

Análisis del gen de fusión COL1A1-PDGFB en un caso de dermatofibrosarcoma protuberans con componente de fibrosarcoma

Beatriz Llombart^{a,b}, Onofre Sanmartín^a, José A. López-Guerrero^c, Carlos Monteagudo^b, Silvia Calabuig^b, Rafael Botella^a, Eduardo Nagore^a, Celia Requena^a, Carlos Guillén^a, Antonio Cremades^d, Antonio Pellín^b y Antonio Llombart-Bosch^b

^aServicio de Dermatología. Instituto Valenciano de Oncología. Valencia. España.

^bDepartamento de Patología. Facultad de Medicina de Valencia. España.

^cUnidad de Biología Molecular. Instituto Valenciano de Oncología. Valencia. España.

^dServicio de Anatomía Patológica. Instituto Valenciano de Oncología. Valencia. España.

Resumen.—El dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP) es un tumor poco frecuente, de malignidad intermedia, con poca tendencia a desarrollar metástasis, pero con una alta frecuencia de recidiva local. Citogenéticamente, el DFSP se caracteriza por presentar la translocación recíproca t(17;22)(q22;q13) que condiciona en la fusión del gen del colágeno tipo α (COL1A1), en el cromosoma 17q, con el gen de la cadena β del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFB), en el cromosoma 22q. La fusión de estos genes es variable, implicando a alguno de los 51 exones del gen COL1A1 con el exón 2 del gen PDGFB. Presentamos el caso de una mujer de 37 años con una tumoración en el brazo cuya histología muestra una infiltración neoplásica del tejido celular subcutáneo constituido por células fusiformes de núcleo elongado con un patrón estoriforme y otras células más pleomórficas con un patrón en espina de pescado siendo compatible con DFSP con componente de fibrosarcoma. El estudio de biología molecular con material incluido en parafina mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y posterior secuenciación muestra una nueva fusión del exón 19 del gen COL1A1 con el exón 2 de PDGFB, apoyando un diagnóstico de DFSP. El estudio de los productos de fusión COL1A1-PDGFB es útil en casos donde la histología y la inmunohistoquímica son insuficientes para el diagnóstico diferencial del DFSP con otros sarcomas y además, justifica la aplicación de nuevas vías de tratamiento farmacológico con los inhibidores de la tirosinasa.

Palabras clave: dermatofibrosarcoma protuberans, fibrosarcoma, COL1A1, PDGFB, RT-PCR, imatinib.

ANALYSIS OF THE COL1A1-PDGFB FUSION GENE IN A CASE OF DERMATOFIBROSARCOMA PROTUBERANS WITH A FIBROSARCOMA COMPONENT

Abstract.—Dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP) is an infrequent tumor of intermediate malignancy, with little tendency to develop metastases but with a high rate of local recurrence. Cytogenetically, DFSP is characterized by a reciprocal translocation, t(17;22)(q22;q13), which is a conditioning factor in the fusion of the collagen type I alpha I gene (COL1A1) in chromosome 17q with the platelet-derived growth factor beta chain gene (PDGFB) in chromosome 22q. The fusion of these genes is variable, involving one of the 51 exons of the COL1A1 gene and exon 2 of the PDGFB gene. We present the case of a 37-year-old woman with a tumor on the arm whose histology showed a neoplastic infiltration of the subcutaneous cellular tissue made up of fusiform cells with an elongated nucleus in a storiform pattern and other more pleomorphic cells in a herringbone pattern, compatible with DFSP with a fibrosarcoma component. The molecular biology study with RT-PCR analysis of paraffin-embedded material and later sequencing showed a new fusion of exon 19 of the COL1A1 gene and exon 2 of PDGFB, supporting a diagnosis of DFSP. A study of the COL1A1-PDGFB fusion products is useful in cases where histology and immunohistochemistry are insufficient for the differential diagnosis of DFSP versus other sarcomas. It also justifies the use of new avenues of treatment with tyrosine kinase inhibitors.

Key words: dermatofibrosarcoma protuberans, fibrosarcoma, COL1A1, PDGFB, RT-PCR, imatinib.

INTRODUCCIÓN

El dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP) es un tumor poco frecuente, de malignidad intermedia, con una baja incidencia de metástasis, pero con alta frecuencia de recurrencia local. El diagnóstico histológi-

co de este tumor en ocasiones puede resultar difícil, y es necesario en estos casos realizar un estudio inmunohistoquímico para diferenciarlo de dermatofibromas atípicos y de otros sarcomas^{1,2}. Sin embargo, estas técnicas no siempre son suficientes para establecer un diagnóstico adecuado. Recientemente, se han descrito en el DFSP rasgos citogenéticos específicos como la translocación recíproca t(17;22)(q22;q13) o, más a menudo, cromosomas supernumerarios en anillo derivados de la t(17;22)³. Como consecuencia de esta translocación, se produce una fusión génica entre el gen del colágeno tipo I α (COL1A1), en el cromosoma 17q, con el gen de la cadena β del factor de creci-

Correspondencia:

Beatriz Llombart. Profesor Beltrán Báguena, 8.
46015 Valencia. España.
Beatriz.llombart@uv.es

Recibido el 28 de noviembre de 2005.

Aceptado el 24 de abril de 2006.

Estudio parcialmente realizado con la ayuda FIS P1040822.

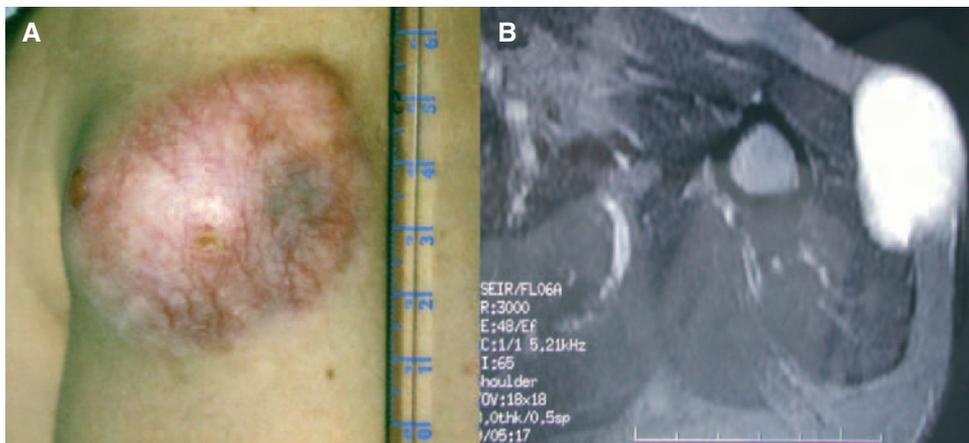


Fig. 1.—A) Tumoración localizada en la parte proximal del brazo de 8 × 4 cm. B) Resonancia magnética nuclear: infiltración por la tumoración del músculo deltoideos.

miento derivado de las plaquetas (PDGFB), en el cromosoma 22q, y cuya expresión puede detectarse mediante técnicas de biología molecular, como amplificación mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) utilizando iniciadores específicos⁴. Esta translocación es exclusiva del DFSP y del fibroblastoma de células gigantes (variedad infantil del DFSP).

En este estudio, presentamos el caso de un DFSP con componente de fibrosarcoma, donde el estudio de biología molecular realizado sobre material incluido en parafina mediante RT-PCR muestra la presencia de un transcrito de fusión que implica al exón 19 del COL1A1 y al exón 2 del PDGFB, lo que apoya el diagnóstico de DFSP.

DESCRIPCIÓN DEL CASO

Una mujer de 37 años de edad, sin antecedentes personales de interés, fue remitida al Servicio de Dermatología de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología para tratamiento quirúrgico de una tumoración localizada en la parte proximal del brazo izquierdo, en la región deltoidea. La paciente refería hacía 9 años la aparición de una lesión nodular de pequeño tamaño, de crecimiento lento y progresivo, extirpada en el servicio de cirugía con diagnóstico histológico de dermatofibroma. A los 6 años de la intervención apareció en la zona de la cicatriz, un nódulo subcutáneo que fue interpretado como queloide, tanto clínica como histológicamente. La paciente había sido tratada posteriormente con infiltraciones de corticoides intralesionales e imiquimod, con escasa respuesta. En los últimos 4 meses se habría producido un rápido crecimiento de la lesión, motivo por el que consultó al dermatólogo.

A la exploración física se apreciaba una tumoración sobreelevada, intradérmica de 8 × 4 cm de tamaño, muy indurada e infiltrada a la palpación (fig. 1A). La zona superficial presentaba capilares ramificados y di-

latados con zonas blanquecinas, nacaradas y brillantes de aspecto cicatrizal. La resonancia magnética de la zona afectada efectuada para valorar la extensión del tumor, reveló un desplazamiento del músculo deltoideos y la existencia de infiltración muscular por la lesión en dicho músculo (fig. 1B). La biopsia cutánea mostró la presencia de una tumoración en la dermis con infiltración del tejido celular subcutáneo, constituida por células fusiformes de núcleo elongado con un patrón estoriforme y otras células más pleomórficas con un mayor índice mitótico, con una disposición en largos fascículos, adoptando un patrón en espina de pescado (fig. 2A). El estudio inmunohistoquímico mostró una tinción intensa citoplasmática con CD34 en más del 90 % de las células fusiformes con patrón estoriforme, con mínima inmunotinción en las células pleomórficas de la zona de patrón en espina de pescado (fig. 2B). El factor XIIIa fue negativo en la población tumoral.

La paciente fue intervenida mediante cirugía micrográfica de Mohs con bloque en parafina, con exéresis en bloque del tumor, incluyendo fascículos superficiales del músculo deltoideos, necesitando un estadio de 1 cm para obtener márgenes negativos. El defecto resultante, de 9 × 5 cm, se cerró mediante sutura directa. Tras un año de seguimiento, la paciente no presenta evidencia clínica ni radiológica de enfermedad.

Para el estudio de biología molecular se partió de 5 cortes de 5 µm que se sometieron a un pretratamiento de desparafinación con sucesivos lavados en xilol y etanol, seguido de una digestión enzimática con proteinasa K a 55 °C durante 3 h. A continuación, se llevó a cabo la extracción de ARN siguiendo un procedimiento modificado del desarrollado por Chomzynski y Sacchi⁵, que emplea el TRIZOL® Reagent (GIBCO BRL). Tras la obtención del ARN se comprobó la integridad del mismo en una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en condiciones no desnaturantes en los que se correrán 1 µl de ARN. La presencia de 2 bandas, correspondientes al ARN ribosómico

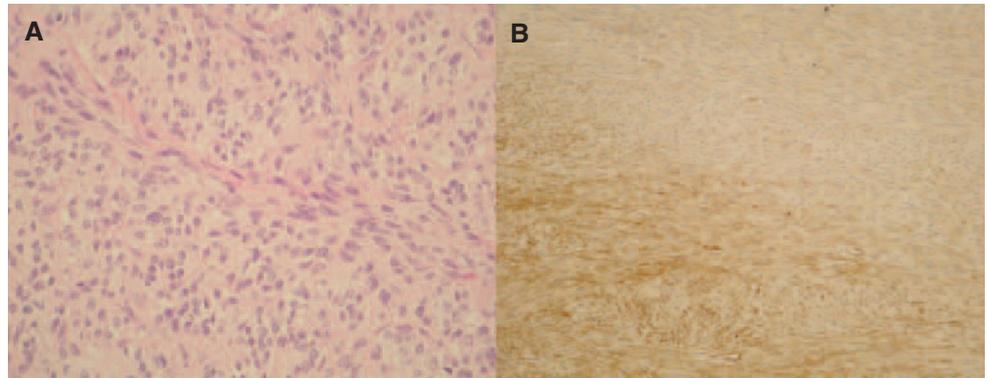


Fig. 2.—A) Células pleomórficas, con disposición en largos fascículos típicos de fibrosarcoma. (Hematoxilina-eosina, $\times 200$.) B) Tinción intensa citoplasmática con CD34 en la zona típica de DFSP, siendo mínima la inmunotinción en las células pleomórficas de la zona de fibrosarcoma.

28S y 18S tras tinción del gel en bromuro de etidio y visualización con luz ultravioleta, confirmaría la integridad del ARN obtenido.

Para la transcripción inversa (RT) se empleó un *kit* comercial y se siguieron las recomendaciones del fabricante (GeneAmp RNA PCR Core Kit, Applied Biosystems). En nuestro caso se preparó un volumen de ADNc suficiente (60 μ l) como para poder realizar un cribado completo de los exones del COL1A1. En primer lugar realizamos una primera aproximación mediante 4 PCR múltiples que incluyen además de un iniciador localizado en el exón 2 del gen PDGFB (5'-atcaaggagcggatcgagtggc-3') (común en todas las PCR múltiples) y otros localizados a lo largo del gen COL1A1 (tabla 1)⁴. También se amplificó una región del gen CDK4 como control de la presencia de ARN en la muestra analizada. El estudio mostró positividad del gen control además de en la PCR múltiple II. A continuación se volvió a amplificar el producto de ADNc con los iniciadores del Set II pero esta vez por separado confirmándose la presencia del gen de fusión COL1A1-PDGFB con un iniciador localizado en el exón 17 del gen COL1A1 y otro en el exón 2 del gen PDGFB (fig. 3A). Por último, el producto obtenido se estudió mediante secuenciación empleando el *kit* de secuenciación BigDye v3.1. La reacción de secuenciación se determinó mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI3130 confirmándose la fusión del exón 19 del COL1A1 con el exón 2 del PDGFB (fig. 3B).

TABLA 1. CEBADORES UTILIZADOS DEL GEN COL1A1

Mezclas de cebadores del COL1A1	Exón	Secuencia
I	Exón 5	5'-gccgagatggcatcctgg-3'
	Exón 8	5'-ccctggtgagcctggcga-3'
	Exón 11	5'-tcagggtgctcgaggattgc-3'
	Exón 15	5'-ggtgctcgaggaaatgatgg-3'
II	Exón 17	5'-aaggtccccagggtgtgcg-3'
	Exón 20	5'-aacctggtgctcctggcagc-3'
	Exón 23	5'-aagctggtgctcccggtaagc-3'
	Exón 26	5'-aagctggagagcagaggtgttc-3'
III	Exón 27	5'-tgctggcaaatgagagagg-3'
	Exón 32	5'-tagaacgtggtgagctggtcttc-3'
	Exón 35	5'-tcccactggagctcgtgg-3'
	Exón 38	5'-tgctcctggagccaaagggtgc-3'
IV	Exón 40	5'-tgctggcagaaaggatcccctg-3'
	Exón 43	5'-tggaagagtggtgatcgtgg-3'
	Exón 46	5'-tggtctctctggcctccaggg-3'
	Exón 49	5'-acctcaagagaaggctcacgatgg-3'

DISCUSIÓN

El DFSP es el tumor fibrohistiocitario de malignidad intermedia más frecuente, que constituye aproximadamente el 1,8 % de todos los sarcomas de partes

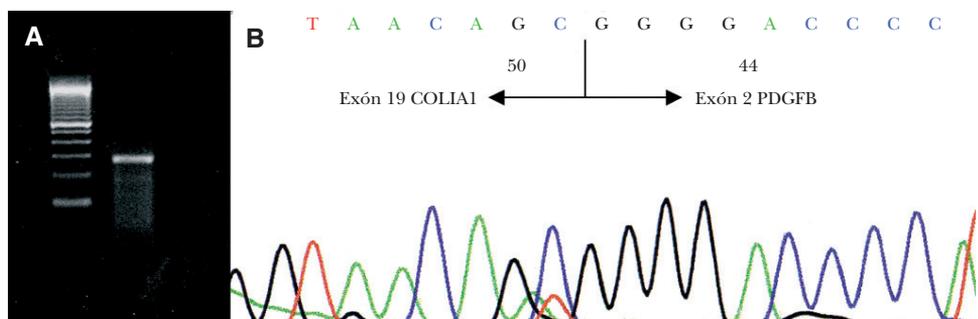


Fig. 3.—A) Detección por RT-PCR de la translocación COL1A1-PDGFB. B) Análisis de la secuenciación de nucleótidos mostrando la fusión del exón 19 COL1A1 con el exón 2 PDGFB.

blandas y el 0,1 % de todos los cánceres. Su incidencia se ha estimado entre 0,8 y 5 casos por millón de habitantes y año^{1,2,6}. Se caracteriza por un crecimiento infiltrativo lento, con poca tendencia a las metástasis a distancia, pero con una elevada capacidad de destrucción local y alta frecuencia de recidiva tras el tratamiento quirúrgico.

Histológicamente, el DFSP es un tumor intradérmico de gran tamaño, constituido por células fusiformes monomorfas de núcleo elongado con depósito de colágeno intercelular y presencia de pequeños capilares. La epidermis suele estar respetada, presentando la dermis papilar una zona libre de lesión o zona «Grenz». Las células por lo general se entrecruzan y adquieren un patrón estoriforme, con infiltración del tejido celular subcutáneo, creando una imagen en panal característico⁷. Existen variedades histológicas de DFSP como la presencia de melanina en las células dendríticas (tumor de Bednar), cambios mixoides, mioides, células multinucleadas gigantes con pseudoespacios vasculares (fibroblastoma de células gigantes), y formas más pleomórficas (fibrosarcoma). En series largas descritas en la literatura médica entre el 10 y el 15 % de los casos presentan áreas de fibrosarcoma, considerándose estas lesiones de mayor agresividad biológica y de mayor riesgo metastásico⁸.

Las técnicas inmunohistoquímicas son de gran utilidad en el diagnóstico diferencial con los dermatofibromas atípicos y otros sarcomas, pues hasta el 90 % de los DFSP son CD34 positivos, y únicamente el 10 % son factor XIIIa positivos^{9,10}. Sin embargo, en ocasiones, estas técnicas no son suficientes para establecer un diagnóstico adecuado.

La primera evidencia del gen de fusión entre los genes COL1A1 y PDGFB como consecuencia de la translocación t(17;22) con técnicas de RT-PCR en DFSP se publicó en 1995 por Minoletti et al¹¹. En estudios más recientes se ha demostrado que alrededor del 90 % de los casos de DFSP presentan la translocación t(17;22)⁴. Sin embargo, se han tratado siempre de series cortas de pacientes, por lo que la frecuencia real de la translocación está todavía por demostrar. La región de rotura en la t(17;22) afecta en todos los casos descritos hasta la fecha al exón 2 del gen PDGFB, localizado en el cromosoma 22, que se fusiona con alguno de los exones del gen COL1A1 localizado en el cromosoma 17. Los puntos de fusión en COL1A1 son muy variables y pueden afectar a cualquiera de sus 51 exones. En nuestro caso, el punto de fusión se produce entre el exón 19 del COL1A1 y exón 2 del PDGFB y no ha sido descrito previamente. Hasta la fecha, no se ha encontrado relación entre los diferentes puntos de fusión descritos en la literatura médica con el subtipo histológico, localización anatómica, u otro factor estudiado, incluidos los parámetros de recurrencia y progresión.

La presencia del gen de fusión COL1A1-PDGFB en el DFSP puede demostrarse aislando ARN del tumor,

bien de muestras fijadas e incluidas en parafina o a partir del tejido criopreservado, y utilizando procedimientos de biología molecular como el de la RT-PCR. Estas técnicas son altamente sensibles y específicas pero presentan una serie de dificultades inherentes, especialmente cuando sólo se dispone de material incluido en parafina, pues el ARN extraído en muchas ocasiones es escaso y de mala calidad lo que disminuye considerablemente la sensibilidad del procedimiento. Otra dificultad añadida en el caso de los DFSP consiste en la gran variabilidad del punto de fusión en el COL1A1, que como hemos indicado anteriormente, puede encontrarse en cualquiera de sus 51 exones. Esta heterogeneidad obliga a la optimización del proceso de detección del gen de fusión mediante PCR múltiples que abarquen la totalidad de los exones del gen COL1A1. Pero a pesar de ello, no deja de ser una técnica muy laboriosa y de resultados no siempre satisfactorios.

La proteína de fusión generada por el gen de fusión COL1A1-PDGFB, es procesada a nivel extracelular hasta transformarse en PDGFB completamente maduro y funcional, capaz de inducir un potente estímulo mitógeno mediante la activación de su receptor¹². Por tanto, la consecuencia fundamental de la translocación t(17;22) es inducir una activación del receptor del PDGFB, mediante la producción autocrina y paracrina de su ligando funcional.

El conocimiento de este mecanismo de acción del producto de fusión COL1A1-PDGFB en DFSP ha sugerido que el empleo de inhibidores de la familia de las tirosincinasa, como el mesilato de imatinib puede ser útil en casos de DFSP no susceptibles de tratamiento quirúrgico radical, ofreciendo así una alternativa terapéutica. De hecho, en casos aislados en los que se ha empleado imatinib en DFSP, se han obtenido elevadas tasas de respuesta, lo que sostiene la hipótesis de que las células del DFSP dependen de la expresión aberrante del *PDGFRB* para la proliferación y supervivencia celular¹³. En cultivo de tejidos de DFSP se ha demostrado que el imatinib interfiere con el PDGFB^{12,14,15}, y algunos autores sugieren que este fármaco induce a la apoptosis de las células tumorales pudiendo destruir totalmente el tumor¹⁶, mientras otros piensan que produce una alteración del fenotipo del DFSP disminuyendo su índice de proliferación y en consecuencia su tamaño tumoral, pero no erradicándolo¹⁷.

En conclusión, presentamos un caso de DFSP con componente de fibrosarcoma con una nueva translocación, no descrita previamente en la literatura médica (exón 19 *COL1A1*-exón 2 *PDGFB*). El gen de fusión COL1A1-PDGFB es específico del DFSP, por lo que su detección mediante técnicas de biología molecular puede tener un importante valor diagnóstico en los casos de diagnóstico diferencial difícil con otros sarcomas, y también puede constituir un indicador de tratamiento con inhibidores de la fami-

lia de las tirosincinasa, que pueden ser útiles en casos de DFSP localmente avanzados o metastásicos, o como tratamiento neoadyuvante previo a la cirugía, ofreciendo una nueva alternativa terapéutica farmacológica.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Brufau por remitirnos el caso.

Declaración de conflicto de intereses

Declaramos no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gloster HM Jr. Dermatofibrosarcoma protuberans. *J Am Acad Dermatol.* 1996;35:355-74; quiz 75-6.
2. Taylor HB, Helwig EB. Dermatofibrosarcoma protuberans. A study of 115 cases. *Cancer.* 1962;15:717-25.
3. Pedeutour F, Simon MP, Minoletti F, et al. Ring 22 chromosomes in dermatofibrosarcoma protuberans are low-level amplifiers of chromosome 17 and 22 sequences. *Cancer Res.* 1995;55:2400-3.
4. Terrier-Lacombe MJ, Guillou L, Maire G, et al. Dermatofibrosarcoma protuberans, giant cell fibroblastoma, and hybrid lesions in children: clinicopathologic comparative analysis of 28 cases with molecular data — a study from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *Am J Surg Pathol.* 2003;27:27-39.
5. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-9.
6. Bendix-Hansen K, Myhre-Jensen O, Kaae S. Dermatofibrosarcoma protuberans. A clinico-pathological study of nineteen cases and review of world literature. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1983;17:247-52.
7. Kamino H, Jacobson M. Dermatofibroma extending into the subcutaneous tissue. Differential diagnosis from dermatofibrosarcoma protuberans. *Am J Surg Pathol.* 1990;14:1156-64.
8. Mentzel T, Beham A, Katenkamp D, et al. Fibrosarcomatous («high-grade») dermatofibrosarcoma protuberans: clinicopathologic and immunohistochemical study of a series of 41 cases with emphasis on prognostic significance. *Am J Surg Pathol.* 1998;22:576-87.
9. Aiba S, Tabata N, Ishii H, et al. Dermatofibrosarcoma protuberans is a unique fibrohistiocytic tumour expressing CD34. *Br J Dermatol.* 1992;127:79-84.
10. Cohen PR, Rapin RP, Farhood AI. Dermatofibroma and dermatofibrosarcoma protuberans: differential expression of CD34 and factor XIIIa. *Am J Dermatopathol.* 1994;16:573-4.
11. Minoletti F, Miozzo M, Pedeutour F, et al. Involvement of chromosomes 17 and 22 in dermatofibrosarcoma protuberans. *Genes Chromosomes Cancer.* 1995;13:62-5.
12. Shimizu A, O'Brien KP, Sjoblom T, et al. The dermatofibrosarcoma protuberans-associated collagen type I α -phal/platelet-derived growth factor (PDGF) B-chain fusion gene generates a transforming protein that is processed to functional PDGF-BB. *Cancer Res.* 1999;59:3719-23.
13. McArthur GA, Demetri GD, Van Oosterom A, et al. Molecular and clinical analysis of locally advanced dermatofibrosarcoma protuberans treated with imatinib: Imatinib Target Exploration Consortium Study B2225. *J Clin Oncol.* 2005;23:866-73.
14. Greco A, Fusetti L, Villa R, et al. Transforming activity of the chimeric sequence formed by the fusion of collagen gene COL1A1 and the platelet derived growth factor b-chain gene in dermatofibrosarcoma protuberans. *Oncogene.* 1998;17:1313-9.
15. Simon MP, Navarro M, Roux D, et al. Structural and functional analysis of a chimeric protein COL1A1-PDGFB generated by the translocation t(17;22)(q22;q13.1) in dermatofibrosarcoma protuberans (DP). *Oncogene.* 2001;20:2965-75.
16. Rubin BP, Schuetze SM, Eary JF, et al. Molecular targeting of platelet-derived growth factor B by imatinib mesylate in a patient with metastatic dermatofibrosarcoma protuberans. *J Clin Oncol.* 2002;20:3586-91.
17. Maki RG, Awan RA, Dixon RH, et al. Differential sensitivity to imatinib of 2 patients with metastatic sarcoma arising from dermatofibrosarcoma protuberans. *Int J Cancer.* 2002;100:623-6.