

FUNDACIÓN MARÍA GARCÍA ESTRADA

Validación Prospectiva de las alteraciones en cr 1q y cr 16q como biomarcadores en sarcoma de Ewing

I.P. Enrique de Álava, Hospital Universitario Virgen del Rocío-IBiS

Memoria final, abril 2017.

a) Relevancia del tema y del proyecto

El sarcoma de Ewing (SE) es un tumor maligno de hueso y de partes blandas que se presenta usualmente en la infancia o en la juventud, etapa en la que representa el segundo sarcoma óseo más común, tras el osteosarcoma, con una incidencia mundial de 1-3/10⁶. La posibilidad de curación es inferior al 20% para aquellos pacientes con enfermedad diseminada o que sufren recaída post-tratamiento. Los factores pronósticos clínicos como la diseminación primaria de la enfermedad, la localización del tumor, el tamaño, la edad, y la respuesta histológica a la quimioterapia, están bien establecidos. Sin embargo, existe poco conocimiento sobre factores biológicos que permitan predecir de forma fiable el riesgo de recaída o la progresión de la enfermedad. Es por tanto necesario contar con biomarcadores que permitan identificar de forma temprana a los pacientes que desarrollarán las formas más agresivas de la enfermedad (alrededor de un tercio), y así diseñar las estrategias terapéuticas adecuadas.

Las alteraciones genómicas que definen al SE son translocaciones cromosómicas que dan lugar a factores de transcripción quiméricos aberrantes, esenciales para la tumorigénesis. Estas proteínas de fusión no permiten diferenciar pacientes con peor pronóstico, y existen pocas alteraciones secundarias distintas del evento principal, ya que el SE presenta una tasa muy baja de mutaciones somáticas. Nuestro grupo ha descrito previamente que las alteraciones en el número de copias (CNA) tienen un papel importante en el desarrollo y la progresión del SE. Entre las CNAs detectadas, observamos que la ganancia del brazo largo del cromosoma 1 (1q) es la alteración con mayor impacto potencial en la evolución clínica de los pacientes. Dicha alteración suele ser concurrente con la pérdida de material genético en 16q. El propósito de este proyecto es validar estas alteraciones como biomarcadores pronósticos, analizando para ello una amplia serie prospectiva de pacientes de SE

(n=332). Paralelamente, en este estudio prospectivo podrían detectarse otras alteraciones genómicas asociadas a las distintas variables clínicas.

b) Objeto y finalidad del proyecto o actuación

- Establecer prospectivamente el valor clínico de las alteraciones génicas (ganancia de 1q y alteración del cromosoma 16) en pacientes de SE (Sarcoma de Ewing), determinando así la potencial relevancia de dichas alteraciones en la estratificación de los pacientes en función del riesgo de sobrevivir o no a la enfermedad.
- Desarrollar y validar herramientas diagnósticas que permitan clasificar molecularmente a los pacientes con SE mediante técnicas que se puedan aplicar de forma rutinaria.

El proyecto se encuadra en el consorcio europeo PROVABES (<http://provabes.uni-muenster.de/>), que reúne a cinco de los grupos europeos más competitivos en la investigación del SE, y que está dedicado específicamente a la validación de biomarcadores en pacientes de SE incluidos en el protocolo de EuroEwing. Nuestro estudio se complementará con otros de secuenciación de exomas y GWAS (*genome-wide association studies*) realizados por otros grupos del consorcio PROVABES.

c) Contenido y alcance del proyecto. Resultados obtenidos, especial mención de los avances en los últimos 6 meses

Metodología

Material: Las muestras de tumores (FFPE) y la información clínica se obtienen prospectivamente de series independientes de pacientes de diferentes ensayos clínicos multicéntricos en fase III: EWING 2008 (EudraCT2008-003658, NCT00987636), GEIS (EudraCT 2009-016027), ISG (EudraCT 2008-008361-35) y EWING 2012. Para nuestro estudio sólo se incluyen pacientes con enfermedad localizada (Tx, N0, M0).

Adicionalmente hemos analizado una serie de 28 tumores procedentes de la Unidad de Gestión Clínica de anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. También hemos analizado un panel de 12 líneas celulares de SE.

Proceso de validación (validación analítica):

El propósito de este apartado es la evaluación de forma sistemática de la especificidad, sensibilidad, robustez y reproducibilidad de los análisis FISH en interfase (iFISH) para la validación prospectiva de las CNAs. La iFISH se realiza en el mismo tejido FFPE utilizado en los análisis que se describen en el siguiente apartado, pero sobre micromatrices de tejido (TMA, *TissueMicroArrays*). Para la ganancia en cr. 1q utilizamos la sonda *SPEC MDM4/1p12 Dual Color Probe (ZytoLight)*, que permite detectar aberraciones en la región cromosómica 1q32, tomando como referencia la región pericentromérica 1p12. Para las aberraciones en el cr. 16 usamos dos sondas subteloméricas de ambos brazos del cromosoma (*ST16qter* y *ST16pter, KREATECH*). En todos los casos analizados se establece que el orden de las señales para el estudio de las regiones de interés del cromosoma 1 será: **1p32 (señales verdes): 1q12 (señales rojas)**; para el estudio de las regiones de interés del cromosoma 16 será: **16qter (señales rojas): 16pter (señales verdes)**.

Ganancia (1q). Presencia en los núcleos de 1 a 4 señales de 1q más que 1p, (más señales verdes que rojas) siempre que 1p sea ≥ 2 (ejemplo 2:3, 2:4, 2:8, 3:4; etc...) en un porcentaje $\geq 12\%$ como **clon/es único/s** o suma de varios, sin presencia de los correspondientes clones que reflejen efecto de corte. Existirán clon/es y/o poblaciones celulares que mostrarán el mismo número de señales 1p y 1q (2:2, 3:3; etc...)

Delección (16q). Presencia en los núcleos de señales de 16q **únicas** (señales rojas) con señales verdes en mayor número (1:2, 1:3....) en un porcentaje $\geq 12\%$ como **clones únicos** o suma de varios de ellos, sin presencia de clones que reflejen efecto de corte. Existirán clones que mostrarán el mismo número de señales 1p y 1q (2:2, 3:3...).

Cualificación de biomarcadores (validación clínica inicial):

En este apartado exploramos y evaluamos la sensibilidad y especificidad de los *screening* genómicos de CNA para determinaciones clínicas, valorando asimismo la utilidad clínica. El análisis prospectivo se centra en la validación de ganancias 1q y alteraciones en el cromosoma 16, pero hemos complementado este estudio con un análisis exploratorio de CNAs. Los análisis de CNAs se realizaron con *Affymetrix OncoScan™ FFPE Assay kit*, que utiliza sondas para 220.000 SNPs (*Single*

Nucleotide Polymorphisms), con una resolución de 50-100Kb en 900 genes asociados a cáncer, y de 300 Kb en el resto del genoma. Esta plataforma también permite la detección de LOH (*Loss Of Heterozygosity*) en todo el genoma. El ADN (75-200 ng) se extrae de tejido FFPE, y los datos se analizaron con el software *Nexus Express for OncoScan 3*. Mediante el algoritmo *TuScan* se calcula el número de copias y los eventos de LOH. Este algoritmo utiliza las frecuencias alélicas de los SNPs y las medidas de intensidad de la señal de hibridación para identificar segmentos en el genoma con un mismo número de copias.

Las variables clínicas que se consideran serán la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. La contribución de las CNA detectadas en estas variables será analizada con el paquete bioinformático *CGHtest 31*, entre otros.

Coordinación de datos

El registro de pacientes en ensayos clínicos en fase III está basado en población general, ya que el tratamiento en estos ensayos es el estándar para los nuevos pacientes diagnosticados. La información será transferida como un conjunto común de datos básicos. El procesamiento de los datos se realizará de acuerdo con la legislación vigente sobre protección de datos y bajo la supervisión de la institución correspondiente. Utilizaremos la infraestructura del *EURO EWING trial centre* (Münster), para la adquisición, procesado y análisis de datos clínicos. La oficina de coordinación tiene acceso total a *GCP/IHC/FDA compliant MARVIN RDE* software de *Xclinical*, asociado al EU FP7 (#278514), y al software y la metodología biométrica más desarrollada. Existe un sitio web de referencia: <http://campus.uni-muenster.de/provabes/html>.

Resultados obtenidos

Durante los últimos meses hemos avanzado en los **perfiles CNAs** (*arrays* de SNPs, *OncoScan*) hasta alcanzar **165 muestras** analizadas con esta técnica. Del mismo modo, la valoración de las alteraciones 1q y 16q mediante **FISH se ha realizado ya en 258 y 238 casos** respectivamente. En conjunto, disponemos **información de la ganancia de cr. 1q para 272 casos y de pérdida de cr. 16q para 254 casos** (ver **Fig.1** en aptdo. g)). La comparación de ambos conjuntos de datos (**Fig.1, tablas**) confirma que los diseños de las sondas FISH utilizadas son adecuados para la detección de las alteraciones en 1q y 16q, lo que valida a su vez su aplicación rutinaria como herramienta diagnóstica. P.e., en el caso de 1q disponemos de datos de ambas

técnicas para 151 pacientes. Los análisis de FISH detectan ganancia en 1q en 17 casos, que también son detectados mediante los arrays de SNPs (**Fig. 1, tabla 1q**). Como avance reciente importante, debemos mencionar que ya se han realizado algunos análisis estadísticos cruzando nuestros resultados con la información clínica que ya hay disponible para muchos de los pacientes. Las variables clínicas estudiadas en estos primeros análisis han sido la respuesta histológica y la supervivencia libre de enfermedad. Tanto la ganancia de cr. 1q como la pérdida de 16q predicen una peor respuesta histológica del tumor. Igualmente ambas aberraciones se asocian a un menor tiempo de supervivencia libre de enfermedad (ver **Fig. 2.** para 1q), y además, cuando son concurrentes el impacto en la supervivencia es más acusado y con mayor significación estadística.

Los perfiles de CNAs han permitido también determinar que los tumores SE presentan alteraciones cromosómicas recurrentes (**Fig. 3**), adicionales a las referidas en 1q y 16q: Hemos observado trisomía o amplificación del cromosoma 8 en el 45% de los casos, y ganancia también completa de los cromosomas 2, 12, 14 y 20, aunque con menor frecuencia (entre 14-20%). En cuanto a los eventos de pérdida, las alteraciones más frecuentes se observan en cr. 10 y cr. 17, en este último implicando siempre a la región donde mapea *TP53* (deleciónado en hemicigosis en el 8% de los casos). Una observación interesante, derivada de los *arrays*, es que los eventos de pérdida parecen ser más frecuentes en varones.

Además de estas alteraciones groseras, los datos de los *arrays* revelan la existencia de eventos más focales, que en muchos casos son consistentes entre las dos series de tumores e incluso con el panel de líneas celulares. Estas alteraciones incluyen ganancias y pérdidas de material genético muy específicas en determinados loci, como la microdelección ya descrita en el locus *CDKN2A/CDKN2B*, o la microdelección en el locus *ADAM3A* (**Fig. 4**). La confirmación del evento en el locus *ADAM3A* se ha realizado mediante qPCR con sondas TaqMan para ADN (**Fig. 5**), aunque no detectamos expresión génica del mismo con sondas para RNA en los casos no deleciónados.

d) Discusión y Conclusión

La frecuencia observada para la ganancia 1q (11.4%) es algo menor de lo esperado atendiendo a lo descrito en otros trabajos (17%-31%), sin embargo, los

tumores SE incluidos en la serie PROVABES se restringen a casos sin enfermedad diseminada al diagnóstico. Nuestro grupo ya describió que la ganancia en 1q tiene cierta asociación con la progresión de la enfermedad, por lo tanto, la exclusión de casos con metástasis al debut pudiera quizás explicar la menor frecuencia del evento. En cuanto a la pérdida en 16q, hemos confirmado la asociación con el evento en 1q ($p=0.000013$, Fisher's exact test). En todos los casos, la delección en 16q incluye el locus *CDH1*, que codifica la proteína cadherina E implicada en uniones adherentes.

Los análisis estadísticos con los datos clínicos aún no son definitivos, debemos completar determinaciones FISH en casos adicionales para alcanzar el tamaño de muestra necesario ($n=322$, previsto para junio de 2017), pero pueden calificarse como muy prometedores para la validación de las aberraciones 1q y 16q como biomarcadores para estratificar pacientes con peor pronóstico.

Los datos obtenidos con los arrays de SNPs indican que los tumores SE no exhiben un cariotipo complejo, aunque existen alteraciones recurrentes cuya frecuencia es similar a la descrita en otras series de SE. Además de estas alteraciones groseras, hemos observado eventos más focales, como la microdelección ya descrita en el locus *CDKN2A/CDKN2B*. No hay precedentes en SE, sin embargo, para la microdelección en el locus *ADAM3A*, que mapea en el cromosoma 8, frecuentemente ganado. De hecho, ambos eventos pueden observarse de forma concurrente en varios casos (también en casos de la serie local de tumores SE) y en líneas celulares (delección de *ADAM3A* en el 50% de líneas, $n=12$). La delección en este locus ha sido descrita en glioma pediátrico y en la transición de la variante de célula pequeña a célula grande del linfoma gastrointestinal de células B. *ADAM3A* es un pseudogen no funcional en humanos, no obstante, no descartamos que la región delecionada contenga elementos reguladores en *cis* que afecten la expresión de genes adyacentes como *FGFR1*.

Conclusiones

Una vez comprobada la buena correlación entre los datos de FISH y los perfiles CNA para las alteraciones 1q y 16q, proponemos la implementación del FISH como técnica diagnóstica para la determinación de estas aberraciones.

La microdelección en el cromosoma 8 que afecta al pseudogen *ADAM3A*, no ha sido descrita previamente en SE, y podría implicar también a secuencias de ADN no codificante pero con función reguladora.

Para la finalización del estudio necesitamos alcanzar un tamaño de muestra de 322 pacientes (previsto junio 2017). Con este número de muestras prevemos que ocurrirán los suficientes eventos de recaída y progresión, necesarios para dar la potencia estadística requerida al análisis ulterior con los datos clínicos.

e) Resumen divulgativo de los resultados

Hemos analizado un amplio número de tumores de SE para determinar cuáles de ellos presentan alteraciones cromosómicas que puedan predecir la evolución de los pacientes. Para ello, hemos utilizado dos técnicas complementarias. Ambas técnicas permiten detectar alteraciones relacionadas con pérdida o ganancia de material genético (ADN) en las células del tumor. Una de las técnicas permite identificar estas alteraciones en cualquier región del ADN humano. Con esta técnica hemos encontrado que algunos pacientes han perdido o ganado las mismas regiones del ADN. Con la segunda técnica hemos conseguido confirmar las pérdidas y ganancias de ADN en dos regiones muy concretas que ocurren sólo en un grupo de pacientes que evolucionan peor que el resto.

f) Plan de trabajo, con referencia expresa a los hitos del proyecto

Validación prospectiva de ganancias en el cromosoma 1q, y pérdida del cromosoma 16q en muestras de SE.

Para la conclusión del estudio es preciso ampliar la serie de tumores analizados. El tamaño de muestra final debe ser de 332 casos, para conseguir que haya un número suficiente de eventos clínicos (recaídas, metástasis..) que permitan alcanzar la potencia estadística necesaria. Hemos recibido ya las muestras para completar el estudio, y están siendo procesadas. También debemos completar análisis FISH en unas 100 muestras no prospectivas, que reforzarán el modelo estadístico definitivo.

Estudio genómico de alto rendimiento exploratorio para determinación de alteraciones de número de copias (CNA, copy number aberrations)

El estudio exploratorio (arrays de SNPs) para identificar nuevas alteraciones está concluido. Los análisis de los datos clínicos previstos en el apartado anterior podrán asimismo ayudar a determinar si la microdelección de *ADAM3A* tiene potencial impacto pronóstico. Adicionalmente, pretendemos evaluar si existe asociación entre las variables clínicas y parámetros más generales obtenidos de los *arrays*, como el porcentaje total de genoma alterado o el porcentaje de pérdida de heterocigosidad (%LOH, *Loss of Heterozygosity*).

g) Publicaciones, Congresos, Premios, Fotos, Imágenes del proyecto que puedan servir para ilustrarlo (diagramas de trabajo, gráficos de resultados, etc).

A lo largo de este año se preparará y enviará el manuscrito del trabajo conjunto del consorcio PROVABES para su publicación en una revista científica, aún por determinar, pero con alto impacto. También está previsto publicar previamente los resultados resumidos de este proyecto en el contexto de la reunión PROVABES/EORTC/DKTK/EEC_WP3&4 Meeting (Essen, Alemania), que se menciona en el siguiente párrafo (Comunicaciones).

Comunicaciones:

Título de la aportación: WP1.1: Copy number alteration (CNA)-Correlation with Clinical Outcome Parameters.

Nombre del congreso: PROVABES/EORTC/DKTK/EEC_WP3&4 Meeting (Essen, Alemania)

Autores: J. Díaz-Martín, E. de Álava

Fecha: Septiembre, 2016

Título de la aportación: Resultados preliminares de validación mediante FISH sobre micromatrices tisulares de los análisis por SNPs de sarcoma de Ewing

Nombre del congreso: VIII RTICC ANNUAL MEETING 2015 (Sevilla, España)

Autores: R. Noguera, J. Díaz-Martín, E. de Álava

Fecha: Octubre, 2015

Título de la aportación: WP1.1: Copy number alteration (CNA) - First results

Nombre del congreso: PROVABES meeting: Multimodal data modelling (Münster, Alemania)

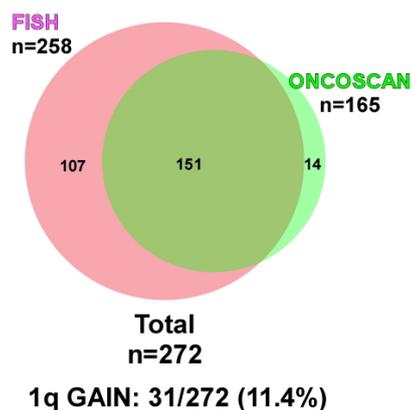
Autores: J. Díaz-Martín, E. de Álava

Fecha: Julio, 2015

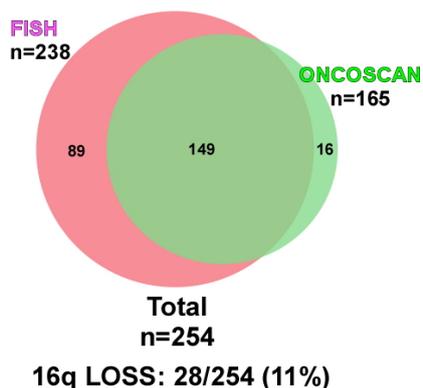
Gráficos de resultados:

Fig.1. Número de determinaciones 1q y 16q mediante OncoScan y FISH, representadas como diagramas de Venn. Las tablas de abajo reflejan la concordancia en el grupo de casos con datos de ambas técnicas.

1q GAIN determinations



16q LOSS determinations



1q Gain		FISH data		Total
		no 1q G	1q G	
ONCOSCAN data	no 1q G	132	0	132
	1q G	2*	17	19
Total		134	17	151

*Casos positivos por OncoScan no confirmados por FISH

16q Loss		FISH data		Total
		no 16q L	16q L	
ONCOSCAN data	no 16q L	131	1*	132
	16q L	0	17	17
Total		131	18	149

* Caso negativo por OncoScan pero positivo por FISH

Fig. 2. Estimación de supervivencia libre de enfermedad mediante el método Kaplan-Meier, agrupando los casos sin ganancia 1q (línea azul) o con ganancia 1q (línea verde).

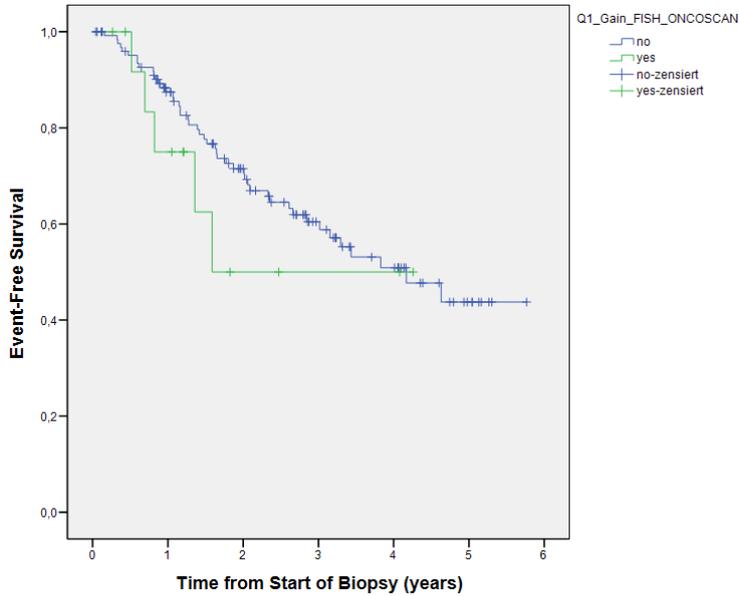


Fig. 3. Frecuencia de las CNAs detectadas en la serie de tumores PROVABES, ordenadas por cromosoma.

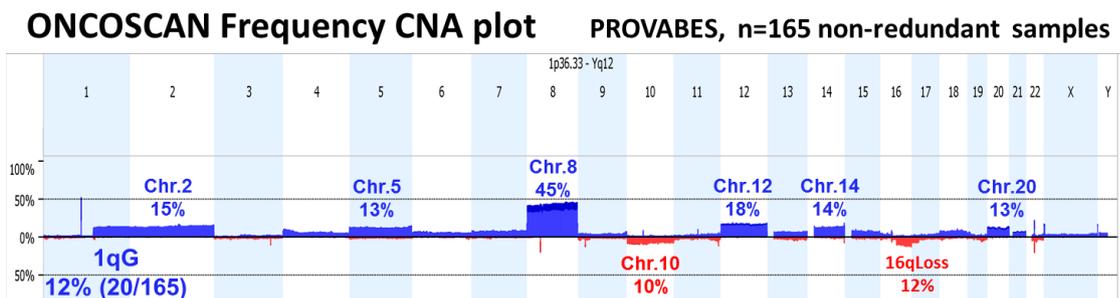


Fig. 4. Comparación de frecuencias de CNAs en las series de tumores y el panel de líneas celulares de SE.

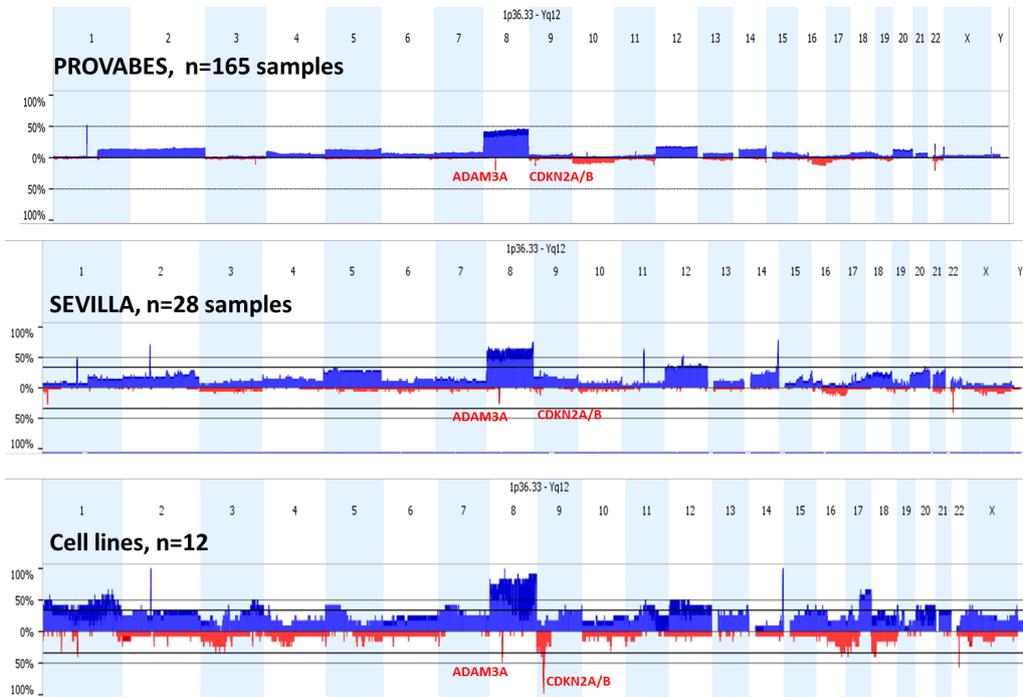
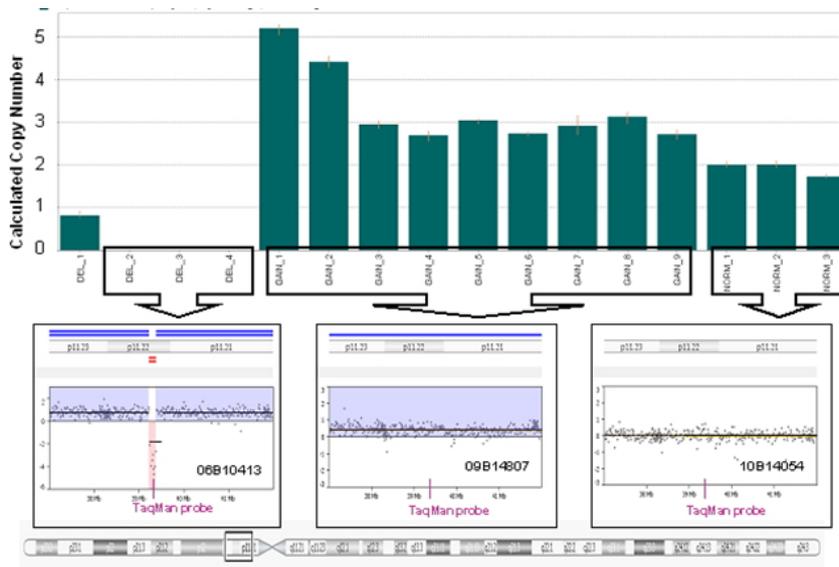


Fig. 5. Validación de la microdelección en el pseudogen *ADAM3A* (detectada en los arrays) mediante qPCR.



h) Consignar si el proyecto recibe otro tipo de ayuda como FIS, IP, becas de otras asociaciones o fundaciones

El proyecto recibió entre 2012 y 2014 financiación adicional a través del ISCIII (PI12/03102), en el marco de *ERA-NET on Translational Cancer Research (TRANSCAN)*. También recibió fondos de la Fundación Cris contra el cáncer entre 2013 y 2016.

OTROS

1. Puesta a punto de los análisis CNA (OncoScan, Affymetrix) y caracterización de líneas celulares (meses 1-6). Completado.
2. Análisis de CNA en muestras ES, validación prospectiva de la ganancia en 1q y alteraciones en cr 16 (hasta los meses 7-36). Completado.
3. Preparación y validación de sondas FISH para cr 1q y 16, y para genes relevantes de interés (meses 1-12). Completado.
4. Finalización del análisis FISH en muestras de pacientes de SE (12 meses). Casi completado; previsto junio 2017
5. Análisis de la información clínica de los pacientes. Realizado preliminarmente, a la espera de que se cierren los ensayos clínicos europeos que reclutan a estos pacientes.