

TÍTULO

OPTIMIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO Y MANEJO CLÍNICO DEL RETINOBLASTOMA

INVESTIGADOR PRINCIPAL

ADELA ESCUDERO LÓPEZ. PhD. Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM). Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (INGEMM-IdiPAZ), Madrid.

EQUIPO INVESTIGADOR

- Beatriz Ruz, Bioinformática. Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM). Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (INGEMM-IdiPAZ), Madrid
- Alicia Pernas, Técnico de laboratorio. Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM). Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (INGEMM-IdiPAZ), Madrid.
- Antonio Pérez Martínez, MD, PhD. Jefe de Servicio de Hematooncología Pediátrica. Hospital Universitario La Paz. Madrid.
- Sonsoles San Román, MD. Médico adjunto del Servicio de Hematooncología Pediátrica. Hospital Universitario La Paz, Madrid.
- Dolores Corral, MD, PhD. Médico adjunto del Servicio de Hematooncología Pediátrica. Hospital Universitario La Paz, Madrid.
- Beatriz Tarabini-Castellani Ciordia, MD. Médico residente del Servicio de Padiatría del Hospital Universitario de Cruces, Barakaldo, País Vasco, Spain.
- Susana Noval, MD, PhD. Jefe de Sección del Servicio de Oftalmología Infantil. Hospital Universitario La Paz. Madrid.
- Nuria Rodríguez Salas, MD, PhD. Médico adjunto del Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario La Paz. Madrid.

PALABRAS CLAVE: Retinoblastoma, cáncer infantil, secuenciación masiva, predisposición a cáncer, segundas neoplasias, *RB1*.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN: Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz, Madrid. **DIRECCIÓN:** Paseo de la Castellana, 162 28046

NÚMERO DE TELÉFONO: +34 912 071 010 ext: 241

1. A. RESUMEN DIVULGATIVO DEL PROYECTO

Mejora y actualización del diagnóstico genético y del seguimiento de pacientes de retinoblastoma

El retinoblastoma es un tipo de cáncer causado por mutaciones en las dos copias del gen *RB1*. Aproximadamente la mitad de los pacientes que desarrollan este tipo de tumor tienen mutaciones en una de las dos copias del gen en línea germinal, es decir, en todas las células del organismo. La identificación de dichas mutaciones permite no sólo diagnosticar a los pacientes sino adaptar su tratamiento. A pesar de su importancia, con las técnicas genéticas que se emplean a día de hoy, no se pueden detectar mutaciones en mosaico, descritas en un 6%-30% de los casos, lo que significa que existen pacientes que no están siendo correctamente diagnosticados. Aquellos pacientes en los que sí se identifica la mutación germinal conocidos como hereditarios, presentan además de un mayor riesgo a desarrollar retinoblastoma, un riesgo aumentado a edades más tardías a desarrollar otros tipos de cáncer como son los sarcomas o los melanomas. Sin embargo, no existen a día de hoy recomendaciones en el seguimiento para este grupo de pacientes. En este estudio proponemos completar los estudios genéticos convencionales con técnicas genéticas avanzadas y revisar todas las historias clínicas de los pacientes atendidos en nuestro hospital en los últimos 30 años con el fin de mejorar el diagnóstico genético y poder ofrecer un seguimiento personalizado e individualizado a cada uno ellos.

1. B. RESUMEN CIENTÍFICO DEL PROYECTO

Optimización del diagnóstico y manejo clínico del retinoblastoma

La etiología del retinoblastoma se debe en la mayoría de los casos a mutaciones bialélicas del gen *RB1*. En un 50-60% de los pacientes estas mutaciones están presentes en heterocigosis en línea germinal y su identificación es clave no sólo para el diagnóstico y asesoramiento genético de las familias sino también para el manejo clínico de los pacientes. A pesar de su relevancia, la sensibilidad de los estudios genéticos rutinarios impide la detección de mutaciones en mosaico, descritas entre un 6% y un 30% de los casos. Aquellos pacientes que presentan mutaciones germinales, ya sean en mosaico o en heterocigosis, tendrán un riesgo aumentado de desarrollar retinoblastoma a edades muy tempranas y otros tipos de cáncer, principalmente sarcomas, a edades más tardías. Sin embargo, a día de hoy no existe un consenso que establezca un seguimiento adecuado en función del tipo de tumor y los resultados genéticos de los pacientes. En este proyecto planteamos el estudio genético de pacientes no portadores empleando secuenciación masiva a alta profundidad y la revisión clínica de pacientes de retinoblastoma unilateral y bilateral con el fin de optimizar su diagnóstico e individualizar su manejo clínico y seguimiento.

2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

El retinoblastoma (RB, OMIM:180200) es el tumor ocular más frecuente con una incidencia aproximada de 1 de cada 20.000 recién nacidos vivos¹. Se desarrolla en la mayoría de los casos a edades muy tempranas, antes de los 5 años de edad y puede ser unilateral (60% de los casos) o bilateral (40% de los casos). Su diagnóstico se basa en la presencia de determinados signos clínicos como la leucocoria o el estrabismo que aparecen en un gran número de pacientes, aunque también pueden debutar con otros signos oculares o más generales².

En relación a su etiología, descrita en 1971 por Alfred G. Knudson, la mayoría de casos de retinoblastoma se originan por la inactivación bialélica del gen *RB1* que codifica la proteína supresora del ciclo celular conocida como Rb³. La inactivación de los alelos del gen *RB1* se produce por mutaciones genéticas que pueden ser somáticas o germinales. Las mutaciones somáticas son aquellas que aparecen únicamente en las células de la retina y por lo tanto no se heredan ni se transmiten a la descendencia. Por el contrario, las mutaciones en línea germinal se heredan con un alto grado de penetrancia de forma que el 90% de los portadores desarrollarán la enfermedad⁴. La probabilidad de presentar mutaciones germinales o somáticas va a variar en función del tipo de retinoblastoma (unilateral o bilateral) y de la presencia o ausencia de antecedentes familiares (AF) diagnosticados de la misma patología. En los casos de pacientes unilaterales o bilaterales con AF o bilaterales sin AF la probabilidad de encontrar causa genética será prácticamente del 100%. En cambio, sólo un 15% de los pacientes con retinoblastoma unilateral sin AF serán portadores de mutaciones en heterocigosis el gen *RB1*. Actualmente el diagnóstico genético del retinoblastoma, recomendado independientemente del tipo de tumor e historia familiar de cáncer, se basa en la secuenciación completa del gen *RB1* y de la detección del número de copias (CNVs). Para ello, se emplean técnicas como la secuenciación Sanger o el MLPA.

En los últimos años, gracias al desarrollo de técnicas genéticas de mayor sensibilidad como la secuenciación masiva, se ha descrito la presencia de mutaciones en mosaico en un 30 y 6% de pacientes bilaterales y unilaterales respectivamente. Las mutaciones en mosaico pueden transmitirse a la descendencia pero a diferencia de las mutaciones en heterocigosis, aparecen a lo largo del desarrollo y no afectan a todas las células del organismo lo que impide su detección con técnicas convencionales y muestra la necesidad de emplear otras técnicas de última generación para poder ofrecer un diagnóstico y asesoramiento genético adecuado^{5,6,7}.

Los portadores de mutaciones en el gen *RB1*, tanto en heterocigosis como en mosaico, que sobreviven al retinoblastoma tienen un riesgo incrementado, comparado con la población en general, de desarrollar otros tipos de cáncer. Tal y como han descrito varios autores, desarrollan

mayoritariamente sarcomas seguidos de melanoma y tumores del sistema nervios central^{8,9}.

El porcentaje de pacientes que desarrollan segundas neoplasias aumenta con la edad y depende del tratamiento recibido (Figura 1). En general, la probabilidad de que un paciente diagnosticado de retinoblastoma hereditario desarrolle un segundo tumor es del 15-30% mientras que en el caso de los no hereditarios este porcentaje disminuye al 1-2%⁹⁻¹¹. La administración de radioterapia es un factor a tener en cuenta en relación a la predisposición a cáncer ya que se ha demostrado un aumento de un 17% aproximadamente en la incidencia acumulada de segundos tumores en aquellos pacientes de retinoblastoma hereditario que recibieron radioterapia comparado con aquellos casos portadores de mutación en el gen *RB1* que recibieron otro tipo de tratamiento¹¹ (Figura 1).

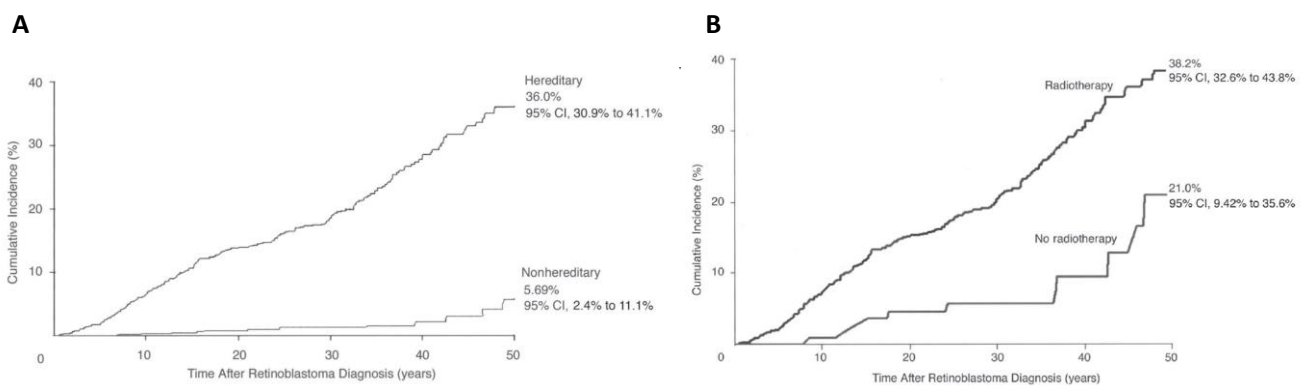


Figura 1. Incidencia acumulada de segundos tumores en pacientes diagnosticados de retinoblastoma hereditario y no hereditario (A) y en pacientes tratados con y sin radioterapia (B). Figura modificada de Kleinerman y col. 2005.

Todos estos datos ponen de manifiesto no sólo la necesidad de llevar a cabo estudios genéticos complementarios sino también la importancia de realizar un seguimiento adecuado a cada uno de los pacientes para favorecer las estrategias de asesoramiento y diagnóstico precoz.

Referencias

- 1 Kivela T. The epidemiological challenge of the most frequent eye cancer: retinoblastoma, an issue of birth and death. *Br J Ophthalmol* 2009; 93:1129-1131.
- 2 Balmer A, Zografos L & Munier F. Diagnosis and current management of retinoblastoma. *Oncogene* 2006; 25:5341-5349.
- 3 Knudson A G, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68:820-823.
- 4 Cowell J K. The genetics of retinoblastoma. *Br J Cancer* 1991; 63:333-336.
- 5 Rushlow D, Piovesan B, Zhang K *et al*. Detection of mosaic *RB1* mutations in families with retinoblastoma. *Hum Mutat* 2009; 30:842-851.
- 6 Astudillo P P, Chan H S, Heon E & Gallie B L. Late-diagnosis retinoblastoma with germline mosaicism in

- an 8-year-old. J AAPOS 2014; 18:500-502.
- 7 National Retinoblastoma Strategy Canadian Guidelines for Care: Strategie therapeutique du retinoblastome guide clinique canadien. Can J Ophthalmol 2009; 44 Suppl 2:S1-88.
 - 8 Kleinerman R A, Tucker M A, Abramson D H, Seddon J M, Tarone R E & Fraumeni J F, Jr. Risk of soft tissue sarcomas by individual subtype in survivors of hereditary retinoblastoma. J Natl Cancer Inst 2007; 99:24-31.
 - 9 Kleinerman R A, Yu C L, Little M P *et al.* Variation of second cancer risk by family history of retinoblastoma among long-term survivors. J Clin Oncol 2012; 30:950-957.
 - 10 MacCarthy A, Bayne A M, Brownbill P A *et al.* Second and subsequent tumours among 1927 retinoblastoma patients diagnosed in Britain 1951-2004. Br J Cancer 2013; 108:2455-2463.
 - 11 Kleinerman R A, Tucker M A, Tarone R E *et al.* Risk of new cancers after radiotherapy in long-term survivors of retinoblastoma: an extended follow-up. J Clin Oncol 2005; 23:2272-2279.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Actualmente el diagnóstico genético convencional no incluye la detección de mutaciones en mosaico presentes en un 30% y 6% de los pacientes diagnosticados de retinoblastoma bilateral y unilateral respectivamente, lo que quiere decir que no se identifican el porcentaje real de pacientes portadores de mutaciones en el gen *RB1*. Además, a pesar de conocerse el riesgo aumentado de segundas neoplasias en los pacientes de retinoblastoma hereditario, no se han establecido a día de hoy unas recomendaciones en relación al seguimiento de esta patología. Nuestra hipótesis es que la utilización de tecnologías de alta resolución como la secuenciación masiva a gran profundidad junto con la creación de una base de datos que recoja información clínica sobre pacientes diagnosticados de retinoblastoma nos permitirá mejorar la tasa diagnóstica de esta enfermedad y establecer estrategias de seguimiento adaptadas e individualizadas a cada uno de los pacientes.

Para probar nuestra hipótesis planteamos los siguientes objetivos:

- Establecer el porcentaje de mutaciones en mosaico en los pacientes de retinoblastoma no portadores tras la realización de los estudios genéticos convencionales (Sanger y MLPA).
- Identificar el porcentaje de pacientes de retinoblastoma hereditario y no hereditario tratados con y sin radioterapia que desarrollan segundas neoplasias.

4. METODOLOGÍA

4.1. Muestras, datos clínicos y consentimiento informado

Nuestro proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Ética de Investigación con Medicamentos (CEIm) y todos los pacientes o familias que deseen participar en él recibirán información detallada sobre el estudio y deberán firmar, en caso de realizar estudio genético, el consentimiento informado.

Se trata de un estudio retrospectivo en el que se incluirán pacientes diagnosticados de retinoblastoma entre 1998 y 2019. Para la identificación de mutaciones en mosaico se extraerá una muestra de sangre periférica. Para calcular la probabilidad de segundas neoplasias se elaborará una base de datos anonimizada en la que se incluirá información sobre variables clínicas y biológicas como los resultados genéticos, la edad del paciente, la fecha del diagnóstico, la historia familiar de cáncer, el tipo de tratamiento recibido y la fecha del último seguimiento.

Actualmente contamos con información clínica y genética de una cohorte retrospectiva de 300 pacientes. De todos ellos hay al menos 129 casos de retinoblastoma unilateral en los que no se detectó ninguna mutación en el gen *RB1* tras realizar los estudios genéticos convencionales.

4.2. Extracción de DNA/RNA

Las muestras de ADN se extraerán empleando los protocolos que se utilizan habitualmente en el laboratorio. La extracción de ADN se llevará a cabo con el sistema de extracción automática Chemagic (Chemagen). La concentración e integridad de las muestras extraídas se determinará con los espectrofotómetros TECAN y Qbit.

4.3. Detección de alteraciones genéticas

Todas las muestras de diagnóstico, recaída y remisión serán analizadas empleando un panel de captura propio diseñado con la plataforma Nimblegen de Roche (<https://design.nimblegen.com>). Este panel ha sido previamente validado y puesto a punto en nuestro laboratorio y nos permite identificar mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones (indels) y alteraciones en el número de copias (CNVs) e el gen *RB1*. El proceso de secuenciación, que se utiliza de forma rutinaria en nuestro centro con la plataforma de Illumina, se divide en varias etapas: la primera consiste en la generación de librerías, hibridación con la sonda de captura y secuenciación. A continuación, en el secuenciador empleado (HiSeq, NextSeq o Miseq) realizará el análisis primario de los datos, seguido de un análisis secundario que se desarrolla en la unidad de bioinformática para mutaciones puntuales e indels.

4.1. Interpretación de resultados

Los resultados obtenidos de CNVs, mutaciones puntuales e indels se filtrarán y visualizarán con la ayuda del programa VarSeq 2.2.0 (Golden Helix) y Alamut Visual 2.11. La clasificación de variantes se realizará de acuerdo con lo establecido en las guías y recomendaciones de la ACMG (Richards et al. 2015).

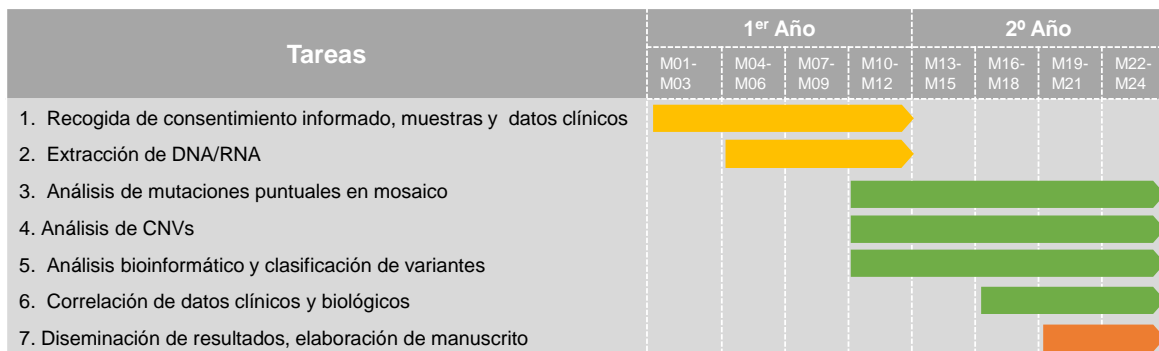
4.2. Análisis estadístico

Se realizará un estudio descriptivo de los datos cualitativos y cuantitativos indicando número y

porcentaje o media y desviación estándar, respectivamente. Los datos cuantitativos se compararán con la t de Student (el test de Mann-Whitney) y el test estadístico log rank. La correlación entre variables clínicas y genéticas se realizará con la regresión Cox. Todos los datos serán analizados usando los programas de análisis estadístico SPSS y SigmaPlot.

5. CRONOGRAMA

El proyecto se desarrollará con la elaboración de las tareas propuestas tal y como se resume en el siguiente cronograma:



6. PRESUPUESTO

El presupuesto estimado pretende cubrir los gastos de material fungible asociado a la secuenciación 129 muestras, al almacenamiento y al procesamiento de los datos obtenidos del proceso de secuenciación. Dicho presupuesto queda condicionado a la disponibilidad del equipo NextSeq que actualmente tenemos en nuestro centro y a los precios de los reactivos actualizados en enero de 2020.

Material fungible (SUBTOTAL)	51.600 €
Purelink genomic DNA kit (Life Technologies)	ESTUDIO NGS 400 €/muestra
Covaris® M220 microTUBE, Screw-Cap (Life Technologies)	
KAPA High-Throughput Library Prep Kit (Roche Nimblegen)	
SeqCap Adapter Kit A (Roche Nimblegen)	
Agilent DNA 1000 Kit (Agilent)	
NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (Illumina)	
Agencourt AMPure XP Kit (Izasa)	
SeqCap EZ Choice Library (Roche Nimblegen)	
SeqCap EZ Pure Capture Bead Kit (Roche Nimblegen)	
Instalaciones y equipos (SUBTOTAL)	2.000 €
Almacenamiento de datos bioinformáticos	2.000 €
Personal (SUBTOTAL)	0 €
Costes indirectos (15%)	9.450 €
TOTAL	63.050 €