

ANEXO 1

**ACUERDO DE VOLUNTADES ENTRE EL INSTITUTO DE SALUD
CARLOS III, O.A., M.P.
Y LA ASOCIACIÓN CANDELA RIERA, FUNDACIÓN SONRISA DE ALEX
Y ASOCIACIÓN TODOS SOMOS IVÁN**

MEMORIA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TITULO DEL PROYECTO	ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA PROGRESIÓN DEL SARCOMA DE EWING Y EL DESARROLLO DE ENFERMEDAD METASTÁSICA
INVESTIGADOR PRINCIPAL	Javier Alonso, Ph. D. Investigador Científico OPIs
CENTRO DE INVESTIGACIÓN	Unidad de Tumores Sólidos Infantiles Instituto de Investigación de Enfermedades Raras Instituto de Salud Carlos III Ctra. Majadahonda-Pozuelo Km 2 28045 Majadahonda, Madrid
DATOS DE CONTACTO	e-mail: fjalonso@isciii.es Tel: 91 822 32 17
DURACIÓN	5 años

RESUMEN

El sarcoma de Ewing es un tumor muy agresivo que afecta a niños y adolescentes. En la actualidad, y a pesar de los intensos tratamientos que se aplican a estos pacientes, el 40% de ellos morirán como resultado de la enfermedad, principalmente por la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico o la aparición de recaídas tardías. Lamentablemente, en los últimos 25 años, no se ha producido ningún avance significativo en el tratamiento del sarcoma de Ewing, por lo que se hace imprescindible seguir investigando para encontrar abordajes más efectivos para combatir este tumor.

Los grandes avances que se han desarrollado en los últimos años para el tratamiento del cáncer se han encontrado gracias a la investigación básica y aplicada (también llamada traslacional). Por ello, el desarrollo de nuevos fármacos para el sarcoma de Ewing también llegará sin duda de la mano de la investigación.

A pesar que en los últimos años se ha incrementado nuestro conocimiento sobre las bases moleculares de esta enfermedad, todavía hoy sigue siendo en gran medida desconocidos los mecanismos que están implicados en el desarrollo de las metástasis.

En este proyecto proponemos un abordaje novedoso para el estudio de estos mecanismos y la identificación de posibles dianas terapéuticas contra la metástasis, nuestro principal enemigo.

INTRODUCCIÓN

El sarcoma de Ewing es un tumor muy agresivo que afecta a niños y adolescentes. La mayoría de los tumores se localizan en los huesos tubulares largos, como la tibia o el fémur, aunque el 10% de los tumores también pueden desarrollarse en los tejidos blandos. Histológicamente, el sarcoma de Ewing está formado por células pequeñas, con escaso citoplasma que no presentan signos de diferenciación, por lo que el diagnóstico diferencial en comparación con otras entidades de apariencia similar reviste cierta dificultad (Gaspar et al.)

La supervivencia global a los 5 años es aproximadamente del 65%, aunque este valor varía significativamente en función de la localización anatómica de los tumores primarios y la presencia de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico. Así, los pacientes con tumores primarios localizados en las extremidades y sin metástasis en el momento del diagnóstico tienen mejores tasas de supervivencia que los pacientes que presentan metástasis en el momento del diagnóstico o tumores primarios irsecables localizados en el esqueleto axial (por ejemplo, pelvis o vértebras) (Gaspar et al.).

El tratamiento convencional consta de tres fases: i) una fase de inducción que consiste en ciclos de quimioterapia que combinan 3-4 citostáticos, ii) cirugía para eliminar el tumor y/o radioterapia local cuando la eliminación total del tumor no ha sido posible y iii) una fase de consolidación que consiste en una nueva ronda de quimioterapia. A pesar de estos tratamientos agresivos, alrededor del 40% de los pacientes morirán debido a la enfermedad, como consecuencia de tumores refractarios que no responden al tratamiento o la aparición de recidivas tardías, la mayoría de las veces con resultados fatales (Gaspar et al.). Las tasas de supervivencia han permanecido estancadas durante los últimos 25 años, y aunque la investigación básica y traslacional ha permitido la identificación de algunas dianas terapéuticas prometedoras (como por ejemplo, la vía del IGF-1), ninguna de las terapias dirigidas evaluadas hasta la fecha ha tenido un éxito destacable. Por lo tanto, es urgente desarrollar terapias realmente novedosas e innovadoras que representen un avance real en el tratamiento de este tipo de cáncer (Kovar et al., 2016; Kovar 2014). Pero para identificar estas terapias, sigue siendo necesario profundizar aún más en los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del este tumor (Ordoñez et al.).

La principal característica molecular del sarcoma de Ewing es la presencia de translocaciones cromosómicas específicas (una translocación es la fusión de dos fragmentos de dos cromosomas diferentes). La translocación más frecuente, presente en el 85% de los casos, fusiona los cromosomas 11 y 22 y se denomina t(11;22). Hoy en día está totalmente aceptado que esta alteración cromosómica es la primera alteración a nivel molecular que

aparece en estos tumores y por lo tanto se considera que esta es la principal mutación a partir de la cual se desarrolla el tumor. Este tipo de mutaciones, se denominan mutaciones “driver”, porque son esenciales para el desarrollo de un tumor en particular. Esta translocación cromosómica produce a su vez la fusión de dos genes (EWS, localizado en el cromosoma 11 y FLI1, localizado en el cromosoma 22) y en consecuencia la aparición de una nueva proteína quimérica a la que llamamos EWS-FLI1, y que no existe en ninguna célula normal del organismo. Esta nueva proteína EWS-FLI1 tiene la capacidad de regular la expresión de otros genes que están implicados en el desarrollo del tumor (Ordoñez et al.). En los últimos años, nuestro grupo ha identificado y caracterizado la función de algunos de los genes regulados por EWS-FLI1 en el desarrollo de este tumor, contribuyendo así a incrementar nuestro conocimiento sobre la biología del sarcoma de Ewing (Cidre-Aranaz et al., 2017; Cidre-Aranaz et al., 2015; Agra et al., Navarro et al., García Aragoncillo et al., Carrillo et al.)

Muy recientemente, varios grupos de investigación han planteado una interesante hipótesis que podría explicar el comportamiento tan agresivo de los sarcomas de Ewing (ver figura 1) (Franzetti et al., Grünewald et al.). Según esta hipótesis, los niveles de EWS-FLI1 fluctúan estocásticamente de manera que en un determinado momento existen células tumorales que expresan elevados niveles de EWS-FLI1 (a las que llamaremos EWS-FLI1^{alto}) y otras que expresan niveles de EWS-FLI1 bajos (EWS-FLI1^{bajo}). Las células EWS-FLI1^{alto} se asocian a un perfil más proliferativo, mientras que las células EWS-FLI1^{bajo} son células que tienen propiedades metastásicas. Nosotros pensamos que la cooperación entre ambos perfiles de células podría explicar las características malignas de estos tumores, y en concreto su capacidad para invadir otros tejidos.

Los resultados preliminares de nuestro grupo sugieren que las células EWS-FLI1^{bajo} producen y secretan al medio extracelular una serie de proteínas y factores de crecimiento que podrían desempeñar un papel central en el fenotipo metastásico. Mientras que por otro lado, las células EWS-FLI1^{alto} producirían una serie de señales asociadas a la proliferación celular. Este proceso, sería un proceso dinámico, de manera que las células EWS-FLI1^{alto} y EWS-FLI1^{bajo} intercambiarían sus papeles continuamente, como en un círculo vicioso.

En este proyecto queremos identificar cuáles son los factores claves que gobiernan estos procesos dinámicos para entender mejor como es el comportamiento del tumor. Estamos convencidos que el estudio de estos factores nos puede permitir identificar dianas moleculares contra las que diseñar nuevos fármacos que ataquen más eficazmente el desarrollo de estos tumores y en particular el desarrollo de las metástasis.

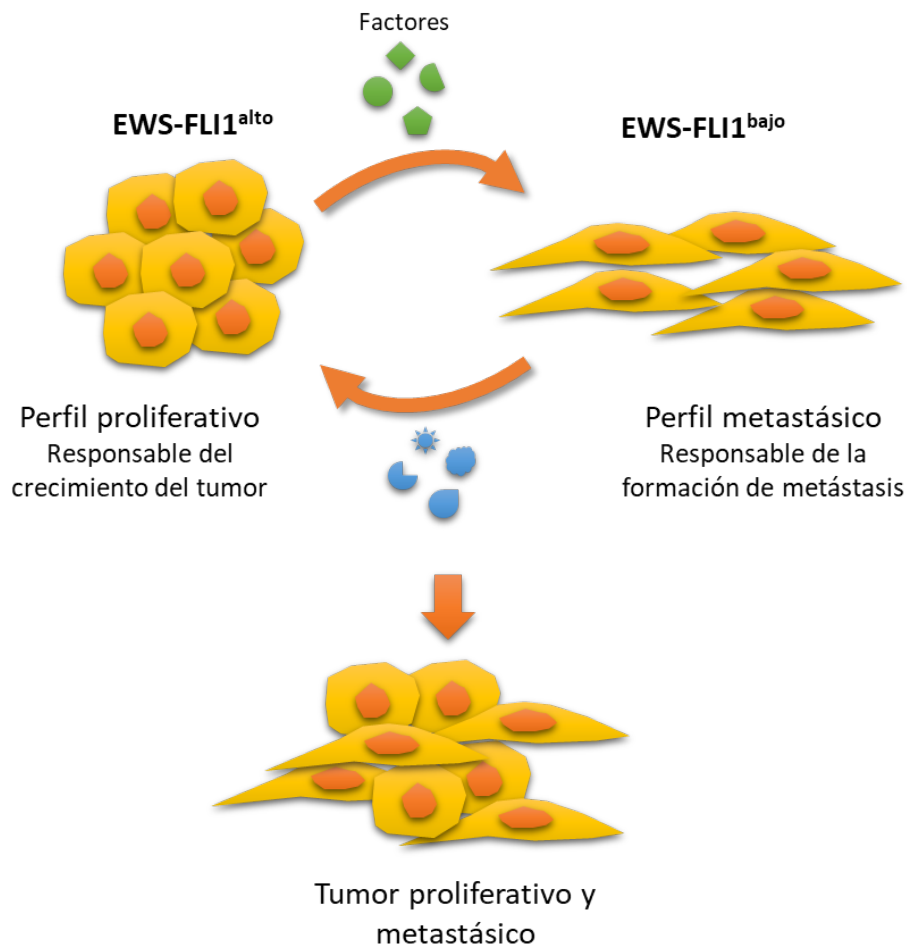


Figura 1. Hipótesis de Trabajo

El sarcoma de Ewing se caracteriza por la presencia de una translocación cromosómica que produce una proteína quimérica denominada EWS-FLI1. Esta proteína EWS-FLI1 es la causa principal del desarrollo del tumor. Los niveles de EWS-FLI1 fluctúan en las diferentes células que forman el tumor, existiendo células que expresan niveles altos y otras que expresan niveles bajos. Cada uno de estos perfiles se caracteriza por la secreción de determinados factores que influyen a su vez en las demás células, constituyéndose así un círculo vicioso que desemboca en la formación de un tumor altamente proliferativo y metastásico. La identificación de los factores

claves que gobiernan este proceso dinámico podría contribuir a desarrollar nuevos fármacos que rompieran el círculo vicioso.

BIBLIOGRAFÍA

- Agra et al. Lysyl oxidase is downregulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and its propeptide domain displays tumor suppressor activities in ewing sarcoma cells. PLoS One 2013;10.1371/journal.pone.0066281
- Carrillo et al. Cholecystokinin down-regulation by RNA interference impairs Ewing tumor growth Clin. Cancer Res. 2007;13:2429-2440
- Cidre-Aranaz et al. EWS-FLI1-mediated suppression of the RAS-antagonist Sprouty 1 (SPRY1) confers aggressiveness to Ewing sarcoma. Oncogene 2017;36(6):766-776
- Cidre-Aranaz et al., EWS/FLI1 Target Genes and Therapeutic Opportunities in Ewing Sarcoma. Front Oncol. 2015;5:162
- Franzetti et al. Cell-to-cell heterogeneity of EWSR1-FLI1 activity determines proliferation/migration choices in Ewing sarcoma cells. Oncogene. 2017;36(25):3505-3514.
- Gaspar et al. Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. J Clin Oncol. 2015;33(27):3036-3046
- García-Aragoncillo et al. DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell cycle progression in Ewing tumors. Oncogene 2008;27:6034-6043
- Grünewald et al. Ewing sarcoma. Nat Rev Dis Primers. 2018;4(1):5
- Kovar. Blocking the road, stopping the engine or killing the driver? Advances in targeting EWS/FLI-1 fusion in Ewing sarcoma as novel therapy. Expert Opin Ther Targets. 2014;18(11):1315-28.
- Kovar et al. The second European interdisciplinary Ewing sarcoma research summit--A joint effort to deconstructing the multiple layers of a complex disease. Oncotarget. 2016;7(8):8613-8624
- Navarro et al. The EWS/FLI1 oncogenic protein inhibits expression of the Wnt inhibitor DICKKOPF-1 gene and antagonizes β -catenin/TCF-mediated transcription. Carcinogenesis 2010;3:394-401
- Ordóñez et al. Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead?. Cancer Res. 2009;69(18):7140-7150

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

OBJETIVO 1. Caracterizar los principales factores que definen los perfiles de células EWS-FLI1^{alto} y EWS-FLI1^{bajo}

Se desarrollarán diferentes modelos celulares para caracterizar los perfiles EWS-FLI1^{alto} y EWS-FLI1^{bajo}. Se utilizarán diversas técnicas de biología molecular para caracterizar estos perfiles a diferentes niveles (ARN, proteína).

Una vez identificados los principales factores se estudiará el efecto de cada uno de ellos sobre la proliferación celular y la capacidad migratoria de las células en condiciones de cultivo estándares.

OBJETIVO 2. Evaluar la capacidad de los diferentes factores para producir metástasis en modelos animales.

Se desarrollarán modelos animales que permitan reproducir mejor las características clínicas del sarcoma de Ewing y en particular la forma en que las metástasis se producen.

Una vez caracterizados estos modelos animales se analizará el efecto de los factores estudiados en el crecimiento del tumor y el desarrollo de la metástasis.

OBJETIVO 3. Desarrollar nuevos abordajes terapéuticos

Una vez caracterizados e identificados los factores claves implicados en el desarrollo de la enfermedad metastásica, intentaremos desarrollar moléculas que interfieran con las actividad de estos factores, buscando el bloqueo del proceso metastásico.

Los resultados obtenidos en células en cultivo y en modelos animales nos permitirán determinar si las estrategias terapéuticas desarrolladas en esta fase preclínica pueden ser trasladadas a la clínica

CRONOGRAMA

	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
Objetivo 1	>>>>>>>	>>>>>>>			
Objetivo 2		>>>>>>>	>>>>>>>	>>>>>>>	
Objetivo 3			>>>>>>>	>>>>>>>	>>>>>>>

EXPERIENCIA DEL EQUIPO INVESTIGADOR SOBRE EL TEMA

El Dr. Javier Alonso, investigador principal de este proyecto, se ha centrado durante los últimos 15 años en la investigación del cáncer infantil. Una de las principales líneas de investigación del grupo es la identificación y caracterización funcional de los genes diana de la oncoproteína EWS-FLI1 característica de los sarcomas de Ewing. Así, el grupo ha contribuido a la identificación de una serie de genes diana EWS-FLI1 relevantes para el desarrollo de Sarcoma de Ewing, como DAX1 (NR0B1) (Mendiola y col., *Int J Cancer* 2006, Garcia-Aragoncillo et al., *Oncogene* 2008, Lalli E y Alonso J. *Expert Opin Ther Targets* 2010), CCK (Carrillo et al., *Clin Cancer Res* 2007, Carrillo et al., *Anti-Cancer Drugs* 2009), DKK1 (Navarro et al., *Carcinogenesis* 2010), LOX (Agra y otros, *PLoS One* 2013), EGR2 (Grünewald) TGP et al., *Nature Genetics* 2015) o SPRY1 (Cidre-Aranaz et al., *Oncogene* 2016), algunos de los cuales han sido propuestos como nuevas dianas terapéuticas (Cidre-Aranaz et al., *Front Oncol* 2015). Una de las contribuciones más destacadas del grupo al campo de la investigación en el sarcoma de Ewing ha sido el establecimiento de modelos de células para el estudio de las funciones de EWS-FLI1, que se han utilizado como modelos celulares de referencia en el consorcio ASSET (Analyzing and Striking the Sensitivities of Embryonal Tumors) (Hertz et al., 2016, Mutz CN et al., *FEBS Lett* 2016). En este sentido, el grupo es un experto en el estudio de las consecuencias que tiene la inhibición de EWS-FLI1 en estos tumores, aspecto este estrechamente relacionado con el objeto de esta propuesta. El grupo también ha estudiado la relación entre la inestabilidad genómica y los perfiles de expresión en sarcoma de Ewing contribuyendo a la definición de grupos de pacientes con peor pronóstico (Ferreira et al., *Oncogene* 2008) y recientemente, ha participado en varios proyectos multinacionales de GWAS para la identificación de variantes asociadas con la susceptibilidad y el pronóstico del sarcoma de Ewing (Postel-Vinay et al., *Nature Genetics* 2012; Ruiz-Pinto et al., *Ann Oncol* 2016). El grupo también ha participado en redes de investigación nacionales (RTICC, Programa "Tumores de la niñez y otros tumores ") e internacionales, como el consorcio europeo EuroEwing en el que el investigador principal es responsable de la recolección, el almacenamiento y la gestión de muestras para los estudios biológicos del ensayo clínico EuroEwing 2012 (EudraCT: 2012-002107-17), coordinado en España por el Grupo Español de Investigación en Sarcomas (GEIS) y la Sociedad Española de Hemato-oncología Pediátrica (SEHOP).

IMPACTO SOCIO-ECONÓMICO

El cáncer es la principal causa de muerte por enfermedad en la edad pediátrica en los países industrializados. Aunque en los últimos años se ha avanzado mucho en el tratamiento de los tumores de la infancia y la adolescencia, muchos de ellos todavía tienen tasas de supervivencia inaceptablemente bajas. Uno de los cánceres infantiles con las peores tasas de supervivencia es el sarcoma de Ewing. De hecho, el 40% de los niños diagnosticados con sarcoma de Ewing morirán como consecuencia de la enfermedad.

Aunque el cáncer infantil es, afortunadamente, relativamente infrecuente, el impacto socioeconómico que tiene sobre el paciente y el entorno del niño enfermo (padres, familiares, colegio, etc...) es muy elevado. El paciente con cáncer infantil es un paciente que soportará durante el resto de su vida las secuelas del tratamiento, lo que tendrá un impacto notable en su vida y en el de las personas de su entorno. Prueba de la importancia que el cáncer infantil tiene para la sociedad es el creciente interés mostrado por fundaciones y organizaciones no gubernamentales por desarrollar proyectos de apoyo a las familias y también de apoyo a la investigación en todas sus vertientes (básica, clínica y traslacional). La aprobación de determinadas medidas legislativas para facilitar la conciliación de la vida laboral con el cuidado de un niño con cáncer (RD 1148/2011), así como el desarrollo de reglamentos comunitarios que obligan a la industria farmacéutica a desarrollar ensayos clínicos en niños previos a la autorización de nuevos medicamentos (CE 1901/2006), dan también una idea de la importancia socioeconómica que tienen estas enfermedades. Por lo tanto, sigue siendo imprescindible el desarrollo de nuevas estrategias y abordajes terapéuticos novedosos, que permitan seguir incrementando las tasas de supervivencia y disminuir los efectos secundarios de los tratamientos actuales.

MEDIOS DISPONIBLES PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO

El **laboratorio** del investigador principal pertenece al Instituto de Investigación de Enfermedades Raras del Instituto de Salud Carlos III. El Instituto de Salud Carlos III es la principal institución pública española, dependiente del gobierno central, que se dedica a la investigación en salud.

El laboratorio de Tumores Sólidos Infantiles está ubicado en el campus de Majadahonda del Instituto de Salud Carlos III y cuenta con un equipamiento completo para la realización de todas las técnicas de biología molecular y celular propuestas en el proyecto como cabinas de bioseguridad (1) y de PCR (1), nanodrop (1), centrífugas y microcentrífugas (4), termocicladores (4), termociclador PCR tiempo real (RG6000 Qiagen), termobloques (2), fuentes de electroforesis (3), cubetas electroforesis (2) y equipos de transferencia (2) neveras y congeladores (3), ultracongeladores (1).

Además, el **departamento** al que pertenece el laboratorio dispone de equipamiento de uso común que incluye lector de placas Tecan Infinite M200 (1) (para absorbancia, fluorescencia y luminiscencia), fodocumentadores de fluorescencia (2) (BioRad GelDoc 2000, DNR MiniBis Pro) y luminiscencia-ECL (1) (BioRad ChemiDoc XRS+), PCR cuantitativa (Roche Light Cycler 1.5), centrífugas (2) (Sorvall RC5C, Beckmann Avant J-301) y ultracentrífugas (1) (Beckman Optima XPN) con sus correspondientes rotores, citómetro de flujo (MACSQuant Analyzer, Miltenyi), microscopios de fluorescencia (2) (Zeiss AXIO ImagerX1, Axiovert 40CFL), Nanosight NS300 para la caracterización de exosomas, y dos cuartos de cultivo de uso compartido perfectamente equipados, uno de ellos dedicado exclusivamente al trabajo con virus.

Por último, en el campus se dispone de una serie de **servicios comunes** de apoyo a la investigación que incluyen:

- Unidad de Genómica: Dispone de un secuenciador capilar (ABI 3730XL), dos equipos de PCR cuantitativa (ABI 7500FAST, Roche LC480), 1 secuenciador MiSeq (Illumina), 1 secuenciador NextSeq500 (Illumina) y equipamiento asociado.
- Unidad de microscopia confocal dotada con un microscopio Leica TCS SP5 y sistema para estudios in vitro con control de temperatura, CO2 y humedad.
- Unidad de microscopia electrónica dotada con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai 12.
- Animalario que cuenta con instalaciones para la cría de animales de experimentación (ratones, conejos y coballas) y experimentación en condiciones SPF. Cuenta con un equipo de imagen in vivo IVIS Lumina 3XR (luminiscencia, fluorescencia y rayos X)

- Unidad de bioinformática con una completa infraestructura informática.

El centro cuenta con instalaciones autorizadas por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente para realizar actividades con Organismos Modificados Genéticamente tipo 2 (nº autorización A/ES/14/I-06)

JUSTIFICACIÓN PRESUPUESTO

A) Personal.

Se solicita financiación para contratar a un investigador postdoctoral con experiencia en el campo. La contratación de un investigador de perfil más senior nos permitirá avanzar más rápidamente en los objetivos marcados en este proyecto.

El coste aproximado de un contrato postdoctoral es de 45.000 € anuales incluyendo la cuota patronal de la seguridad social.

B) Material fungible

Se solicita financiación para la adquisición de reactivos de laboratorio y que comprenden:

- Reactivos biología molecular: Kits para las técnicas de PCR y clonaje (enzimas, kits de purificación, etc...). Reactivos para western-blot (anticuerpos, membranas y reactivos transferencia y revelado, etc..).
- Reactivos cultivo celular: suero de ternera fetal y medios de cultivo, consumibles cultivo celular (frascos, pipetas, etc...), antibióticos, cubetas electroporación.
- Animales de laboratorio: ratones inmunodeficientes (NSG) para evaluar la eficacia de los tratamientos.
- Gastos publicaciones: para la publicación de resultados en revistas acceso abierto

C) Equipamiento

No es necesaria la adquisición de equipamiento científico ya que el centro de investigación cuenta con todos los equipos e instalaciones necesarias para el desarrollo de este proyecto (instalaciones de cultivo celular BSL2, Unidad de Genómica, Unidad de Microscopía Confocal y Electrónica, Unidad de citometría de flujo, etc..).