

MEMORIA CIENTÍFICA DE SEGUIMIENTO

ASOCIACIÓN PABLO UGARTE

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

Investigador principal: Dr. Enrique de Álava.

Grupo de Patología Molecular de Sarcomas

Hospital Universitario Virgen del Rocío-Instituto de Biomedicina de Sevilla

Sevilla, Abril de 2016

Objetivos del proyecto

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

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

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

Consecución de los objetivos del proyecto

Objetivo general del proyecto: Se ha creado y caracterizado la colección

Objetivo específico 1. Se ha diseñado y puesto a punto en muestras control una sonda para CIC. Queda pendiente su aplicación a nuestra serie de casos.

Objetivo específico 2. Se ha diseñado y puesto a punto en muestras control una sonda para BCOR. Queda pendiente su aplicación a nuestra serie de casos.

Descripción de las actividades realizadas:

Objetivo general. Creación y caracterización de una colección de Sarcomas de Ewing.

Las piezas quirúrgicas y/u otras biopsias presentes como bloques de tejido parafinado o tejido congelado se encuentran en los archivos de la Unidad de Gestión Clínica de Anatomía Patológica para su estudio histológico convencional con fines diagnósticos. Se ha realizado una búsqueda retrospectiva de todos los casos disponibles mediante el sistema informático (Patwin) de la Unidad a partir del año 2000 hasta finales del año 2015. Se ha creado una base de datos con todos los casos donde se han recogido distintas variables de estudio (edad, género, diagnóstico, reordenamiento gen EWSR1, localización, tumor primario, metástasis, tratamiento, etc). Se ha realizado una revisión histológica de cada tumor, debido a que la población de estudio está compuesta por una serie de casos principalmente retrospectivos. Esto ha resultado necesario para poder homogeneizar y actualizar todos los diagnósticos previamente emitidos a través de dos observadores (Dr. De Álava y Dr. Marcilla) que han seguido las recomendaciones de clasificación de los Sarcoma de Ewing de la O.M.S. año 2013. De esta manera hasta la fecha actual se han seleccionado un total de 77 casos de Sarcoma de Ewing para la **creación de la colección**. Al tratarse de muestras presentes en los archivos de la U.G.C. de Anatomía Patológica, el uso de las muestras se vinculará a proyectos específicos para los cuales siempre se tendrá que pasar el Comité Científico y el Comité Ético del SAS para su cesión y uso.

Los dos patólogos responsables de la revisión histológica han marcado cuatro áreas representativas para cada muestra sobre el mismo cristal de H&E: dos para la construcción de micro matrices de tejido y dos para la extracción de ácidos nucleicos (ADN y ARN). La construcción de micro matrices de tejido (en inglés Tissue Micro Arrays, TMAs) mediante el equipo tissuemicroarrayer (Beecham) es una técnica que consiste en tomar un pequeño cilindro de 1 mm de grosor de cada bloque de parafina (bloque donante) e insertarlo de forma precisa en un bloque receptor, siempre de parafina. Los TMAs son una manera rápida y eficiente de estudiar grandes series de tumores y facilitan considerablemente la caracterización de todas las muestras. Gracias a esto se han podido **confeccionar 3 matrices de tejido** completas y durante el primer semestre

2016 se terminará la producción de la **cuarta** matriz de tejido que servirán para la futura caracterización funcional y molecular de los Sarcomas de Ewing.

Junto con la revisión histológica de las muestras seleccionadas para la colección, se ha procedido a realizar una batería de marcadores inmunohistoquímicos (CD99, Ki-67, BCL2, Vimentina, etc) mediante la realización en cortes parafinados de 3 µm de espesor mediante técnicas de inmunohistoquímica de forma automatizada utilizando la plataforma OMNIS® y el kit de detección EnVision-FLEX® (DAKO) basado en la conjugación de un anticuerpo secundario con la peroxidasa y tinción cromogénica con Diaminobencidina o el sistema Ventana® de Roche. Dos patólogos han valorado la presencia o ausencia de tinción nuclear, citoplasmática o de membrana en las células tumorales de cada anticuerpo, comparándolas con las del tejido sano adyacente usado como control interno de la técnica.

Objetivos específicos 1 y 2.

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

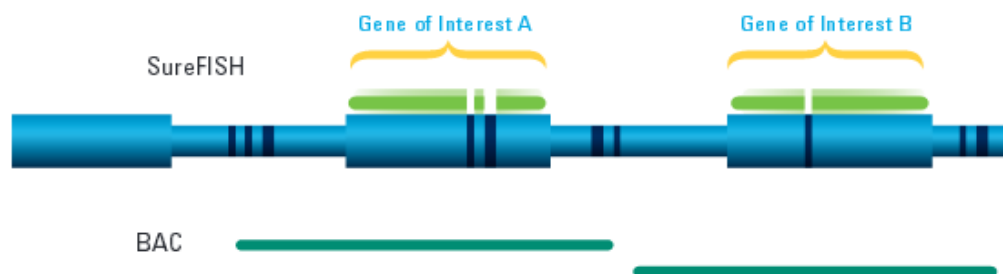
La fusión CIC-DUX4 emergió como el evento genético más frecuente en el sarcoma similar a sarcoma de Ewing. Los informes iniciales describen casos individuales de tales tumores, y, más recientemente, dos grandes series han identificado traslocaciones CIC-DUX4 consistentes en hasta dos tercios de sarcoma

similar a sarcoma de Ewing. La reciente identificación de los sarcomas con fusión BCOR-CCNB3 dentro del grupo problemático y heterogéneo de sarcoma similar a sarcoma de Ewing es otro ejemplo del poder de la tecnología de alto rendimiento, que está expandiendo rápidamente el número de sarcomas asociados a traslocaciones. Creemos que la alta prevalencia de reordenamientos del gen CIC y del gen BCOR en los sarcomas similares al Sarcoma de Ewing (EWSR1-negativos) merece que se pongan en marcha pruebas sistemáticas para detectar esta anomalía genética cuando las características histológicas de un tumor son similares a un sarcoma de Ewing pero no se encuentra reordenamiento del gen EWSR1.

Se ha revisado por lo tanto la presencia o ausencia del reordenamiento del gen EWSR1 mediante técnica de Hibridación In Situ utilizando cortes seriados de las tres matrices de tejido. Se ha llevado a cabo una recuperación antigénica, paso obligatorio para todas las muestras parafinadas, una digestión enzimática de las proteínas de membrana y nucleares como las histonas para permitir la correcta hibridación de las sondas fluorescente con la secuencia génica diana que se quiere estudiar, una hibridación mediada por calor durante toda la noche y una serie de lavados específicos para inactivar las sondas en exceso y eliminar posibles ruidos de fondo. Gracias a los resultados obtenidos después de la revisión histológica y a través de la IHQ y del estudio de citogenética molecular, el diagnóstico de Sarcoma de Ewing se ha podido confirmar en 73 de 86 casos presentes en la colección.

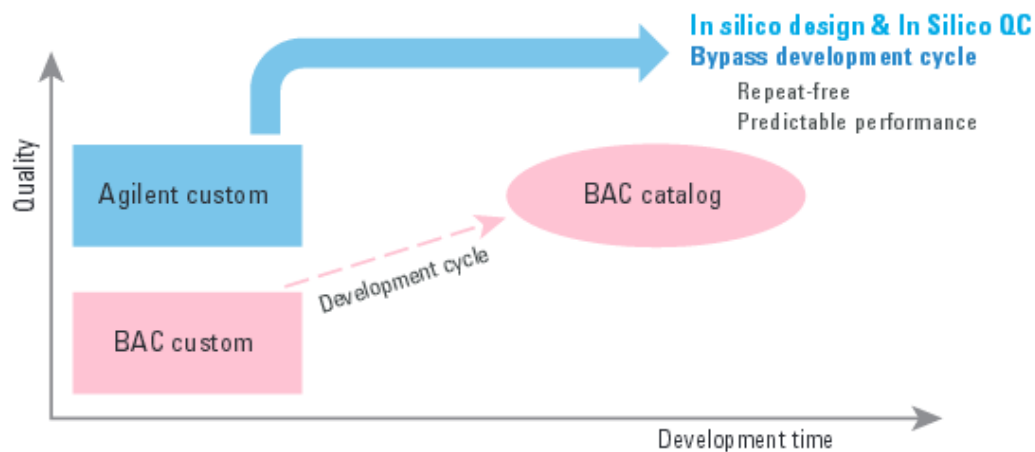
Es por ello por lo que, después de revisar la literatura y para mejorar la caracterización histológica de este grupo de neoplasias, hemos decidido diseñar y poner a punto nuevas sondas para la técnica de Hibridación In Situ para el estudio de los reordenamientos CIC-DUX4 y BCOR-CCNB3 como nuevos biomarcadores diagnósticos. Las sondas serán sondas nuevas no disponibles en el mercado. El diseño de sondas hechas a medida o personalizadas (customized) se basa en la actualidad y para la mayoría de las casas comerciales que se encargan de fabricarlas en la tecnología del marcaje de los BACs [Bacterial Artificial Chromosomes: son vectores de clonación usados para clonar fragmentos de ADN (de 100 a 300 kb de tamaño; media de 150 kb). Es uno de los tipos de vectores de clonación conocidos como "vectores de alta capacidad" y son muy utilizados como vectores de clonación para la construcción

de genotecas genómicas, como en el Proyecto Genoma Humano]. La disponibilidad de determinados clones del genoma es lo que determina la posibilidad de diseñar o menos una sonda específica para una región genómica concreta. Usando la tecnología que la casa comercial Agilent desarrolló para la construcción de los arrays de expresión, se pueden diseñar oligonucleótidos específicos para la región de interés (se diseñan evitando las secuencias repetidas dispersas a lo largo del genoma); esto permite mejorar significativamente la especificidad y sensibilidad de la sonda, además de disminuir el solapamiento de áreas que no se quieren estudiar aumentando la cobertura genómica específica (Ver Figuras 1 y 2).

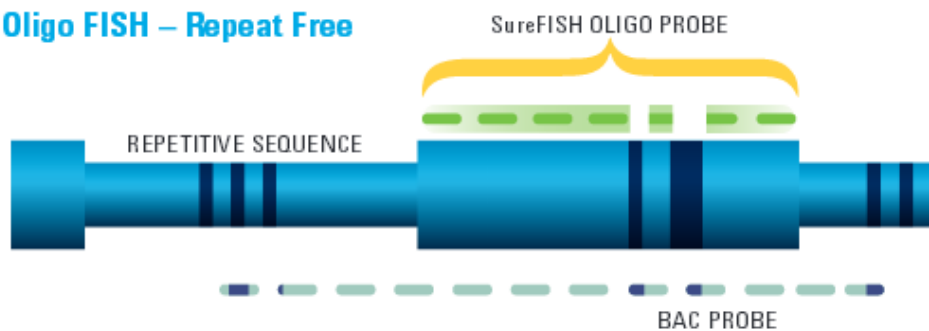


SureFISH Probes are designed in silico to allow precise targeting of the sequence of interest.

Figura 1. Diseño general de las sondas Sure-FISH



Oligo FISH – Repeat Free



Repeat free probes lead to minimal cross hybridization and low background

Figura 2. Comparación de las sondas SureFISH y los BACs tradicionales

Otro inconveniente que se ve solucionado mediante la tecnología de la casa comercial Agilent es la limitación del tamaño de las sondas. Mediante el uso de los BACs el tamaño mínimo de las sondas tenía que ser mayor o igual a 150kb. Gracias a las sondas diseñadas mediante oligonucleótidos, se puede bajar hasta 50Kb el tamaño mínimo y existen datos en la literatura de trabajos realizados con sondas incluso de 20Kb. A pesar de que estas no pueden ser nuestras aplicaciones (esa resolución está pensada para estudios citogenéticos en metafase y no en interfase como es nuestro caso), se puede aprovechar esta ventaja para localizar alteraciones genéticas de pequeño tamaño (como es nuestro caso). Un ejemplo de esta ventaja se puede ver en la Figura 3.

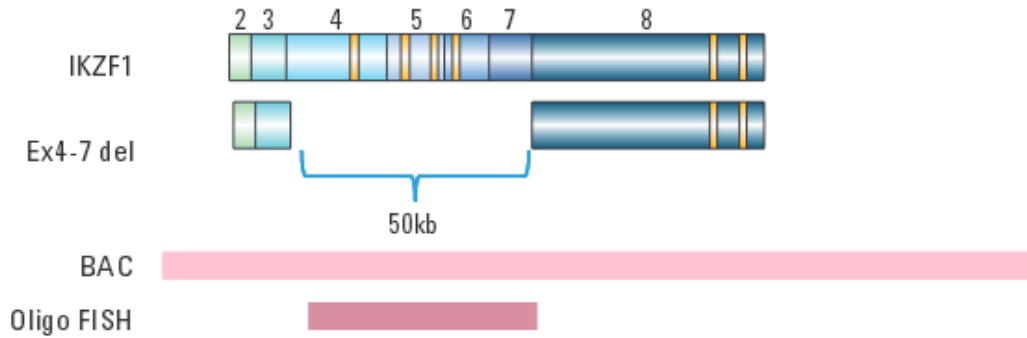


Figura 3. Las sondas sureFISH se pueden utilizar para la detección de alteraciones de pequeño tamaño.

Conclusión:

Gracias a la financiación recibida hemos podido reunir la serie de casos de sarcoma de Ewing de nuestro hospital y realizar una caracterización detallada. Ésta nos ha permitido encontrar 13 tumores que pueden corresponder a sarcomas de Ewing-like. Nuestro objetivo para la segunda anualidad es, gracias a las sondas de FISH puestas a punto, caracterizar este grupo de casos. Ayudaremos también a la caracterización de casos de otros hospitales españoles incluidos en el protocolo EuroEwing 2012, que es el protocolo actual de referencia en Europa, especialmente cuando se sospeche que el tumor no es un sarcoma de Ewing sino un sarcoma de Ewing-like. La adecuada caracterización diagnóstica de estos casos contribuirá a una mejor evaluación de la capacidad terapéutica de los protocolos actuales para sarcoma de Ewing en el grupo de pacientes con sarcomas de Ewing-like, así como, a medio plazo, en el hallazgo de terapias más adecuadas para dichos pacientes.