la presencia de las translocaciones correspondientes a cada entidad. Para ello será necesario confeccionar TMA's (MJB, AB, CC). MB realizará los ensayos FISH con el apoyo

de los técnicos AB y MJB. Las determinaciones de IHQ (CC) se realizarán en el nodo del Biobanco ubicado en la UGC Anatomía Patológica.

Las sondas diseñadas por nuestro grupo para las entidades a estudiar son las siguientes:

#### EWING-LIKE SARCOMA

- BCOR-CCNB3: Sonda *dual-color, dual-fusion*; cada una de la sonda marca por completo uno de los genes de interés

SONDA	Coordenadas	Tamaño
FISH_BCOR-CCNB3_1	chrX:39722682-40222706	500.025 kbp
FISH_BCOR-CCNB3_2	chrX:49790158-50281073	490.916 kbp

- CIC: Sonda break-apart

SONDA	Coordenadas	Tamaño
SureFISH CIC 3' BA 619kb	chr19:42169622-422788812	619.191 kbp
FISH_CIC-DUX4_2	chr19:42799803-43200080	400.278 kbp

#### TUMOR FIFROSO SOLITARIO

- NAB2-STAT6: Esta sonda está en proceso de patente (P201531898, registrada pero aún no concedida), por lo que no se pueden compartir datos relacionados con su diseño.

Preparación de RNA a partir de muestras de tejidos parafinados: Utilizaremos el kit Agencourt FormaPure (Beckman Coulter) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Cuantificación con QUBIT (EA, HUVR-IBiS).

Preparación de librerías enriquecidas en los genes diana de interés: Seguiremos el protocolo ya implantado utilizando el panel Sarcoma FusionPlex (ArcherDX). La concentración de las librerías se determinará con el kit de qPCR KAPA (KAPA Biosystems), para realizar el multiplexado en cantidades equimolares (JDM, MB, EA, HUVR-IBiS).

Secuenciación en equipos Illumina (MiSeq) y análisis de datos NGS. Como punto de partida, el tamaño de nuestro panel para sarcomas contendrá 148 ensayos para 26 genes, que requerirían entre 1 y 1,5 millones de lecturas por muestra, permitiendo la secuenciación conjunta de entre 8-16 muestras (JDM, MB, EA, , UGC Anatomía Patológica -IBiS). El análisis de los archivos de secuencia FASTQ se realizará utilizando el pipeline desarrollado por la empresa colaboradora ajustando los *settings* a nuestras condiciones experimentales (JDM, MB).

Aislamiento de exosomas /RNA exosomal a partir de plasma: Para cada paciente, dependiendo del peso corporal, se extraerán entre 2-9 ml de sangre en tubos EDTA al diagnóstico y durante el curso del tratamiento. El plasma se separará de las células mediante centrifugación a 600g durante 15 min antes de dos horas después de la extracción. El aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares (VEs) se llevará a cabo a través de técnicas de: ultra-centrifugación seriada; aislamiento por columnas; aislamiento por precipitación con polímeros; aislamiento por gradiente de densidad. La caracterización de la población de VEs aisladas mediante Microscopía electrónica (forma), NanoParticle Transfer Analysis (Nanosight) para evaluar tamaño y concentración de partículas/ml de muestra. Evaluación de la expresión de proteínas de membrana típicamente expresadas en VEs (tetraspaninas CD63, CD9 y/o CD81, HSP70) y expresión negativa de calnexina, P-caderina, entre otros. Extracción de mRNA de VEs, se llevará a cabo por kits de columna (miRNAeasy), de bolas magnéticas (MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation) y/o trizol. La calidad del RNA será evaluada por bioanalizador (Agilent). Identificación del transcrito de EWS-FLI1/ERG o NAB2/STAT6 mediante q-RT-PCR. Nuestros resultados preliminares demuestran que la presencia de EWS-FLI 1 a nivel de mRNA es detectable en la población de VEs aisladas de sobrenadantes de medio de cultivos (PP, EA).

Preparación de mRNA a partir de TEP: Las plaquetas se obtendrán de las mismas muestras de sangre que en el apartado anterior mediante protocolos estándar, y serán almacenadas a -80°C en RNAlater. La extracción de RNA se realizará con el kit miRVANA (ThermoFisher).

Determinaciones de PCR digital: Se llevarán a cabo en el equipo *QuantStudio 3D Digital PCR* (ThermoFisher). Para las dPCR se utilizarán ensayos TaqMan de expresión génica. Los alelos no translocados de los genes implicados en la fusión serán detectados con sondas marcadas con el fluoróforo VIC. La localización de estas sondas en cada gen estará condicionada por el ordenamiento de los genes en la translocación, así como por las regiones de cada gen implicadas en la fusión. Siempre se seleccionarán sondas en la región 3' del gen que constituya el primer *partner* de la fusión (*partner* 5'), y a la inversa, sondas en la región 5' del segundo gen (*partner* 3'), asegurando que dichas regiones no formen parte del gen de fusión. De esta forma la señal VIC corresponderá exclusivamente a la expresión de los alelos no translocados, detectando transcritos diferentes al correspondiente al gen de fusión. Para el gen de fusión se diseñarán sondas FAM que cubran el punto de rotura (JDM, PR).



Determinaciones nanoString: Las hibridaciones del RNA con las sondas nanoString se realizarán siguiendo las instrucciones del fabricante

Análisis estadísticos: Comprobaremos la correlación entre los resultados de los ensayos FISH/RT-PCR y los datos de NGS mediante el coeficiente *kappa*. También evaluaremos la sensibilidad y especificidad de cada técnica (nanoString y NGS) mediante curvas ROC (EDA, JM, CM, JDM, MB, UGC Anatomía Patológica-HUVR).

<b>Actividad</b>	<b>Personas involucradas</b>	<b>Periodo (mes 1- mes 36)</b>
Revisión anatomopatológica y clínica de casos a incluir en el estudio.	EDA, DM, GC, FC, CC, GR, CM	mes1-mes6
Circuito de muestras	FC, CC	mes1-mes12
Determinaciones IHQ y FISH	MJB, AB, CC, MB	mes1-mes9
Preparación de RNA y librerías para NGS a partir de muestras FFPE.	JDM, MB, EA,	mes1-mes9
Cuantificación de librerías y secuenciación. Análisis bioinformático	JDM, MB, EA	mes1-mes14
Aislamiento de exosomas /RNA a partir de plasma o TEP	PP, EA	Mes1-mes30
Determinaciones de PCR digital	JDM, PR	mes6-mes36
Análisis estadísticos	EDA, CM, GR, JDM, MB	mes30-mes36

## ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN

El estudio se realizará en conformidad con los principios de la ley de investigación biomédica y su real decreto y cumplirá con la ley orgánica de protección de datos. Además, nunca podrá verse comprometido el correcto diagnóstico de una muestra por motivo de la recogida del material. Con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos del proyecto según lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 de protección de Datos de Carácter Personal, sólo tendrán acceso a los mismos el promotor del proyecto o personal designado por él, para labores de monitorización/auditoría, el investigador y su equipo de colaboradores, el Comité Ético de Investigación Clínica del correspondiente centro o el que tutela el ensayo y las autoridades sanitarias pertinentes.

La cesión de las muestras y datos al Investigador Principal serán gestionadas a través del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía (se adjunta a la solicitud el compromiso de cesión), a través de los Nodos Biobanco Hospitalario Virgen Macarena y Nodo Biobanco Hospitalario Virgen del Rocío, Plataforma Provincial de Sevilla (PT13/0010/0041; PT13/0010/0056), asegurando así, el tratamiento integral de las muestras y datos asociados, de acuerdo a los procedimientos recogidos en su Régimen de Funcionamiento, elaborado basándose en la Ley 14/2007 de investigación biomédica, y su desarrollo en el Real Decreto 1716/2011 de biobancos y tratamiento de muestras biológicas, el Decreto 1/2013, de 8 de enero autonómico, la ley 41/2002 de autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, y ley 15/1999 de protección de datos personales, entre otra normativa aplicable. Toda la información referente a la identidad de los pacientes será considerada confidencial a todos los efectos. La identidad no será revelada ni divulgada excepto cuando sea necesaria para su tratamiento, seguimiento o por razones de seguridad. Los detalles que identifican a los sujetos del estudio serán siempre mantenidos con absoluta confidencialidad. Los datos generados no estarán disponibles para otras personas que no sean los investigadores implicados en el trabajo. Se seguirá así mismo los principios fundamentales de los organismos internacionales con competencia en estos temas:

- Declaración de Helsinki (Asamblea Médica Mundial).
- Convenio del Consejo de Europa de Derechos Humanos y Biomedicina.
- Declaración Universal de la UNESCO sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos.

Se solicitará sólo el material necesario para el desarrollo de los estudios planteados en la memoria. En el caso de que exista algún remanente, será devuelto al mismo nodo del Biobanco que suministró las muestras.

## APLICABILIDAD E IMPACTO

Nuestro centro es CSUR (Centros, servicios y unidades de referencia del SNS) para sarcomas infantiles y para sarcomas de adultos y pertenece a la *European network of reference for rare cancer*. Por tanto, la introducción y validación de la tecnología propuesta, seguida de su inclusión en cartera de servicios y en las guías de práctica clínica correspondientes, se podrá extender, con el impulso de las sociedades científicas correspondientes, a los demás CSUR españoles de sarcomas (adultos e infantiles), a todo el Sistema Nacional de Salud, y se coordinará con la experiencia de otros países europeos. El impacto social previsible de este desarrollo supone que el seguimiento de los pacientes con ciertos tipos concretos de sarcomas (Ewing, Ewing-like y tumor fibroso solitario en la propuesta) podrá realizarse en tiempo real, mientras que hasta ahora se realiza mediante técnicas de imagen, que a pesar de su gran utilidad consumen un elevado volumen de recursos. La aplicación de técnicas NGS para la detección de variantes somáticas en oncología se viene implementando de forma creciente en los últimos años. Sin embargo, la detección de genes de fusión mediante NGS/dPCR (como por ejemplo en sarcomas) supone una complejidad adicional de la técnica que no se había resuelto satisfactoriamente hasta los últimos uno o dos años. Sin embargo, no conocemos todavía cuál es la tecnología más adecuada para monitorizar la cinética de fusiones génicas circulantes en sarcomas, ya sea la NGS o dPCR. La evaluación de estas tecnologías sanitarias y su implementación en la práctica clínica supondría una acción con un fuerte componente innovador, que podría extenderse a otros tumores más prevalentes con fusiones génicas, como por ejemplo los carcinomas pulmonares no microcíticos,

Este proyecto se enmarca en la innovación en salud y bienestar social descrita en la Estrategia de Investigación e Innovación (I+i) 2014-2018 de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, sobre todo en su OBJETIVO 4: "Promover un modelo de investigación clínica más sostenible, orientada a la transferencia efectiva de resultados a la industria y al ámbito socio- sanitario". La población diana a la que se dirige esta tecnología son los pacientes con sarcomas. Los sarcomas son enfermedades raras, y su diagnóstico y tratamiento se debe realizar en instituciones con suficiente experiencia. El Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad ha convocado en los últimos años la acreditación de CSUR (Centros, Servicios y Unidades de referencia del SNS) en el área de sarcomas infantiles y sarcomas de adultos. El Hospital Universitario Virgen del Rocío es el único hospital español, junto con el Hospital Vall d'Hebron, en el que se ha acreditado un CSUR de sarcomas infantiles y sarcomas de adultos en 2016. Estos dos hospitales españoles han solicitado su inclusión en la reciente convocatoria de European Reference Networks (ERN) en el *WorkPackage* de tumores raros. Esto representa una magnífica oportunidad para el SSPA, como sistema de salud que atiende a más de 8 millones de personas, para poder liderar a nivel nacional y europeo la introducción de tecnologías innovadoras para el diagnóstico de sarcomas.

El proyecto supone una innovación organizativa considerable para el nodo HUVR-IBiS del Biobanco del Sistema Sanitario Público Andaluz (SSPA) porque supone la apertura de nuevos circuitos de muestras y datos de los pacientes, de acuerdo con los requisitos éticos y de tiempo de implantación necesarios. Además, supondrá una innovación tecnológica notable (introducción de técnicas de

NGS/dPCR para seguimiento de pacientes) en una enfermedad poco prevalente como los sarcomas y para el único centro del Servicio Andaluz de Salud designado como CSUR para esta entidad. La solución desarrollada, si supera las validaciones experimental y clínica previstas en el plan de trabajo, se puede incorporar a la práctica del SSPA. Los resultados obtenidos en el proyecto servirán como evidencia a la hora de su evaluación por parte de la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía (AETSA). Si la evaluación de AETSA es positiva el siguiente paso es organizar y dotar una unidad de diagnóstico molecular de sarcomas mediante esta tecnología, que permita internalizar la determinación en el SSPA. El procedimiento administrativo podría ser el de procedimiento negociado, o, potencialmente, concurso público.

La filosofía del CSUR es la de ser referencia para el manejo clínico de enfermedades, como por ejemplo los sarcomas, que incluyen pruebas diagnósticas, terapias adyuvantes, tratamiento quirúrgico y análisis de los especímenes resecados que deben ser llevados a cabo por un grupo multidisciplinar de profesionales con formación específica en este tipo de lesiones. La introducción y validación de la tecnología propuesta, seguida de su inclusión en cartera de servicios y en las guías de práctica clínica correspondientes, se podrá extender, con el impulso de las sociedades científicas correspondientes, a los demás CSUR españoles de sarcomas (adultos e infantiles) y, por tanto, en caso de demostrarse su eficiencia, rápidamente a todo el Sistema Nacional de Salud.

El desarrollo de este proyecto puede suponer un impacto sensible en la transferencia al sector productivo. La aplicación de técnicas NGS para la detección de variantes somáticas en oncología se viene implementando de forma creciente en los últimos años. Sin embargo, la detección de genes de fusión mediante NGS supone una complejidad adicional de la técnica que no se ha resuelto satisfactoriamente hasta los últimos uno o dos años. La implementación en la práctica clínica de este método supondría una acción con un fuerte componente innovador incluso a nivel europeo, que tendría la citada derivada de ampliar del espectro de aberraciones moleculares en sarcomas, pero también en tumores más prevalentes. De este modo, si esta tecnología se valida clínicamente para los sarcomas infantiles o de adultos, es muy probable que sea también de interés para su uso en el diagnóstico de tumores más prevalentes con traslocaciones (próstata, pulmón, tiroides, riñón, o sistema nervioso central). En este momento ArcherDx es la única empresa que ofrece soluciones específicas para detección de fusiones génicas en sarcomas mediante tecnología de NGS; sin embargo, es de esperar que otras compañías (Illumina, Agilent, LifeTech) desarrollen tecnologías similares; nuestro centro estaría, dada la experiencia acumulada gracias a la presente acción, en disposición de poder aportar a estas compañías un *know-how* singular. Además, como se describe en las Sección Antecedentes, es posible que durante el desarrollo del proyecto identifiquemos nuevos genes de fusión, para los que se podrían diseñar ensayos más específicos susceptibles asimismo de ser protegibles. Durante los últimos años e están publicando numerosos hallazgos de nuevas fusiones hasta ahora no detectables con las técnicas convencionales. En cualquier caso, sí podremos identificar distintas variantes de una fusión conocida que podrían tener un impacto diferencial en el pronóstico o la respuesta a tratamiento en un grupo de pacientes. En este caso

sería posible diseñar un ensayo FISH específico que también sería patentable, aunque la fusión sea entre *partners* ya descritos.

## PLAN DE DIFUSIÓN Y EXPLOTACIÓN

Los resultados se reflejarán en guías de práctica clínica para sarcomas de ESMO (European Society for Medical Oncology) o GEIS (Grupo Español de Investigación en Sarcomas).

Los resultados de este estudio serán publicables en revistas científicas con un factor de impacto medio-alto; se esperan 1-2 publicaciones con un índice de impacto entre 5 y 10 puntos, y 10-50 citaciones (en total) en 5 años. Los resultados obtenidos serán presentados como comunicaciones científicas en los congresos nacionales e internacionales adecuados, según su relevancia y naturaleza: Investigación en cáncer (AACR), oncología pediátrica (SIOP, SEHOP), oncología (ASCO, CTOS), patología (USCAP). Nos parece importante que los pacientes con estas patologías puedan tener acceso a la información que resulte de esta línea de investigación. Por ello los resultados relevantes quedarán disponibles en las webs de sus asociaciones (<http://www.aeasarcomas.org/>) y de las de nuestro centro, y concurrirémos a cuantas convocatorias de actos de difusión científica organicen. Las asociaciones españolas de afectados por estas patologías como la Asociación Española de afectados por sarcoma o la **asociación Pablo Ugarte** para el estudio del Sarcoma de Ewing, más específicamente interesadas en estas enfermedades, son un entorno divulgativo en el que los grupos que integran esta propuesta participan activamente.

Los resultados también tendrán difusión en el GEIS (Grupo Español de Investigación en Sarcomas), tanto en el simposio anual internacional como en los cursos avanzados para residentes. También se exhibirán en los encuentros bianuales del grupo de trabajo del *European protocol Ewing2008/Ewing2012*, lo que contribuirá a la internacionalización de la investigación.

Actualmente contamos con un **acuerdo de colaboración** con la empresa **ArcherDx**. La colaboración con la empresa conllevará con total seguridad la generación de nuevos derechos de propiedad industrial e intelectual compartidos entre el grupo de investigación y la empresa (nuevos usos de una tecnología conocida o incluso una nueva tecnología adaptada al nuevo uso), que permitiría una transferencia directa de la tecnología y del conocimiento generados por parte del grupo a la empresa a cambio de la correspondiente contraprestación económica. La empresa ArcherDx cuenta con una amplia experiencia para desarrollar y explotar comercialmente una tecnología de este tipo.

## MEDIOS Y RECURSOS DISPONIBLES PARA REALIZAR EL PROYECTO

El Laboratorio de Patología Molecular de la UGC de Anatomía Patológica (HUVR) cuenta con una habitación de aproximadamente 40m<sup>2</sup>, junto con la posibilidad del uso compartido de otras dos habitaciones de 10m<sup>2</sup> pertenecientes a las instalaciones de la UGC de Anatomía Patológica. Cuenta con equipos específicos para la extracción y medición de ácidos nucleicos (QIACUBE, Espectrofotómetro Nanodrop, QUBIT), termocicladores para amplificación por PCR, PCR en Tiempo Real, equipo de pirosecuenciación [AB9700 y Gradient-PCR (Eppendorf); Rotor Gene Q (Qiagen); 7900 Fast PCR (AB); COBAS 4800 (Roche); PyroMark 24 (Qiagen)], dos equipos para la hibridación de ácidos nucleicos (Hibridizer de Dako y ThermoBrite de Abbott Molecular) y un equipo para la hibridación automatizada que se está terminando de poner a punto y validar (XmatrixNano), un microscopio de fluorescencia de Leica con 6 filtros distintos para estudio de fluoróforos de distintas longitud de onda (FITC, Gold, Aqua, FarRed, SpecRed, DAPI), sistemas de electroforesis (cubetas y fuentes de alimentación de corriente continua) y sistema de foto-documentación de geles. También dispone de los instrumentos necesarios para la construcción de las matrices de tejidos y para los estudios histológicos e inmunohistoquímicos, que incluyen: TMA workstation (Beecher Instruments), y sistemas Autostainer Link 48 (DAKO) y DAKO OMNIS.

En nuestro laboratorio en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) disponemos también 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 Biosystems), 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: Bionalizador 2100 (Agilent), secuenciador automático 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), Plataforma de espectrometría de masas MassArray MALDI-TOF (SEQUENOM), Plataforma GeneChip (Affymetrix).
- En el complejo HUVR existen equipos NGS de Illumina para los que disponemos de libre acceso. De hecho, los resultados previos detallados en la sección anteriores, han sido obtenidos utilizando el secuenciador *MiSeq System*. También disponemos del equipamiento necesario para realizar los ensayos de PCR digital proyectados (*QuantStudio 3D Digital PCR*, ThermoFisher).
- Existe un sistema de historia clínica electrónica en HUVR-HUVM útil para el acceso y la gestión, por parte de la Unidad de Oncología Pediátrica intercentros, de los datos clínicos relevantes para el proyecto.

**PRESUPUESTO:** El proyecto se ejecutará en dos fases. La fase inicial (3 meses) será crítica para la puesta a punto de los métodos de extracción de RNA a partir plasma/exosomas y TEP.

CONCEPTOS	PRESUPUESTO SOLICITADO		
	FASE 1 (3 meses)	FASE 2 (hasta finalizar proyecto. 2 años)	TOTAL
<p><b>Bienes y Servicios:</b></p> <p><b>Material científico de investigación :</b></p> <p><b>Aislamiento de exosomas</b>  Tubos de policarbonato (BD)/Tubos de gradiente de densidad  Kits de exoEASY (Midi, Qiagen)  Polímero para aislamiento de vesículas: Total Exosome Isolation (Invitrogen) y Exo-Quick (BioSystems)  Reactivos para cultivos: FBS libre de exosomas, RPMI, DMEM, flasks con filtro, pipetas, antibiótico, Filtros estériles con botella 0,45um low protein binding  Tubos estériles de 50ml para centrifugación.</p> <p><b>Extracción de RNA</b>, será distinta según el material de partida:  Muestras FFPE: kit Agencourt FormaPure (Beckman Coulter)  Plasma / exosomas: miRNAeasy, MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation</p> <p><b>Cuantificación del RNA</b>, Qubit RNA HS Assay que requiere el fluorímetro QUBIT.</p> <p><b>Reactivos para las reacciones de secuenciación</b> (Flow Cells): MiniSeq High Output Kit (300 cycles) # FC-420-1003: 1472 EUR/unidad. Necesitaremos 20 unidades.</p> <p><b>Reactivos preparación de librerías</b> (Archer™ FusionPlex™ Sarcoma Kit for Illumina®). El pasado año fuimos apoyados por Archer con varios kits para el impulso inicial del proyecto pero no serán suficientes para todas las muestras previstas.</p> <p><b>Reactivos cuantificación de librerías</b> (KAPA)</p> <p><b>Reactivos RT-PCR y secuenciación Sanger</b> para confirmación de los resultados de secuenciación masiva.</p> <p><b>Reactivos dPCR para QuantStudio 3D Digital PCR System y Sondas TaqMan</b></p> <p><b>Sondas y reactivos FISH</b></p> <p><b>Anticuerpos y reactivos para inmunohistoquímica</b></p> <p><b>Contratación de servicios externos y arrendamiento de equipamiento de investigación:</b> (traducciones, realización de encuestas, mensajería, realización de técnicas específicas, etc.). Se deberá indicar el tipo de servicio a contratar y la necesidad del mismo.</p> <p><b>Transacción biorrecursos Biobanco SSPA</b></p> <p><b>Servicios Generales del IBiS</b> (para análisis RNA en Bioanalyzer, uso de cuarto de cultivos, gastos de uso de ultra-centrífuga)</p>			



<b>Personal:</b>			
<b>Licenciado / postdoctoral</b>			
	<b>10.000</b>	<b>70.000</b>	<b>80.000</b>
<b>Total personal:</b>			
<b>TOTAL</b>			<b>80.000</b>
<p><b>Descripción y justificación de la necesidad:</b> (indicar conceptos, unidades, congresos, reuniones, etc., si no se encuentra justificada se eliminará del presupuesto)</p> <p>Contamos con recursos para la adquisición de bienes y servicios listados arriba. Sin embargo, los investigadores con más responsabilidad e implicación en este proyecto no tienen asegurada actualmente financiación para su actividad laboral. Por ello, solicitamos ayuda en el apartado de personal, con un periodo inicial de puesta en marcha de 3 meses, y un periodo posterior de 21 meses, hasta cumplir los dos años previstos del proyecto. El personal será necesario para llevar a cabo todo el trabajo manual de gestión y análisis de las muestras de biomarcadores circulantes.</p>			