

Patología molecular

Tumor de Ewing. Un ejemplo de la aplicación de la patología molecular al manejo de los tumores de hueso y de tejidos blandos

E. de Álava

Clínica Universitaria de Navarra, Universidad de Navarra, Pamplona.

INTRODUCCIÓN

Los tumores pediátricos son diferentes a los de los adultos en numerosos aspectos clínicos, biológicos e histopatológicos. En primer lugar, desde el punto de vista clínico, tienen preferencia por localizaciones distintas, como por ejemplo el sistema hemato-poyético, el sistema nervioso central y los tejidos blandos. Se trata fundamentalmente de sarcomas y de tumores hematológicos. Su incidencia es menor que en los adultos, aunque representan la segunda causa de muerte en la población pediátrica tras los accidentes. Se caracterizan por una capacidad proliferativa mucho más alta que en los adultos y, probablemente por ello, responden mucho mejor a una pauta de quimioterapia adecuada (1).

Desde el punto de vista biológico los tumores pediátricos tienen diferentes mecanismos oncogénicos respecto a los de los adultos. Algunas de las alteraciones moleculares son específicas de cada tipo tumoral y probablemente patogénicas, mientras que otras se asocian a la progresión tumoral (2). Se pueden observar traslocaciones, amplificaciones

génicas o inactivación de genes supresores tumorales. Sin embargo, no se ha descrito un esquema secuencial de alteraciones génicas como en la mayoría de los tumores epiteliales de los adultos (esquema de Vogelstein), en que hacen falta numerosas alteraciones génicas, asociadas a un grado creciente de displasia, durante un largo espacio de tiempo para llegar al fenotipo maligno. Probablemente muchos sarcomas pediátricos se producen gracias a unas pocas alteraciones moleculares en un corto espacio de tiempo —¡por eso son pediátricos!— y por eso los carcinomas son raros a esta edad.

Y desde el punto de vista histopatológico los tumores sólidos pediátricos, especialmente los llamados tumores de células pequeñas y redondas, siguen siendo un reto diagnóstico dada su indiferenciación (2). Este grupo incluye clásicamente al tumor de Ewing, al rhabdomyosarcoma, al linfoma y al neuroblastoma. Cada vez es más importante realizar un diagnóstico certero de estos tumores, puesto que existen diferentes pautas terapéuticas —cada día más eficaces— para cada tipo tumoral.

Durante los últimos cinco años se han comenzado a aplicar técnicas de patología molecular al diagnóstico de ciertos sarcomas. Algunas de las alteraciones moleculares diagnósticas pueden, además, ser útiles para determinar el pronóstico. Por sus características clínicas y moleculares el tumor de Ewing es un ejemplo de cómo el estudio de la biología de un tumor puede incidir en su tratamiento clínico. Por esta razón vamos a centrar esta revisión en esta entidad tumoral, que sirve de guía, como veremos, a muchos otros tumores sólidos pediátricos, a los que también haremos referencia.

El tumor de Ewing es en frecuencia el segundo tumor óseo/de partes blandas de la edad pediátrica (3). A pesar de los avances de la quimioterapia sistémica, la supervivencia a los cinco años es del 50%. El factor pronóstico más importante es la presencia o ausencia de diseminación tumoral en el momento del diagnóstico (3). Hoy día la familia del tumor de Ewing se considera un grupo heterogéneo de neoplasias con un grado variable de diferenciación neural, que incluye tumores óseos y extraesqueléticos. Históricamente el sarcoma de Ewing y el tumor neuroectodérmico periférico se habían considerado entidades separadas desde el punto de vista histogenético. Así, se describía el sarcoma de Ewing, más indiferenciado, afectando al tejido óseo, y el tumor neuroectodérmico periférico, con marcada diferenciación neural, en los tejidos blandos de las extremidades (4). El hallazgo que más ha contribuido a que se les considere actualmente variantes de una misma entidad se ha puesto de manifiesto en los últimos siete años. Se trata de la presencia de un marcador genético específico: fusiones génicas que incluyen el oncogén *EWS* y alguno de los genes de la familia de los factores de transcripción *ETS* (*FLII*, *ERG*, *ETVI*, etc.) (5). En el proceso de progresión tumoral a este hecho molecular fundamental se le pueden asociar otras alteraciones moleculares secundarias, inespecíficas, a las que nos referimos más adelante. Exploramos a continuación las aplicaciones de estos hallazgos moleculares al diagnóstico y pronóstico de este tipo tumoral, así como algunas posibilidades terapéuticas derivadas del estudio de estos marcadores genéticos.

LAS FUSIONES *EWS-ETS* SON LA ALTERACIÓN MOLECULAR PRIMARIA EN EL TUMOR DE EWING

Mediante técnicas de citogenética realizadas en los tumores de Ewing se detecta, por orden de frecuencia, una traslocación $t(11; 22)(q24; q12)$ o $t(21; 22)(q22; q12)$. La primera fusiona los genes *EWS* y *FLII*, y se detecta en el 81% de los casos de este grupo tumoral (5). La $t(21;22)(q22;q12)$ implica a los genes *EWS* y *ERG* (14%) (6). Existen algunos tipos de fusiones génicas menos frecuentes (4). Las fusiones génicas se detectan en un 96% de los casos de tumor de Ewing, y no están presentes en otros tumores de morfología similar, lo que los constituye en marcadores tumorales muy específicos. De hecho, la detección de dichas alteraciones es, como ya hemos dicho, lo que define la familia del tumor de Ewing (5), siendo ya una prueba útil para su diagnóstico y diagnóstico diferencial.

Estructura de la fusión génica

Tomamos como ejemplo la fusión *EWS-FLII*, la más frecuente y de la que se conocen mejor su estructura y función. *EWS* codifica una proteína de 68 kDa que tiene un dominio carboxiterminal con capacidad para unirse a RNA (7). La porción aminoterminal de *EWS* codifica un dominio que transactiva al dominio carboxiterminal. La función de *EWS* se desconoce. *FLII*, por el contrario, es un factor de transcripción (8). Es decir, se trata de una proteína con capacidad de unirse a regiones específicas de DNA que controlan la transcripción de ciertos genes. Esta propiedad le viene dada por la presencia de un dominio carboxiterminal con capacidad de unión a DNA (8). Este dominio se denomina *ETS*, y es el que da el nombre a toda la familia de factores de transcripción, entre los que se encuentran otros genes, como *ERG*, *ETVI*, *FEV* o *E1AF*, que se unen a *EWS* en el tumor de Ewing. La traslocación $t(11;22)$ tiene sus puntos de rotura exactamente dentro del gen *EWS* (cromosoma 22) y del gen *FLII* (cromosoma 11). El resultado de la traslocación es la fusión de la porción aminoterminal de *EWS* con la carboxiloterminale de *FLII* (Fig. 1). La estructura es análoga a la observada en otras fusiones, como en *EWS-ERG* (Fig. 1A).

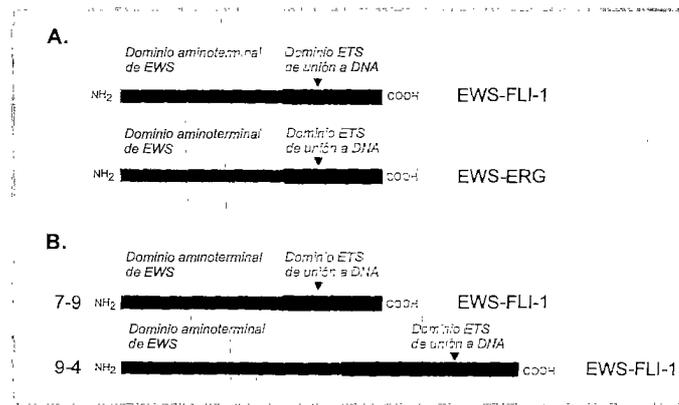


Figura 1. A) La proteína quimérica EWS-FLI1 o EWS-ERG comprende el dominio aminoterminal de EWS (gris), unido al carboxilotermino de FLI1 o ERG (negro). Éste contiene el dominio ETS de unión a DNA (punteado blanco en FLI1, líneas diagonales en ERG). Las cifras pequeñas representan los exones que participan de cada fusión. La variabilidad en las fusiones génicas en los tumores de Ewing depende en primer lugar de qué gen se une a EWS (FLI1 o ERG). B) Para cada tipo de fusión (aquí se representa EWS-FLI1) existen varias posibilidades dependiendo del número de exones de cada uno de los genes que participa de la fusión. La mitad superior muestra la fusión más corta (EWS ex.7-FLI1 ex.9); la más larga se representa en la mitad inferior (EWS ex.9-FLI1 ex.4).

Función de la fusión génica

Como resultado de la traslocación el dominio transactivador de *EWS* regula ahora el dominio de unión a DNA que tiene *FLI1*. Dicho de otro modo, la fusión génica ejerce su función como factor de transcripción a través del dominio carboxilotermino de *FLI1*, pero sometido ahora al control ectópico que lleva a cabo la otra mitad de la fusión génica. Como esta fusión de genes es un hallazgo tan específico y tan habitual en el tumor de Ewing, cabe pensar que tiene un papel importante en la patogenia de este tumor. De hecho, esta fusión génica, cuando se transfecta a ciertos cultivos celulares, es capaz de producir un fenotipo tumoral, algo que se ha descrito, por ejemplo, en cultivos de fibroblastos humanos NIH3T3 (8, 9). También se ha visto que cuando se introducen RNA *EWS-FLI1* antiparalelos (*antisense*) en las células tumorales, éstas dejan de proliferar y pierden su capacidad de metastatizar (10). Por tanto no se trata sólo de una alteración característica del tumor de Ewing, sino que además es patogenética.

No se conocen bien los genes diana cuya transcripción modula *EWS-FLI1* a través de su dominio de unión a DNA. Puede que no sean exactamente los mismos genes que habitualmente regula *FLI1* (10). Algunos de los que se han descubierto hasta el presente pueden ser significativos; entre otros se puede citar el gen de la estromelina, una metalo-

proteínasa de la matriz extracelular del tejido conjuntivo que probablemente esté relacionada con la propiedad de las células tumorales de invadir el tejido conjuntivo que las rodea y, por tanto, con la capacidad de metastatización (11). De manera indirecta se produce también una sobreexpresión de *c-myc*, un factor de transcripción directamente relacionado con la proliferación celular y la apoptosis. Aunque en buena parte desconocidos, los genes diana de *EWS-FLI1* deben estar relacionados con el control de la proliferación celular. Basta con que unos pocos genes "clave" se afecten para que el delicado equilibrio que regula la proliferación se pierda, o para que algunos genes relacionados con ciertos programas de diferenciación celular se activen. Otro aspecto importante es que la acción de *EWS-FLI1* como factor de transcripción depende del contexto celular en que esta fusión se presenta. *EWS-FLI1* es capaz de transformar fibroblastos, pero no otros tipos de células. Sin duda, hace falta un contexto celular específico (12), probablemente relacionado con células mesenquimales primitivas, en que los genes diana de la fusión génica se expresen. Esto explica que el tumor de Ewing surja habitualmente en tejido mesenquimal (hueso y tejidos blandos) y sea absolutamente excepcional en los tejidos epiteliales (por ejemplo riñón) (13).

Un último aspecto digno de estudio es el mecanismo por el que se produce la traslocación. Es de-

cir, por qué los puntos de rotura de las traslocaciones siempre se producen en los mismos intrones. ¿Se trata de un fenómeno al azar o existe alguna predisposición en ciertas áreas de dichos genes a recombinarse con mayor facilidad? Aunque se han descrito numerosas secuencias recombinogénicas en leucemias y linfomas y algunas en sarcomas, no se ha observado dicho tipo de secuencias en un extenso estudio realizado en tumores de Ewing (14), por lo que no conocemos de momento la respuesta a la pregunta que nos habíamos formulado.

Aunque las fusiones de *EWS* con genes de la familia *ETS* ocurren casi exclusivamente en el tumor de Ewing, existen fusiones génicas de *EWS* con otros factores de transcripción, como las que se encuentran en el sarcoma de células claras de partes blandas (melanoma de partes blandas) con el oncogén *ATF* (15), en el condrosarcoma mixoide extraesquelético con el gen *CHN* (16), y en el tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas con el gen *WT1* (17) (Tabla 1). De modo análogo a lo que

hemos descrito en el tumor de Ewing, las proteínas quiméricas tienen una estructura similar en este grupo de tumores (18), y actúan como activadores aberrantes de la transcripción de algunos genes clave para el desarrollo celular, adquiriendo así capacidad oncogénica.

EN EL TUMOR DE EWING SE PUEDEN DETECTAR ALTERACIONES MOLECULARES SECUNDARIAS

Acabamos de revisar cómo las fusiones *EWS-ETS* son la alteración molecular primaria en el tumor de Ewing. Sin embargo, cabe estudiar si a esta alteración se añaden otras, y si éstas contribuyen de algún modo a la progresión tumoral. Existen bastantes descripciones de alteraciones citogenéticas, incluyendo la trisomía 8 (44% de casos), la trisomía 12 (16%) y la traslocación t(1;16) (18%) (19). Desde el punto de vista molecular la inciden-

Tabla 1. Fusiones génicas en tumores mesenquimales. El gen *EWS* está implicado en numerosas fusiones génicas en sarcomas.

Tipo de tumor	Traslocación	Transcrito quimérico	Prevalencia (%)
Tumor de Ewing	t(11;22)(q24;q12)	<i>EWS-FLI1</i>	95
Tumor de Ewing	t(21;22)(q22;q12)	<i>EWS-ERG</i>	5
Tumor de Ewing	t(7;22)(p22;q12)	<i>EWS-ETV1</i>	<1
Tumor de Ewing	t(2;22)(q33;q12)	<i>EWS-E1AF</i>	<1
Tumor de Ewing	t(1;22)(q42;q12)	<i>EWS-?</i>	<1
Tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas	t(11;22)(p13;q12)	<i>EWS-WT1</i>	100
Liposarcoma mixoide	t(12;16)(q13;p11)	<i>TLS-CHOP</i>	95
Liposarcoma mixoide	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWS-CHOP</i>	5
Condrosarcoma mixoide extraesquelético	t(9;22)(q22;q12)	<i>EWS-CHN</i>	75
Sarcoma de células claras de tejidos blandos	t(12;22)(q13;q21)	<i>EWS-ATF1</i>	?
Sarcoma sinovial	t(X;18)(p11.23;q11)	<i>SYT-SSX1</i>	65
Sarcoma sinovial	t(X;18)(p11.21;q11)	<i>SYT-SSX2</i>	35
Rabdomiosarcoma alveolar	t(2;13)(q35;q14)	<i>PAX3-FKHR</i>	75
Rabdomiosarcoma alveolar	t(1;13)(p36;q14)	<i>PAX7-FKHR</i>	10
Dermatofibrosarcoma <i>protuberans</i>	t(17;22)(q22;q13)	<i>COL1A1-PDGFB</i>	
Fibrosarcoma congénito	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV6-NTRK3</i>	
Sarcoma alveolar de tejidos blandos	t(X;17)(p11;q25)		
Tumores mesenquimales benignos*	Alteraciones 12q13 Alteraciones 6p21	Alteraciones <i>HMGI-C</i> Alteraciones <i>HMGI-Y</i>	

*Lipomas, hamartomas, adenoma pleomórfico, fibroadenoma de mama, leiomioma uterino, pólipos endometriales, angiomiomas.

cia de alteraciones de los genes que regulan el ciclo celular es baja, al contrario de lo que ocurre en los carcinomas. Existe cierto número de tumores con deleciones homocigóticas de *p16INK4* (aproximadamente el 15%, aunque la frecuencia es mayor en las líneas celulares) (20); un 12% de tumores de Ewing muestran mutaciones de *p53* (21).

APLICACIONES DIAGNÓSTICAS

Tradicionalmente las traslocaciones se pueden detectar mediante cariotipos. Éstos son, sin embargo, laboriosos, requieren grandes cantidades de tejido y ofrecen resultados en aproximadamente la mitad de los casos. El clonado de los genes quiméricos ha permitido conocer su secuencia, y se han podido diseñar técnicas moleculares apropiadas para detectarlos en muestras clínicas. Las fusiones génicas y sus transcritos quiméricos pueden ser fácilmente detectados mediante PCR con transcripción inversa. En esta técnica se parte del RNA tumoral, sobre el que en un primer paso se realiza una transcripción inversa al DNA complementario. Éste se amplifica mediante PCR, en que se emplean *primers* específicos para los exones que flanquean los puntos de rotura. Se puede realizar con posterioridad una segunda PCR con una segunda pareja de *primers* ligeramente más cercanos al punto de rotura (PCR anidada o *nested*) (Fig. 2). Este segundo paso aumenta tanto la sensibilidad de la técnica como las posibilidades de contaminación. Los pro-

ductos de la RT-PCR se someten entonces a electroforesis. El DNA contenido en el gel de electroforesis puede transferirse a una membrana de *nylon*. Dicha membrana puede entonces incubarse con un DNA complementario (sonda) al DNA que se esperaba encontrar (*Southern-blot*). Al marcar la sonda, ésta nos permite conocer qué bandas de las obtenidas en la RT-PCR contenían la secuencia que buscábamos. Esta técnica permite no sólo un aumento adicional de la sensibilidad sino también una gran especificidad. Asimismo se ha puesto a disposición del laboratorio diagnóstico la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), en que se utilizan grandes sondas marcadas con fluorescencia que se hibridan con núcleos en metafase o interfase.

La realización de estas técnicas exige ácidos nucleicos de gran calidad, lo que implica que al menos una parte de toda la resección tumoral debe congelarse inmediatamente y conservarse en un banco de tumores.

La detección de determinadas alteraciones génicas es útil para la clasificación y el diagnóstico de diversos sarcomas pediátricos, de los que citamos a continuación varios ejemplos:

Definir una familia de tumores: tumor de Ewing

Como ya hemos comentado previamente, las fusiones *EWS-ETS* se pueden detectar en el tumor de Ewing óseo o de partes blandas, el tumor neuroec-

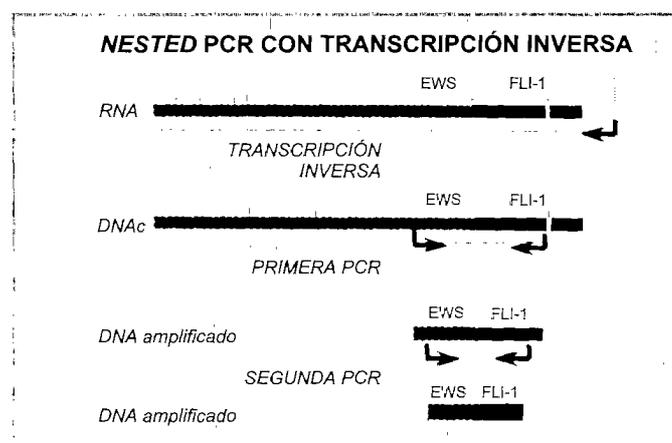


Figura 2. RT-PCR anidada (*nested*). Una vez realizada una RT-PCR se lleva a cabo una segunda PCR con nuevos cebadores, internos a los anteriores. Esto aumenta significativamente la sensibilidad de la prueba.

todérmico primitivo óseo o de partes blandas, el tumor de Askin y el esteseuroblastoma (5), y esto ha permitido determinar que todos ellos son miembros de una misma entidad tumoral. En la práctica diaria muchos casos se diagnostican con las técnicas histológicas rutinarias, que son la base del diagnóstico y en cuyo contexto deben interpretarse las demás técnicas. Además, el patólogo cuenta con un marcador inmunohistoquímico, el CD99/MIC2, que tiene una elevada especificidad y sensibilidad siempre que se emplee en el contexto morfológico adecuado (2).

Ayudar a diferenciar dos tipos de rhabdomiomas

En concreto, en el rhabdomioma alveolar la traslocación t(2;13) produce una fusión entre los genes *PAX3* y *FKHR*, que se puede detectar en el 76% de los casos, y la t(1;13) origina un gen quimérico *PAX7-FKHR* (10%). Los transcritos quiméricos se detectan tanto en los tumores de patrón claramente alveolar (22) como en la variante de patrón sólido, más indiferenciada (23). En el rhabdomioma embrionario (incluyendo el botrioides y el fusocelular), en cambio, se observa una deleción en un segmento de la región 11p15 que corresponde a un gen supresor tumoral aún no identificado, y no se observan transcritos quiméricos. Esto permite diferenciar mejor el rhabdomioma embrionario del alveolar, sobre todo cuando este último tiene un patrón sólido que fácilmente se puede confundir con un rhabdomioma embrionario. Esto tiene valor práctico porque este último es un tumor cuyo pronóstico es mucho más favorable que el del rhabdomioma alveolar.

Caracterizar un tipo tumoral

El tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas es un sarcoma indiferenciado de muy alta agresividad que se origina fundamentalmente en las serosas (peritoneo, pleura) y meninges. Aunque tiene una morfología y un inmunofenotipo característicos, muestra cierta variabilidad en su presentación (17). Un hecho característico de este tumor

es que se asocia a una traslocación t(11;22)(p13;q12), que origina una fusión entre dos protooncogenes ya previamente asociados a otros tumores: el *EWS* (sarcoma de Ewing) y el *WT1* (tumor de Wilms) (17). Esta alteración es detectable en el 96% de los casos estudiados y es exclusiva de este tumor, por lo que es de interés diagnóstico.

Diagnóstico diferencial entre distintos tumores pediátricos

Se deriva de todo lo que hemos dicho antes. Dado que varios tumores sólidos pediátricos tienen marcadores moleculares diagnósticos, se puede emplear una batería de *primers* y sondas moleculares para el diagnóstico diferencial entre ellos (24, 25).

Cada vez se encuentran más casos en que los resultados de los estudios moleculares y el aspecto morfológico son discrepantes. Uno puede hallar un resultado molecular inesperado, tanto positivo como negativo. Aunque en general hay una excelente correlación entre diversos tipos tumorales y sus correspondientes alteraciones moleculares, conviene emplear en cada caso una buena dosis de sentido común. La mayoría de las veces probablemente reflejan nuestras limitaciones como morfólogos o como patólogos moleculares.

APLICACIONES PRONÓSTICAS

A pesar de los avances de la quimioterapia sistémica la supervivencia a cinco años del tumor de Ewing es del 50%. El factor pronóstico más importante es la presencia o ausencia de diseminación tumoral en el momento del diagnóstico (3). Otro parámetro de importancia es la respuesta tumoral al tratamiento quimioterápico, que se estudia midiendo el grado de necrosis tumoral (26). Se hace necesario, sin embargo, explorar otros tipos de factores pronóstico, especialmente aquellos que en el momento del diagnóstico van a predecir la respuesta a la quimioterapia y el pronóstico a largo plazo. Revisamos a continuación el valor pronóstico de los hallazgos moleculares en el tumor de Ewing, tanto primarios como secundarios.

Valor pronóstico de las alteraciones moleculares primarias

Existe cierta variabilidad molecular en la familia de los tumores de Ewing, que tiene valor pronóstico. Existen al menos 18 posibilidades estructurales diferentes de fusiones génicas. Hay dos fuentes de variabilidad. En primer lugar, como ya hemos visto, *EWS* puede estar unido o bien a *FLII* o bien a *ERG* (por citar las dos situaciones más probables) (Fig. 1A). Por otro lado, para cada una de estas fusiones (por ejemplo *EWS-FLII*) existen diversas posibilidades según el número de exones de cada gen incluidos en la fusión génica (Fig. 1B). En cada paciente el tipo de fusión se mantiene constante a lo largo de la progresión tumoral. La fusión *EWS-FLII* más frecuente se denomina tipo 1, y es la que muestra el exón 7 de *EWS* unido al exón 6 de *FLII*. En nuestra serie, en la que contamos con 120 tumores primarios con transcritos *EWS-FLII*, hemos visto que los tumores con transcritos *EWS-FLII* tipo 1 se asocian de manera significativa a un mejor pronóstico que los que tienen cualquier otra fusión (Fig. 3) (27). Esto ocurre de manera independiente al estadio clínico en el momento del diagnóstico, la edad o la localización del tumor primario, que son parámetros pronósticos ya establecidos (27). Nuestros resultados confirman los de otro estudio previo (28), en el cual no se había realizado un estudio

estadístico multivariado. La determinación del tipo de transcrito puede emplearse en el momento del diagnóstico para determinar qué pacientes con relativo buen pronóstico (tumores pequeños con enfermedad localizada) se beneficiarán de una terapia más intensiva. No está clara la base molecular por la que los pacientes con transcritos *EWS-FLII* de tipo 1 tienen mejor pronóstico, aunque un estudio reciente realizado por nuestro grupo ha observado que dicho tipo de fusión génica muestra una menor capacidad para activar genes diana que los demás tipos de fusiones (29). Curiosamente no existen diferencias clínicas significativas entre los pacientes con fusiones *EWS-FLII* y *EWS-ERG* (30).

La correlación entre los diferentes tipos de fusiones génicas y las características clínicas también se observa en algunos otros sarcomas con traslocaciones, como en el rhabdomyosarcoma alveolar o el sarcoma sinovial. El rhabdomyosarcoma alveolar muestra en un 80% a 90% fusiones *PAX3-FKHR* y en un 10% a 20% fusiones *PAX7-FKHR* (22, 24). Los tumores que tienen esta última fusión génica aparecen en pacientes mucho más jóvenes, en las extremidades, no suelen tener metástasis y, de hecho, tienen un mejor pronóstico que los pacientes con *PAX3-FKHR* (31). También existe una correlación entre el subtipo histológico de sarcoma sinovial y el tipo de transcrito. Los pacientes con

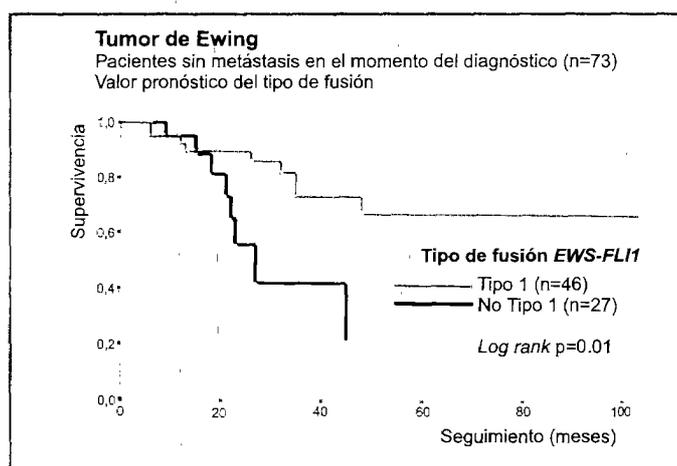


Figura 3. Curva de supervivencia de los pacientes con sarcoma de Ewing (n=73) con enfermedad localizada en el momento del diagnóstico, de los cuales disponemos de información clínica, anatomopatológica y molecular. El pronóstico de los pacientes con transcrito *EWS-FLI1* de tipo 1 (línea fina) es significativamente mejor que el de los que tienen otros tipos de transcritos *EWS-FLI1* (línea gruesa) (log-rank, p=0.01).

sarcoma sinovial de tipo bifásico tienen fusiones SYT-SSX1, mientras que todos los SYT-SSX2 son monofásicos (32).

Valor pronóstico de las alteraciones moleculares secundarias

Existen escasos estudios en que se haya realizado una correlación entre las alteraciones citogenéticas o moleculares y el pronóstico de los pacientes con tumor de Ewing. Un estudio reciente ha encontrado que la delección de 1p36, una alteración asociada a mal pronóstico en algunos neuroblastomas, también tiene mal pronóstico en pacientes con tumor de Ewing (19). Nosotros hemos encontrado que los pacientes con delecciones homocigóticas de *p16INK4* o *p53* tienen un peor pronóstico, independientemente de otros factores pronóstico de tumor de Ewing, como el estadio, el volumen o el tipo de fusión génica (observaciones no publicadas).

Detección de enfermedad mínima residual

Hasta ahora la detección de enfermedad diseminada en el tumor de Ewing se basa en el diagnóstico radiológico o citológico de la diseminación a la médula ósea o el pulmón. Sin embargo, esto significa que las células tumorales diseminadas sólo pueden detectarse cuando ya han producido metástasis clínicas, siendo la radiología y la citología métodos diagnósticos de escasa sensibilidad. Hasta ahora carecemos de un marcador sensible de enfermedad mínima residual o enfermedad diseminada en el tumor de Ewing.

Mediante técnicas de dilución progresiva de las muestras de tumores de Ewing se ha puesto de manifiesto que la RT-PCR es capaz de detectar una célula tumoral entre un millón de células normales, siendo por tanto una técnica muy sensible (33). Hipotéticamente la detección de las fusiones de genes características de estos sarcomas en sangre periférica, médula ósea y muestras de autotrasplante después de terapia mieloablativa puede establecer con una gran sensibilidad la presencia de enfermedad diseminada o enfermedad mínima residual. La pre-

sencia de células tumorales en cualquiera de estos tipos de muestras sería entonces un probable factor predictivo de recidiva tumoral.

Siguiendo este principio se han diseñado protocolos para la detección de enfermedad mínima residual en pacientes tratados por tumor de Ewing. Existen tres estudios (33-35), publicados entre 1995 y 1997, que demuestran la presencia de transcritos quiméricos en sangre periférica y médula ósea. Recientemente se han publicado dos estudios europeos (36, 37) en que se intenta estudiar la relación entre la detección de transcritos quiméricos en una muestra de médula ósea en el momento del diagnóstico y el pronóstico de los pacientes. Aunque estos grupos emplean una metodología similar llegan a conclusiones opuestas, pues en uno de ellos la presencia de transcritos en el momento del diagnóstico no afecta al pronóstico (36), mientras que en el otro estudio (37) es un factor asociado a recidivas tempranas.

Hemos llevado a cabo un estudio con pacientes de nuestro centro (38), aunque el enfoque ha sido diferente a los anteriores en tres aspectos:

- Hemos estudiado varias muestras de cada paciente, tomadas a intervalos regulares.
- Hemos realizado la detección de transcritos quiméricos en muestras de sangre periférica, lo que, aparte de ser más cómodo para el paciente, evita los falsos negativos que se deben a que en el tumor de Ewing la enfermedad en la médula ósea es multifocal. A estas muestras se ha realizado *nested* RT-PCR con *Southern-blot*.
- Hemos valorado el tipo de fusión que se encontró en las muestras.

Nuestros datos preliminares (38) corresponden a 131 muestras de sangre periférica de 28 pacientes. En 83 de ellas hubo transcritos. Siempre mostraron el mismo tipo de fusión que los tumores primarios. El seguimiento medio de la serie fue de 38 meses, y la mediana 29 meses.

Las muestras se negativizaron con el tratamiento en cinco pacientes (Fig. 4). Fueron siempre positivas en los pacientes en progresión, y en cuatro pacientes fueron positivas antes de que clínicamente entraran en progresión (entre 2 y 36 meses) (Figs. 5

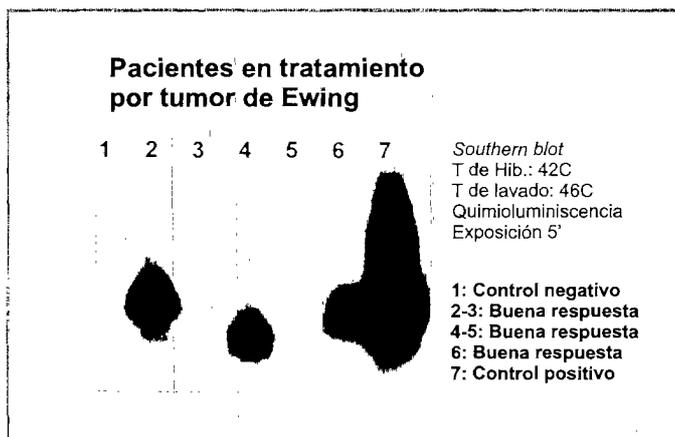


Figura 4. Southern-blot correspondiente a cinco muestras consecutivas de tres pacientes que están siendo tratados por sarcoma de Ewing y que muestran una buena respuesta. Mientras que en los pacientes representados en las calles 2-3 y 4-5 se aprecia la desaparición de la señal en la segunda muestra con respecto a la primera, en el paciente de la calle 6 la señal no ha desaparecido con el tratamiento.

y 6). Todos los pacientes que tuvieron transcritos diferentes a *EWS-FLII* de tipo 1 tuvieron progresión de la enfermedad; de hecho, en ninguno de ellos las muestras de sangre periférica se hicieron negativas. Esto es coherente con los datos referidos previamente, según los cuales los pacientes cuyos tumores presentan transcritos *EWS-FLII* de tipo 1 tienen mejor pronóstico. En conclusión, la detección de transcritos quiméricos en sangre periférica de pacientes con sarcoma de Ewing es útil para monitorizar el tratamiento y potencialmente útil para predecir la progresión de la enfermedad.

Posibilidades futuras

Los estudios realizados hasta ahora mediante RT-PCR son cualitativos, es decir, para cada muestra su resultado es positivo o negativo. Hay algunos estudios en leucemias en que se ha cuantificado la enfermedad mínima residual mediante métodos moleculares (39). Sin embargo, no existen estudios cuantitativos en sarcomas. Hay varias razones por las cuales, a la vista de los resultados preliminares, sería de gran interés cuantificar la presencia de transcritos quiméricos:

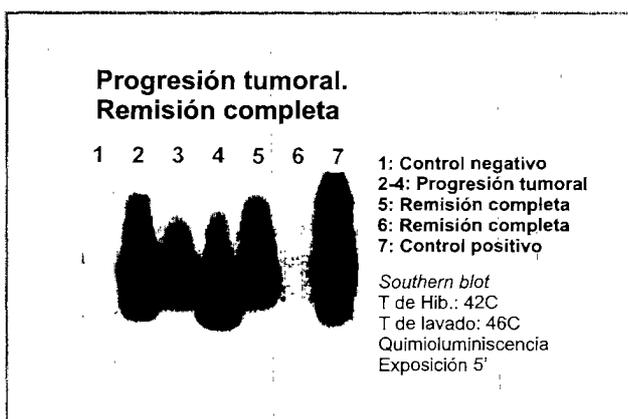


Figura 5. Southern-blot que corresponde a cinco muestras de tres pacientes que han acabado el tratamiento quimioterápico. Tanto el paciente con progresión tumoral (calles 2-4) como uno de los pacientes en remisión completa (calle 5) muestran transcritos quiméricos. Este último paciente tuvo una recidiva tumoral pocos meses después (paciente número 4 en la Fig. 4).

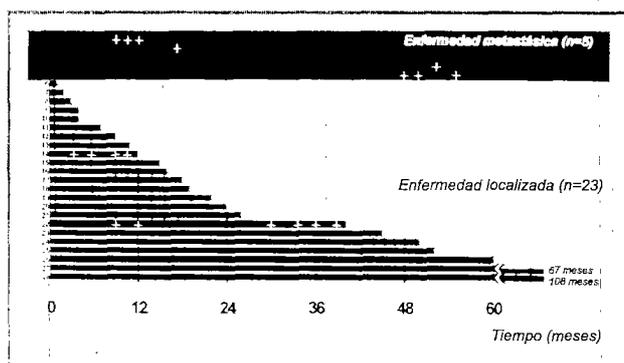


Figura 6. Resultados moleculares en relación con el estadio y la evolución clínica. El seguimiento de los pacientes está representado en forma de un histograma donde el eje horizontal es el tiempo. Los primeros 12 meses se refieren al tratamiento. Las barras del histograma en negro indican progresión de la enfermedad, mientras que las de gris indican remisión completa. Los pacientes 2, 5 y 22 mostraron transcritos quiméricos diferentes a *EWS-FLII*.

- Probablemente exista una correlación entre el volumen tumoral inicial, el estadio tumoral (localizado/metastásico) y el número de copias de transcrito en sangre periférica al inicio del tratamiento.
- Casi todos los pacientes mostraron células tumorales circulantes pocas semanas tras la resección del tumor, independientemente del grado de necrosis tumoral, aunque después en muchos pacientes las muestras se hicieron negativas. Sería interesante saber si una menor necrosis tumoral se asocia a un mayor número de copias de transcrito en sangre periférica y viceversa.
- Existen muchos pacientes en remisión completa pero con muestras positivas, que convendría cuantificar para ver si contienen un número constante de copias a lo largo del tiempo.
- De entre los pacientes que están en remisión y tienen muestras positivas, algunos desarrollan después progresión clínica. Sería interesante ver si, como ocurre en las leucemias, las muestras tienen un número progresivamente creciente de copias de transcritos, y si ese fenómeno precede a la progresión clínica del tumor.
- Es posible que exista una correlación entre el número de transcritos presentes, el tipo de transcrito y la presencia de alteraciones moleculares secundarias en genes que controlan el ciclo celular.

POSIBILIDADES TERAPÉUTICAS

La detección de alteraciones génicas en tumores pediátricos nos ayuda eficazmente a realizar diagnósticos más precisos, mejores pronósticos, y por tanto a seleccionar el tipo de terapia más adecuado a la situación del paciente. Además existen, potencialmente, algunas aplicaciones terapéuticas:

- Terapia génica con transcritos quiméricos antiparalelos (*antisense*). Se ha visto que al transfectar células en cultivo con el oncogén quimérico *EWS-FLII* éstas adquieren un fenotipo maligno, similar al del sarcoma de Ewing (9). De manera contraria, al introducir un RNA complementario a *EWS-FLII* (*antisense*) en cultivos celulares de sarcoma de Ewing, las células pierden el fenotipo maligno (10). No existen modelos clínicos en que se aplique este hallazgo.

- Inmunoterapia. Las proteínas quiméricas son antígenos nuevos y específicos, por lo que se crean nuevos epitopos en la zona que rodea el punto de fusión de los dos genes. Existen estudios experimentales en que los pacientes son inmunizados específicamente con anticuerpos dirigidos frente a los nuevos epitopos (40).

CONCLUSIÓN

Esta revisión ha intentado mostrar que el hallazgo de alteraciones moleculares tiene impacto en la clasificación, el diagnóstico y el pronóstico del tumor de Ewing y, potencialmente, en su tratamiento. Esto debería servir de estímulo para el trabajo multidisciplinario en el campo de los tumores musculoesqueléticos, empezando por la adecuada preservación del tejido resecado en el quirófano, para permitir su estudio molecular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ross JA, Severson RK, Pollock BH, Robison LL. *Childhood cancer in the United States. A geographical analysis of cases from the Pediatric Cooperative Clinical Trials groups.* Cancer 1996; 77: 201-207.
2. Triche TJ. *Pathology of pediatric malignancies.* En: Pizzo PA, Poplack DG (Eds.). *Pediatric Oncology*, 3ª ed. Lippincott-Raven, Philadelphia 1997: 141-186.
3. Terrier P, Llombart-Bosch A, Contesso G. *Small round blue cell tumors in bone: Prognostic factors correlated to Ewing's sarcoma and neuroectodermal tumors.* Semin Diagn Pathol 1996; 13: 250-257.
4. Kovar H. *Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors after their genetic union.* Curr Opin Oncol 1998; 10: 334-342.
5. Delattre O, Zucman J, Melot T y cols. *The Ewing family of tumors - a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts.* N Engl J Med 1994; 331: 294-299.
6. Sorensen PHB, Lessnick SL, López-Terrada D, Liu XF, Triche TJ, Denny CT. *A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG.* Nature Genet 1994; 6: 146-151.
7. Burd CG, Dreyfuss G. *Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins.* Science 1994; 265: 615-621.
8. May WA, Gishizky ML, Lessnick SL y cols. *Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLII for transformation.* Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 5752-5756.

9. May WA, Lessnick SL, Braun BS y cols. *The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1*. Mol Cell Biol 1993; 13: 7393-7398.
10. Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y. *EWS-Flil antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells*. J Clin Invest 1997; 99: 239-247.
11. Kaya M, Yoshida K, Higashino F y cols. *A single ETS-related transcription factor, EIAF, confers invasive phenotype on human cancer cells*. Oncogene 1996; 12: 221-227.
12. Barr F. *Translocations, cancer and the puzzle of specificity*. Nat Genet 1998; 19: 121-124.
13. Quezado M, Benjamin DR, Tsokos M. *EWS/FLI-1 fusion transcripts in three peripheral primitive neuroectodermal tumors of the kidney*. Hum Pathol 1997; 28: 767-771.
14. Zucman-Rossi J, Legoix P, Víctor JM, López B, Thomas G. *Chromosome translocation based on illegitimate recombination in human tumors*. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 11.786-11.791.
15. Zucman J, Delattre O, Desmaze C y cols. *EWS and ATF-1 gene fusion induced by t(12;22) translocation in malignant melanoma of soft parts*. Nat Genet 1993; 4: 341-345.
16. Clark J, Benjamin H, Gill S y cols. *Fusion of the EWS gene to CHN, a member of the steroid/thyroid receptor gene superfamily, in a human myxoid chondrosarcoma*. Oncogene 1996; 12: 229-235.
17. Gerald WL, Ladanyi M, de Álava E, Cuatrecasas M, Kushner BH, LaQuaglia MP, Rosai J. *Clinical, pathologic, and molecular spectrum of tumors associated with t(11;22)(p13;q12): Desmoplastic small round-cell tumor and its variants*. J Clin Oncol 1998; 16: 3028-3036.
18. Ladanyi M. *The emerging molecular genetics of sarcoma translocations*. Diagn Mol Pathol 1995; 4: 162-173.
19. Hattinger CM, Rumpel S, Strehl S y cols. *Prognostic impact of deletions at 1p36 and numerical aberrations in Ewing tumors*. Gen Chrom Canc 1999; 24: 243-254.
20. Kovar H, Jug G, Aryee DN y cols. *Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors*. Oncogene 1997; 15: 2225-2232.
21. Hamelin R, Zucman J, Melot T, Delattre O, Thomas G. *p53 mutations in human tumors with chimeric EWS/FLI-1 genes*. Int J Cancer 1994; 57: 336-340.
22. Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ y cols. *Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma*. Nat Genet 1993; 5: 230-235.
23. Parham DM, Shapiro DN, Downing JR, Webber BL, Douglass EC. *Solid alveolar rhabdomyosarcomas with the t(2;13). Report of two cases with diagnostic implications*. Am J Surg Pathol 1994; 18: 474-478.
24. Barr FG, Chatten J, D'Cruz CM y cols. *Molecular assays for chromosomal translocations in the diagnosis of pediatric soft tissue sarcomas*. JAMA 1995; 273: 553-557.
25. De Álava E, Ladanyi M, Rosai J, Gerald WL. *Detection of chimeric transcripts in desmoplastic small round cell tumor and related developmental tumors by reverse transcriptase polymerase chain reaction. A specific diagnostic assay*. Am J Pathol 1995; 147: 1584-1591.
26. Wunder JS, Paulian G, Huvos AG, Heller G, Meyers PA, Healey JH. *The histological response to chemotherapy as a predictor of the oncological outcome of operative treatment of Ewing sarcoma*. J Bone Joint Surg Am 1998; 80: 1020-1033.
27. De Álava E, Kawai A, Healey JH y cols. *EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma*. J Clin Oncol 1998; 16: 1248-1255.
28. Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O y cols. *Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients?* J Clin Oncol 1996; 14: 1245-1251.
29. Lin PP, Brody RI, Hamelin A, Bradner JE, Healey JH, Ladanyi M. *Differential transactivation by alternative EWS-FLI1 fusion proteins correlates with clinical heterogeneity in Ewing's sarcoma*. Cancer Res 1999; 59: 1428-1432.
30. Ginsberg JP, de Álava E, Ladanyi M y cols. *EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma*. J Clin Oncol 1999; 17: 1809-1814.
31. Kelly KM, Womer RB, Sorensen PH, Xiong QB, Barr FG. *Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma*. J Clin Oncol 1997; 15: 1831-1836.
32. Kawai A, Woodruff J, Healey JH, Brennan MF, Antonescu CR, Ladanyi M. *SYT-SSX gene fusion as a determinant of morphology and prognosis in synovial sarcoma*. N Engl J Med 1998; 338: 153-160.
33. Pfeleiderer C, Zoubek A, Gruber B y cols. *Detection of tumour cells in peripheral blood and bone marrow from Ewing tumour patients by RT-PCR*. Int J Cancer 1995; 21; 64: 135-139.
34. Peter M, Magdelenat H, Michon J y cols. *Sensitive detection of occult Ewing's cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. Br J Cancer 1995; 72: 96-100.
35. West DC, Grier HE, Swallow MM, Demetri GD, Granowetter L, Sklar J. *Detection of circulating tumor cells in patients with Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor*. J Clin Oncol 1997; 15: 583-588.
36. Zoubek A, Ladenstein R, Windhager R. *Predictive potential of testing for bone marrow involvement in Ewing tumor patients by RT-PCR: A preliminary evaluation*. Int J Cancer 1998; 79: 56-60.
37. Fagnou C, Michon J, Peter M y cols. *Presence of tumor cells in bone marrow but not in blood is associated with adverse prognosis in patients with Ewing's tumor. Société Française d'Oncologie Pédiatrique*. J Clin Oncol 1998; 16: 1707-1711.
38. De Álava E, Lozano MD, Patino A, Sierrasesumaga L, Pardo-Mindán FJ. *Ewing family tumors: Potential prognostic value of reverse-transcriptase polymerase chain reaction detection of minimal residual disease in peripheral blood samples*. Diagn Mol Pathol 1998; 7: 152-157.
39. Roberts WM, Estrov Z, Ouspenskaia MV, Johnston DA, McClain KL, Zipf TF. *Measurement of residual leukemia during remission in childhood acute lymphoblastic leukemia*. N Engl J Med 1997; 336: 317-323.
40. Goletz TJ, Mackall CL, Berzofsky JA y cols. *Molecular alterations in pediatric sarcomas: Potential targets for immunotherapy*. Sarcoma 1998; 2: 77-87.

