

**DISCURSO DE INGRESO DEL EXCMO. PROF. DR. D ANTONIO LLOMBART BOSCH COMO ACADEMICO CORRESPONDIENTE DE LA REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE BUENOS AIRES (ARGENTINA).**

**De la patología estructural a la patología molecular: un modelo en el sarcoma de Ewing.**

*Antonio Llombart Bosch\**

Presidente de la R. Acad. Med. Comunitat Valenciana

ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA DE BUENOS AIRES  
6 DE OCTUBRE DE 2011

Deseo que mis primeras palabras sean para agradecer al Consejo de Dirección y al presidente de esta histórica Academia Nacional de Medicina el *académico Juan M. Ghirlanda a su presidente en funciones académico José Navia así como a su secretario Roberto N. Pradier* por mi designación como Académico Correspondiente extranjero. Honor reservado a pocos privilegiados del mundo de la ciencia médica entre los cuales, opinan Uds. con extrema generosidad, se encontraría mi persona. Son para mí unos momentos históricos y excepcionales que engrandecen mi currículum científico en mi ya largo acontecer dentro de la medicina. Estas gracias deseo hacerlas extensivas a todos los académicos de número de esta Academia Nacional que dieron soporte a la propuesta del Dr. Rómulo Cabrini y a la decisiva ayuda ofrecida por mi entrañable colega y fraternal amigo Dr. Eduardo Santini Araujo destacada figura de la patología en Argentina en América latina y prestigioso miembro de la Academia Internacional de Patología.

Es un placer para mí traerles a Uds. el saludo afectuoso y cordial de la Real Academia de Medicina y Ciencias afines de la Comunidad Valenciana que tengo el honor de presidir como parte del Instituto de España, institución que acoge a todas las reales academias de España que gozan del patrocinio de la Corona y de su Majestad el rey de España Don Juan Carlos I.

También es un momento oportuno para recordar los objetivos de las Academias de Medicina en el contexto de las instituciones científicas oficiales de nuestros dos países Argentina y España, ya que presentan una gran similitud de intenciones y funciones entre las que destaca no solo la independencia frente a los poderes políticos, así como también su independencia judicial, gracias a la cual nos convertimos en punto de referencia para la defensa de los intereses profesionales y de la misma sociedad, con una rigurosa ética y dignidad de la profesión. Nuestras academias se preocupan por el estudio de la conducta humana en el

campo de las ciencias de la vida y del cuidado de la salud con el fin de contribuir a humanizar la relación médico – enfermo, basada en los derechos que tiene el paciente y el respeto a la persona desde la concepción hasta su muerte.

Merece la pena dedicar unos breves momentos a recordar como nacieron estas academias através del tiempo para obtener la perspectiva de su situación presente. Paradójicamente según he tenido oportunidad de revisar esta Academia Nacional de Buenos Aires nacería en los años 1820 poco antes de la Academia de Valencia que fue creada por Real orden de Fernando VII en 1831 al mismo tiempo que otras Reales Academias que con carácter regional están distribuidas por toda la geografía española.

La palabra Academia procede del término “Akademos” conocido héroe ateniense quien junto a su templo en las proximidades del Partenón estableciera un lugar de encuentro y análisis filosófico y religioso de la ciencia. Sería el inicio en sus jardines de un punto de reuniones de la conocida “Academia Platónica” en donde se impartiría no solo doctrinas filosóficas sino también sobre otras ciencias como la astronomía, música y las matemáticas.

Es cierto que el antiguo concepto de Academia dista relativamente del que el Real diccionario de la lengua le atribuye en estos momentos como “Sociedad literaria, científica o artística establecida con el fin de perfeccionar la ciencia, el arte o la literatura, para el adelantamiento de los socios respectivos”. Esta definición aun conteniendo valores de la academia ateniense se ve mejor reflejada en la escuela de Alejandría fundada por Ptolomeo I (Tolomaida, Tebaida, 100a.C.- Cánope, 170a.C) quien estableciera en la celebre Biblioteca Alejandrina, fundada por el mismo, un Museum buscando reunir a los sabios de todas las ramas del saber.

No es momento para efectuar un análisis histórico de las Academias de las Ciencias, basta recordar como jalones de las mismas la Escuela Palatina fundando en Aquisgran por el Emperador Carlomagno en el siglo IX dedicada no solo a las letras sino también a la astronomía matemáticas y aritmética o la Academia Florentina resucitada en “Villa Careggi”, Florencia, bajo el patrocinio de Cosme de Médicis por Marsinio Ficini en 1490 donde se tradujeron al latín obras de Platón. La fama de esta Academia hizo que fuera visitada por humanistas de Oxford, París o Colonia y sus ideas se proyectaron en otras ciudades de Europa, logrando de esta forma que el "renacimiento clásico" se expandiera por toda Europa.

La influencia árabe condicionó en Hispania el desarrollo de la cultura al crearse en los reinos árabes de Córdoba y Granada asociaciones científico-literarias cuya expresión alcanzó máximo desarrollo con el Califato de Córdoba bajo los Omeyas. La cultura islámica andalusí está considerada como una de las épocas de oro del Islam. Aquí vivieron algunos de los más importantes pensadores, literatos, artistas y científicos de la historia del Islam. Las ciencias más prósperas fueron las matemáticas y la astronomía, muy por delante de sus contemporáneos cristianos.

Va a ser en Francia bajo el reinado de Luis XIII durante el gobierno del cardenal Richelieu cuando en 1635 se funda la Academia de Francia aunque no sería hasta 1716 en que Luis XIV y su ministro Colbert elegirían un pequeño grupo de sabios que se reunirían en la biblioteca real y comenzarían a organizar unos estatutos que serían reconocidos por el rey instalándose como l'Académie des Sciences en el Louvre.

Coincide este periodo con el desarrollo de otras Academias de Ciencias en Inglaterra, Alemania y Rusia. En Inglaterra la Royal Society of London fue creada para el estudio y mejor conocimiento de las ciencias naturales en 1660 por el rey Carlos II dándole el nombre de "Royal Society of London". Esta Academia era continuadora del llamado "Invisible College", En la actualidad es conocida como la Royal Academy of Sciences del Reino Unido.

En Alemania "la Leopoldina", se fundó en 1652 como primera academia de investigación de las ciencias naturales de Europa y tomó su nombre del Leopoldo I, nieto de Fernando el Católico, Leopoldo. Éste, emperador del Sacro Imperio Romano-Germano la instauró por decreto en 1687 con el nombre de "Sacri Romani Imperii Academia Caesareo-Leopoldina Naturae Curiosorum".

En España se fundaría por el rey Felipe II una Academia de Matemáticas en 1580 para refundirse siglos después como Academia de Ciencias Físicas si bien la Real Academia de la Lengua nacería por orden del rey Felipe V en 1714 a instancias del Marqués de Villena y posteriormente la Academia de Historia en 1738 mientras que la conocida Real Academia de Bellas Artes de San Fernando se crearía mediante cédula Real de Fernando VI en 1757.

La creación de la Real Academia de Medicina por orden real del Rey Fernando VII dada en 1831 estuvo precedida por la Academia Médica Matritense desde 1734, que había sido reconocida mediante Real Decreto de Felipe V. Esta misma Cédula Real sirvió para dar cuerpo legal a numerosos círculos médicos distribuidos por el territorio español que también tenían una larga tradición científica como la Sevillana, gaditana y cartagenera que también se reunían bajo el nombre de "tertulias medicas". El nacimiento de la Real Academia de Medicina de Valencia es de esta misma época y gracias a la misma Cédula Real, constituyéndose junto con otras 17 Reales Academias de Medicina repartidas por todo el territorio nacional.

La tradición histórica de nuestras academias nos hermanan lo mismo que la comunidad de objetivos e intereses que antes hemos señalado. Pero también compartimos la historia a través de los devenires que la ciencia y la política han servido para unir nuestras dos naciones. Es aquí donde vuelven a encontrarse la ciencia médica española y la argentina a través de personalidades científicas que por razones, hoy felizmente superadas condicionaron acoger a investigadores españoles emigrados como consecuencia de la trágica contienda civil que asoló España en el siglo pasado.

Por ello en este momento es un deber gustoso el rendir homenaje a la personalidad científica que estableció estos puentes de continuidad entre ambas naciones y prestigia la "Escuela histológica Española" en Buenos Aires. Me refiero al que fue también académico de esta Academia Nacional el insigne Dr. Pío del

Río Hortega, científico distinguido y avanzado de la neurohistología y neuropatología a la que contribuyo a desarrollar gracias a sus importantes descubrimientos.

## ANÁLISIS DE LA ESCUELA HISTOLÓGICA ESPAÑOLA Y DE LA FIGURA DE PIO DEL RIO HORTEGA Y SU ESCUELA EN ESPAÑA Y ARGENTINA

José María López Piñero, destacado investigador de la historia de las ciencias en España y de la medicina valenciana, recientemente fallecido, ha sido uno de los investigadores mas profundos y exhaustivos de la vida y aportaciones científicas de D. Pío a través de numerosas publicaciones y libros. También ha contribuido la Prof. María Luz Terrada Ferrandis, su esposa, documentalista e históloga de profesión a divulgar la vida y obra de este científico así como a dar a conocer la historia de la llamada Escuela histológica española a la cual voy a hacer referencia por ser miembro de la misma en lo que ha sido llamada la 5º generación.

¿Cuales pueden considerarse las anteriores generaciones que han fundamentado las ciencias micrográficas en mi país hasta el siglo XXI?

- La primera generación y sus antecedentes históricos cabria concretarlos en las figuras de Aureliano Maestre de San Juan (1828-1890) Luis Simarro y Eduardo García Sala (1845-1922). entre cuyos discípulos se encuentra Santiago Ramón y Cajal

-La segunda generación estaría formada por las grandes figuras de Nicolás Achucarro, (1880-1918) Santiago Ramón y Cajal (1892-1934) y sus discípulos mas inmediatos entre los que encuentra Pío del Río Hortega, (1882-1945).

-La tercera generación correspondería a los discípulos directos de estos tres maestros destacando Francisco Tello, Fernando de Castro, Ricardo Martínez Pérez, Antonio Llombart Rodríguez, Julián Sánchez Lucas, J. Manuel Ortiz Picón así como los histólogos españoles emigrados a América discípulos de Pío del Río Hortega y de Santiago Ramón y Cajal como Lorente de No, Isaac Costero, junto con grupo de histólogos y patólogos españoles de la posguerra entre los que debemos destacar a Luis Zamorano, Agustín Bullon, Cesar Aguirre Viani, Ángel Valle.

-La cuarta generación sigue presente en la actualidad corresponde a la histología y la patología en la segunda mitad del siglo XX en España mereciendo destacarse su plena incorporación a la patología europea e internacional En ella nos ubicamos nosotros y otros hepatólogos e histólogos de mi generación como Horacio Oliva, Félix Contreras Rubio, Alberto Anaya, Francisco Martínez Tello, Augusto Moragas

Redecilla, Juan Domingo Toledo Ugarte. Esta lista sin lugar a dudas que podría ser mucho mas extensa y exhaustiva. Pido excusas por la omisión del nombre de muchos distinguidos compañeros.

-Hoy se abren las puertas de las ciencias micrográficas en la España del siglo XXI conjugando lo que es la histología tradicional con la histopatología así como la ingeniería tisular, la biología molecular y la biología de sistemas para enfrentarse ante una nueva visión mas global y unitaria ante los nuevos retos de la enfermedad y de su control en una sociedad universal.

Quisiera en estos momentos centrar mi discurso en la figura de Pío del Río Hortega a modo de homenaje para quien también supo impulsar la histología en este país y como recuerdo del que fue maestro admirado del también mi maestro y padre.

## DE LA PATOLOGÍA ESTRUCTURAL A LA PATOLOGÍA MOLECULAR: UN MODELO EN EL SARCOMA DE EWING

La existencia de un grupo distintivo de neoplasias de células redondas de hueso y partes blandas altamente malignas fue reconocida desde el siglo pasado<sup>1-5</sup>. Este grupo de tumores de células redondas y pequeñas (*TCRP*) comprenden un conjunto heterogéneo de neoplasias pobremente diferenciadas formada por células pequeñas, redondas u ovals con alto índice nuclear-citoplasmático, núcleos redondos con cromatina dispersa o agrupada y núcleo lo poco evidente<sup>1-5</sup>.

En el año 1921, James Ewing Profesor de Patología de la Universidad de Cornell, USA, describió estas características histológicas en un tumor que denomino “*endotelioma difuso de hueso*” Charles Oberling en Paris en el año 1928 denomino la neoplasia como “*sarcomade Ewing*”, lo cual no estuvo relacionado con la célula de origen<sup>14</sup>células del mesenquimal multipotencial de la médula ósea que poseían la capacidad de generar estos tumores a través de una diferenciación endotelial. El tumor fue motivo de fuerte controversia en los años 1930-1940 por cuanto Willis (1940) defendió la posibilidad de que en realidad el *SE* no fuera sino la expresión local de la metástasis de un neuroblastoma oculto, basándose no solo en su heterogeneidad histológica sino también en su presencia multiorgánica así como en su extrema semejanza con los neuroblastoma indiferenciados de la infancia. Arthur Pourdy Stout en New York (1944), utilizando cultivos de tejidos, defendería la independencia biológica del *SE* y su diferencia frente a los neuroblastoma en contra del criterio de Willis.

En los años 50, Fritz Schajowicz publicó en Argentina una serie de trabajos relacionados con este tumor así como con los entonces denominados por J Stewart "Sarcomas reticulares de la médula ósea" (reticulosarcomas de hueso), señalando como atributo fundamental de los mismos su alto grado de indiferenciación (sarcoma de células redondas pequeñas) y la presencia de abundante glucógeno citoplásmico detectable mediante el carmín de Best o el ácido periódico de Schiff (PAS) y siendo sensible a la diastasa. En el año 1956, Masson describe la presencia de rosetas sin una luz central (pseudorosetas) en

los sarcomas de Ewing<sup>17</sup>. Masson destacó como las células neoplásicas de este tumor se ordenaban en cordones y mostraban zarcillos citoplasmáticos sugestivos de diferenciación neural, además demuestra la presencia de glucógeno citoplásmico.

En 1975 Angervall y Enzinger<sup>19</sup> recogerían una amplia serie de tumores localizados en partes blandas sin dependencia ósea, no solo presentes en adolescentes sino también en jóvenes y adultos, todos ellos tendrían un imagen semejante a la vista en el **SE** de hueso. Coincidiría esta época con las primeras descripciones de los **SE** realizadas por Llobart-Bosch y cols. 20-22 en las que se señalaba la gran heterogeneidad estructural tanto a nivel morfológico como ultra estructural. En 1979 Askin residente de patología trabajando con Juan Rosai comunicaron la existencia de un grupo de neoplasias indiferenciadas formadas por células redondas de localización toraco-pulmonar

Aplicando solamente cirugía y radioterapia no se logró mejorar la supervivencia de los pacientes lo que condujo a que en el año 1974 se introdujera una nueva terapia adyuvante con quimioterapia utilizando 4 drogas (adriamicina, ciclofosfamida, actinomicina y vincristina)<sup>24</sup>.

**La evolución histogenética en el concepto del sarcoma de Ewing puede resumirse de la siguiente forma:** I.-El sarcoma de Ewing es un endotelioma de hueso (1920-1921) II.-El sarcoma de Ewing es un sarcoma mesenquimal de hueso (1940) III.- El sarcoma de Ewing es un sarcoma primitivo de hueso y parte blandas (1970) IV.- El sarcoma de Ewing está relacionado con los tumores neuroepiteliales periféricos pero no con los neuroblastomas (1980) V.- El sarcoma de Ewing pertenece a la familia de tumor neuroectodérmico primitivos localizados en hueso, partes blandas y órganos viscerales (1990) VI.- El sarcoma de Ewing y los tumores neuroectodérmico primitivos (PNET) pertenecen a la familia de tumores del sarcoma de Ewing (**TFSE**) porque poseen un perfil inmunohistoquímico y citogenético específico y similar (2000)

Desde el punto de vista diagnóstico, la **evaluación histológica y citológica** fue desde un inicio la técnica más ampliamente empleada para diagnosticar los sarcomas de Ewing. La técnica de observación con hematoxilina y eosina (H&E) constituye la base fundamental en el diagnóstico de los sarcomas y el reconocimiento de patrones morfológicos y alteraciones celulares permitiendo realizar un acercamiento diagnóstico muy completo. Específicamente la evaluación morfológica en el sarcoma de Ewing ha permitido clasificar estos tumores en varios grupos histológicos que muestran características diferentes. Existen numerosas publicaciones que describen la evolución morfológica en el diagnóstico del **SE** y tradicionalmente estos tumores se han subdivididos en sarcoma de Ewing convencional, sarcoma de Ewing con diferenciación neuroectodérmica, sarcoma de Ewing atípico con células grandes y sarcoma de Ewing atípicos con cambios endoteliales<sup>2-4</sup>

La **microscopía electrónica** ha aportado contribuciones importantes en el estudio de estos sarcomas confirmando la mayoría de hallazgos histológicos y ayudando a comprender su histogénesis. A bajos aumentos el tumor demuestra estructura compacta y homogénea, con un conglomerado celular masivo sin

semejanza alguna con algún tejido normal 3, 4, 20-22, 32, 33. Las células se adosan estrechamente entre si dando una imagen en sabana difusa. Hay escaso estroma y solo destacan capilares con endotelios prominentes que pueden confundirse con células tumorales si bien siempre existe una membrana basal de separación, 21, 25

**La técnica de inmunohistoquímica (IHQ)** ofrece datos importantes que facilitan un diagnóstico más rápido de estos tumores. El estudio **IHQ** en los **TFSE** ha planteado varios anticuerpos para realizar un diagnóstico de este grupo de tumores y permitir el diagnóstico diferencial con otros específico para esta familia de tumores. Uno de los primeros anticuerpos estudiados en este tumor fue la vimentina donde más del 80% de los casos eran positivos para este anticuerpo, sin embargo existen algunos casos **PNET** que han sido negativos para este anticuerpo. Otros anticuerpos estudiados inicialmente fueron los que tiñen lámina basal como el laminina y el colágeno tipo IV así como el colágeno I y III y la fibronectina 34. Los marcadores de diferenciación neuroectodérmica pueden ser positivos en los **TFSE** especialmente en el **PNET** y los mas empleados han sido la enzima neuroespecífica (ENS), HNK-1, neurofilamentos y las proteínas S100 y PGP 9.5. Estos anticuerpos no necesariamente son expresados en todos los **PNET** y tanto las variedades convencionales como atípico también pueden expresar estos anticuerpos. La ENE fue uno de los primeros marcadores que se pensó serian muy útiles en el diagnóstico de los **TFSE** pero lamentablemente es un marcador muy inespecífico que puede marcar otros tumores de células redondas.. Otro marcador neuroectodérmico muy usado desde los inicios del empleo de la **IHQ** en el diagnóstico de los **TFSE** fue el Leu-7 (HNK-1), cuyo marcaje es bastante específico de diferenciación neuroectodérmica aunque tienen la limitación de que marca grupos celulares y no la totalidad del tumor. El PGP 9.5 tiñe la mayoría de los **TFSE** con una fuerte positividad citoplasmática. Los neurofilamentos (NF) son positivos generalmente en los **PNET** y la positividad esta muy en relación con el grado de diferenciación neural. Lo mismo sucede para la proteína S100 y la proteína gliofibrilar (GFAP) las cuales son positivas solamente en células aisladas en los tumores donde existe una marcada diferenciación neuroectodérmica. La presencia de diferenciación neuroendocrina también se ha estudiado en los **TFSE** mediante **IHQ** usando los anticuerpos cromogranina y sinaptofisina. La expresión de estos anticuerpos en estos tumores es variable y no es diagnóstica.

Los receptores Trk han sido identificados en los **TFSE** y los neuroblastomas. Esta familia de receptores esta frecuentemente activada en los **TFSE** y el receptor Trk A es frecuente en los **PNET** mientras el Trk B y C se expresan predominantemente en los Ewing convencionales sin diferenciación neuroectodérmica. El producto del gen MIC2 es una glicoproteína de membrana la cual fue inicialmente descrito por Levy y cols35 usando el anticuerpo monoclonal12E7. También se ha descrito otro anticuerpo monoclonal denominado p30/32que también reconoce esta glicoproteína que esta localizada en la superficie celular y esta involucrada en el proceso de adhesión celular. Los dos anticuerpos mayoritariamente usados en los **TFSE** son el HBA-71 (CD99) y el 12E7, el primero fue utilizado para las células del **TFSE** por Fellingner y cols36-38 y Hamiltony cols39mientras que 12E7 fue inicialmente usado como marcador de células T35 .Ambos anticuerpos tienen similitud en la capacidad de detección de la glicoproteína aunque el HBA-71 esta más ampliamente usado siendo positivo en más del 95% de los **TFSE**. La tinción es de membrana predominantemente y puede marcar también citoplasma. Sin embargo, la tinción con estos

anticuerpos no es específica de los *TFSE* pues pueden teñir muchos tumores diferentes a los *TFSE* como leucemia linfocítica aguda, linfomas pediátricos, osteosarcomas, rhabdomyosarcomas, sarcoma sinovial, tumores rhabdoides etc. Característicamente la tinción para CD99 en estos tumores generalmente es más débil y focal, aunque hay excepciones.

Posteriormente en el diagnóstico de los sarcomas de Ewing's aparecieron nuevos anticuerpos como el Fli-1. En resumen: si bien no disponemos de un anticuerpo con especificidad absoluta frente a este grupo de tumores, si existen una serie de anticuerpos con una buena sensibilidad y especificidad que pueden ayudar decisivamente en el diagnóstico diferencial frente a otras neoplasias que histológicamente presentan un cierto grado de semejanza y sin embargo pertenecen a otras categorías tumorales. El CD99 y el CD57 junto con los marcadores neurales ENS, S-100, NF y PGP 9.5 continúan ofreciendo suficiente soporte para este diagnóstico.

**Las nuevas técnicas de estudio citogenético y molecular** en los tumores sólidos se ha detectado que varios grupos de tumores sólidos y no sólidos como las leucemias muestran alteraciones citogenéticas y moleculares específicas que permiten caracterizar a distintos tipos de tumores. Particularmente el diagnóstico de los sarcomas se beneficia con el desarrollo de estas técnicas moleculares permitiendo clasificar muchos casos que mostraban solapamiento fenotípico y morfológico. A partir de ese momento, la detección de alteraciones genéticas específicas tipo translocaciones o mutaciones somáticas ha sido de gran ayuda para llegar a un diagnóstico definitivo<sup>1-4, 25, 26, 28, 54, 55, 61, 62, 65-69, 77, 79-95</sup>, sin olvidar que la H&E y demás técnicas morfológicas son la base para todo diagnóstico patológico. Por otro lado, la detección de la translocación específica facilita un diagnóstico seguro que ayuda al oncólogo a indicar y prescribir un tratamiento más específico en cada caso.

La detección en 1983 por Aurias y cols.<sup>97</sup> de una translocación genética balanceada presente en gran número de sarcomas de Ewing's y PNET a nivel de los cromosomas t(11;22)(q24;q12) abrió una nueva perspectiva diagnóstica para este grupo de sarcomas. Posteriormente se detectarían otras nuevas (véase más adelante). Sería ya a principio de la pasada década cuando en 1992 el grupo francés, encabezado por Thomas Delattre demostraría que esta translocación está asociada a una fusión génica aberrante entre el llamado gen *EWSR1* localizado a nivel 22q12 y el gen *FLI1* perteneciente a una familia conocida como *ETS* (Erythroblastic Transforming Sequence) situado en el cromosoma 11q24. La hipótesis de que las neoplasias humanas son causadas por cambios genéticos adquiridos ha sido publicada desde muchos años atrás<sup>28, 54, 55, 94, 95, 98, 99</sup>. No obstante, no fue hasta inicio de la década de los 70 que se introdujo el cariotipaje de las bandas cromosómicas y se inició un análisis sistemático de estos cambios. La presencia de translocaciones cromosómicas y/o mutaciones génicas ofrecen ventajas en la proliferación celular generando una transformación maligna en las células portadoras de estas anomalías genómicas<sup>54, 94, 98, 99</sup>. Aproximadamente el 15-20% de los tumores mesenquimales que afectan hueso y partes blandas presentan translocaciones cromosómicas específicas. Estas translocaciones están limitadas a tumores específicos como los *TFSE*, sarcoma sinovial (*SS*), liposarcoma mixoide (*LSM*)/liposarcoma de células redondas (*LCR*) condrosarcoma mixoide extraesquelético (*CME*), sarcoma de células claras (*SCC*), histiocitoma fibroso



angiomatoide (*HFA*) y *RMS*, donde cerca del 90-95% de los tumores muestran una translocación específica típica de cada entidad tumoral<sup>25, 26, 54, 65, 79, 94-96, 98, 99</sup>. Algunos tumores muestran mutaciones génicas somáticas específicas como en los tumores del estroma gastrointestinal (c-Kit o PDGFRa)<sup>25, 54, 79, 94</sup>. En los sarcomas más frecuentes como los osteosarcomas, condrosarcomas, leiomiomas o sarcomas pleomórficos los tumores muestran cariotipos más complejos con numerosas ganancias y/o pérdidas cromosómicas pero sin alteraciones genéticas específicas. Las bases de la clasificación WHO del 2002 de tumores de hueso y partes blandas están dadas por la integración de la morfología, IHQ y la genética molecular<sup>25</sup> siendo los estudios moleculares útiles como marcadores para determinar enfermedad mínima residual y para predecir la evolución clínica y el pronóstico<sup>25, 94</sup>,

**Marcadores relacionados con el ciclo celular.** La expresión de diversos marcadores relacionados con el ciclo celular ha sido estudiada en *TFSE*<sup>194-204</sup>. Generalmente estos marcadores no tienen significado diagnóstico pero sí una implicación en el pronóstico<sup>194-204</sup>. La expresión de estas proteínas es nuclear y puede estar o no relacionada con una alteración a nivel genómico. Los marcadores IHQ más estudiados en *TFSE* incluyen Ki-67, p16, p53 y p21<sup>194-204</sup>.

La expresión del Ki-67 es variable en los *TFSE* estando relacionada la alta expresión de este marcador con mal pronóstico. Las alteraciones de la p16 están descritas en menos del 20% de los tumores tipo *TFSE*<sup>197, 198, 200-204</sup>. No existe una buena correlación entre la expresión proteica de la p16 a nivel IHQ y la alteración genómica correspondiente al menos en los *TFSE*. En los estudios realizados por López Guerrero y cols<sup>168</sup>, los tumores con delección de la p16 muestran expresión IHQ variable de la proteína. Las alteraciones de la p53 pueden encontrarse como evento secundario en aproximadamente el 15% de los *TFSE*<sup>196, 198, 200-202</sup>. Generalmente existe una buena correlación entre la expresión IHQ de la proteína y las alteraciones a nivel genómico existiendo una intensa expresión proteica nuclear en los tumores con mutaciones<sup>196, 198, 200-202</sup>. La expresión de p21 es relativamente poco frecuente aunque hay casos con intensa expresión nuclear<sup>200</sup>.

**Nuevos marcadores en TFSE Ezrina:** La expresión de ezrina fue descrita inicialmente en neoplasias óseas tipo osteosarcomas y condrosarcomas<sup>218-221</sup>. La inmunotinción por este anticuerpo puede ser membranosa y/o citoplasmática y su implicación como marcador diagnóstico y/o pronóstico es controvertida<sup>218-221</sup>. Recientemente se ha descrito su utilidad para diferenciar entre condrosarcoma convencional y osteosarcoma condroblástico pero estos hallazgos no se han podido confirmar totalmente<sup>219, 221</sup>. Particularmente en *TFSE* la ezrina es expresada intensamente en localización citoplasmática pero no es específica de este tipo de tumor y por lo tanto el valor diagnóstico es cuestionable<sup>219, 221</sup>. En un estudio reciente, Machado y cols. describen como la expresión IHQ de ezrina representa un factor de buen pronóstico independiente en los *TFSE*.

**Marcadores relacionados con la vía NOCT.** La vía NOCT (NOCT1, 2, 3,4,5, HES1) se ha estudiado ocasionalmente en casos con diagnóstico de *TFSE*<sup>195, 226</sup>. Se ha descrito que la inhibición de la señal NOCT induce diferenciación neural en *TFSE* pero de cualquier manera no está demostrado el papel

pronóstico ni diagnóstico de estos marcadores en *TFSE*.

### Reordenaciones génicas

Actualmente, los sarcomas pueden ser subdivididos en diferentes grupos en dependencia de los hallazgos genéticos o moleculares que presenten y los subgrupos incluyen:

**1. Sarcomas con translocaciones cromosómicas recíprocas específicas** Los genes *EWSRI* y *FUS* están involucrados en muchas de las translocaciones que caracterizan algunos sarcomas sobre todo *TFSE* 5, 25, 26, 54, 55, 61, 80, 81, 87, 88, 96, 100-120. Probablemente el efecto de los genes *EWSRI* y *FUS* es muy similar cuando están involucrados en una translocación cromosómica<sup>28</sup>. La oncoproteína híbrida que se forma como consecuencia de la translocación actúa como un factor de transcripción aberrante que afecta los patrones de expresión génica iniciando la formación tumoral<sup>28, 54</sup>. Los genes blanco del producto de fusión *EWSRI/ETS* pueden estimular la proliferación celular, evadir la inhibición del crecimiento, evitarla senescencia, escapar de la apoptosis o inducir angiogénesis, invasión y metástasis<sup>28, 54</sup>. En las Tablas 1, 2 y 3 se muestran las translocaciones cromosómicas descritas con más frecuencia en los *TCRP*. **2. Sarcomas con mutaciones somáticas específicas:** CD117/Kit en tumor del estroma gastrointestinal y hSNF5/INI1 en los tumores rabdoideos 54, 94, 129, 130.

**2. Sarcomas con mutaciones somáticas específicas:** CD117/Kit en tumor del estroma gastrointestinal y hSNF5/INI1 en los tumores rabdoideos 54, 94, 129, 130.

**3. Sarcomas con amplificaciones más o menos específicas:** *CDK4* y *MDM2* en los liposarcomas aunque pueden ocurrir en condrosarcomas y osteosarcomas. *NMYC* neuroblastoma 54, 56, 94, 130-134.

**4. Sarcomas con cariotipos complejos no específicos:** tumores que muestran cariotipos complejos que carecen de aberraciones genéticas específicas (osteosarcomas, condrosarcomas) 54, 79, 86, 87, 94, 132, 134

### Estudios de expresión génica:

Las técnicas de estudio de expresión de genes fueron desarrolladas a mediados de los años 90 utilizando micromatrices de expresión genómica. Los métodos estándares de biología molecular (Southern blotting, Northern blotting, Western blotting, reacción en cadena de polimerasa y secuenciación) así como las técnicas moleculares auxiliares utilizadas rutinariamente por el patólogo, típicamente miden un biomarcador donde generalmente no se requiere un análisis estadístico amplio para la interpretación de los resultados obtenidos<sup>60, 95, 235</sup>. Sin embargo, los estudios de expresión de genes miden simultáneamente la expresión de miles de genes (10,000-500,000) y la interpretación de esa enorme cantidad de datos cuantitativos producidos cuando se mide una simple muestra requiere del uso de métodos estadísticos bien estandarizados para determinar el significado de los hallazgos observados<sup>60, 95, 235</sup>. Los objetivos del estudio de

expresión de genes en sarcomas son a) ampliar los conocimientos en las vías biológicas aberrantes que contribuyen al desarrollo de los sarcomas, b) refinar la clasificación de los sarcomas de tal manera que refleje realmente comportamiento biológico de los tumores, c) identificar marcadores que sean predictivos de diagnóstico, evolución del paciente y respuesta a la terapia<sup>60, 95, 235</sup>. *Expresión de genes en TCRP y TFSE* El estudio publicado por Olsen et al<sup>235</sup> describe un patrón de expresión génica para diferenciar los *TFSE* de otros sarcomas de células redondas. Sin embargo estos estudios aunque representan el futuro de la patología son muy costosos y no se pueden aplicar por el momento como método diagnóstico de rutina en la mayoría de los laboratorios de patología

**De manera resumida podemos plantear la evolución de las técnicas diagnósticas aplicadas en el estudio de los *TFSE* de la siguiente forma:**

- I. Aplicación de técnicas convencionales histológicas: H&E.
- II. Histoquímica convencional: PAS, Carmín de Best,
- III. Microscopía electrónica
- IV. Inmunohistoquímica: marcadores mesenquimales, neurales, epiteliales y otros
- V. Cultivos celulares
- VI. Xenotrasplante de tumores
- VII. Estudios citogenéticos convencionales: translocaciones cromosómicas principales
- VIII. FISH
- IX. Biología molecular: reordenamiento genéticos y tipos de genes de fusión.

**Principios básicos en el tratamiento de los Es/TFSE :** Aunque se diagnostican como enfermedad no metastásica, clínicamente se considera que es una enfermedad diseminada. Esto es así porque el 80-90% de los pacientes que se someten a tratamiento loco-regional exclusivo presentarán enfermedad a distancia. Como los *TFSE* son sensibles a la quimioterapia, se ha estudiado el impacto de la adición de regímenes de poli-quimioterapia a tratamientos loco-regionales eficaces. El resultado ha sido un incremento en la supervivencia, lo que refuerza la hipótesis de que esta enfermedad está diseminada en la mayoría de los pacientes de presentación localizada.

Actualmente, en pacientes con enfermedad localizada, las tasas de supervivencia a 5 y 10 años son, de 70 y del 50%, respectivamente<sup>143, 144, 194, 239</sup>. Asimismo, en la mayoría de los casos consigue una reducción de la masa tumoral que permite un mejor control loco-regional con tratamientos menos mutilantes.

**Tratamiento loco-regional:** El control local de la enfermedad se puede conseguir mediante cirugía, radioterapia o ambos. Cada uno tiene sus ventajas y sus inconvenientes. Lo recomendable es el tratamiento dentro de un equipo multidisciplinar con experiencia en esta enfermedad. *TFSE* es un tumor radiosensible<sup>143, 144, 194, 239</sup>. La radioterapia puede constituir una elección óptima en pacientes en los que el tratamiento quirúrgico posible sea mutilante o genere secuelas de pérdida de función. Muchos centros

prefieren el tratamiento quirúrgico en localizaciones potencialmente reseccables y en aquellos huesos “prescindibles” (por ejemplo peroné, costilla), por los siguientes motivos: Disminuye el riesgo de complicaciones a largo plazo de la radioterapia, especialmente en huesos en fase de crecimiento y permite el análisis del efecto de la quimioterapia pre-operatoria sobre el tumor

**Tratamiento con quimioterapia:** La mayoría de los tratamientos modernos contemplan la administración inicial de tratamiento con quimioterapia, antes de la realización del tratamiento lo corregional con cirugía y/o radioterapia.

A este tipo de quimioterapia se le denomina de inducción o neoadyuvante. Permite el control de la enfermedad micrometastásica (metástasis no detectables) desde el comienzo del tratamiento, que es lo que realmente condiciona la supervivencia de los pacientes<sup>143, 144, 194, 239</sup>. Asimismo, en la mayoría de los casos consigue una reducción de la masa tumoral que permite un mejor control lo corregional con tratamientos menos mutilantes.

### **Nuevas dianas moleculares en el tratamiento de los TFSE**

Recientemente se ha publicado la implicación de la vía del receptor IGF1 en el desarrollo de los *TFSE*<sup>211, 213-216, 241</sup>. El uso de dianas terapéuticas frente a esta vía, utilizando el anticuerpo monoclonal anti-receptor IGF1 (R1507) constituye una estrategia en el tratamiento actual de pacientes con sarcomas recurrentes refractarios (*TFSE*, liposarcoma mixoide, condrosarcoma mixoide extraesquelético, y tumor desmoplásico de células redondas y azules)<sup>211, 213-216, 241</sup>. También se encuentran en desarrollo progresión varios estudios que utilizan como diana terapéutica el transcripto generado por las fusiones génicas o los productos relacionados con el metabolismo en estos tumores.

### **Biografía**

1. Dorfman H, Czerniak B. *Bone tumors*. St. Louis.: Mosby., 1998.
2. Folpe AL, Goldblum JR, Rubin BP et al. Morphologic and immunophenotypic diversity in Ewing family tumors: a study of 66 genetically confirmed cases. *Am J Surg Pathol* 2005;**29**:1025-1033.
3. Llombart-Bosch A. Small round cell tumors of bone and soft tissue. Introduction. *Semin Diagn Pathol* 1996;**13**:149-152.
4. Llombart-Bosch A, Contesso G, Peydro-Olaya A. Histology, immunohistochemistry, and electron microscopy of small round cell tumors of bone. *Semin Diagn Pathol* 1996;**13**:153-170.
5. Ushigome U, Machinami R, Sorensen PH. Ewing sarcoma/Primitive neuroectodermal tumor (PNET). In

C. D. M. Fletcher, K. Unni, Mertens F eds. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*. Lyon.: IARC Press., 2002.

6. Ewing J. Classics in oncology. Diffuse endothelioma of bone. James Ewing. Proceedings of the New York Pathological Society, 1921. *CA Cancer J Clin* 1972;**22**:95-98.

7. Ewing J. The Classic: Diffuse endothelioma of bone. Proceedings of the New York Pathological Society. 1921;12:17. *Clin Orthop Relat Res* 2006;**450**:25-27.

8. Ewing J. Diffuse endothelioma of bone. *Proc NY Pathol Soc* 1921;**21**:17-24. 9. Ewing J. *Neoplastic Diseases*. Philadelphia, 1919.

9 14. Oberling C. Les réticulosarcomes et les réticulo-endothéliosarcomes de la moelle osseuse (sarcomes d'Ewing) *Bull Ass Fr Et du Cancer* 1928;**17**:259-263.

10 21. Llombart-Bosch A, Blache R, Peydro-Olaya A. Ultrastructural study of 28 cases of Ewing's sarcoma: typical and atypical forms. *Cancer* 1978;**41**:1362-1373.

11 22. Peydro Olaya A, Llombart-Bosch A. [Round cell sarcoma of bone marrow. A histochemical and electron-microscopic study]. *Sangre (Barc)* 1972;**17**:363-377.

12 23. Askin FB, Rosai J, Sibley RK, Dehner LP, McAlister WH. Malignant small cell tumor of the thoracopulmonary region in childhood: a distinctive clinicopathologic entity of uncertain histogenesis. *Cancer* 1979;**43**:2438-2451.

13 26. Llombart-Bosch A, Machado I, Navarro S et al. Histological heterogeneity of Ewing's sarcoma/PNET: an immunohistochemical analysis of 415 genetically confirmed cases with clinical support. *Virchows Arch* 2009;**455**:397-411.

14 27. Llombart-Bosch A, Pellin A, Carda C, Noguera R, Navarro S, Peydro-Olaya A. Soft tissue Ewing sarcoma--peripheral primitive neuroectodermal tumor with atypical clear cell pattern shows a new type of EWS-FEV fusion transcript. *Diagn Mol Pathol* 2000;**9**:137-144.

15 28. Romeo S, Dei Tos AP. Soft tissue tumors associated with EWSR1 translocation. *Virchows Arch* 2010;**456**:219-234.

16 29. Folpe AL, Hill CE, Parham DM, O'Shea PA, Weiss SW. Immunohistochemical detection of FLI-1 protein expression: a study of 132 round cell tumors with emphasis on CD99-positive mimics of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Am J Surg Pathol* 2000;**24**:1657-1662.

17 30. Llombart-Bosch A, Carda C, Peydro-Olaya A et al. Soft tissue Ewing's sarcoma. Characterization in established cultures and xenografts with evidence of a neuroectodermic phenotype. *Cancer* 1990;**66**:2589-2601.

18 31. McCormack LJ, Ivins JC, Dahlin DC, Johnson EW, Jr. Primary reticulum-cell sarcoma of bone. *Cancer* 1952;**5**:1182-1192.

19 32. Llombart-Bosch A, Peydro-Olaya A, Gomar F. Ultrastructure of one Ewing's sarcoma of bone with endothelial character and a comparative review of the vessels in 27 cases of typical Ewing's sarcoma. *Pathol Res Pract* 1980;**167**:71-87.

20 33. Peydro-Olaya A, Llombart-Bosch A, Carda-Batalla C, Lopez-Guerrero JA. Electron microscopy and other ancillary techniques in the diagnosis of small round cell tumors. *Semin Diagn Pathol* 2003;**20**:25-45.

- 21 38.Fellinger EJ, Garin-Chesa P, Triche TJ, Huvos AG, Rettig WJ. Immunohistochemical analysis of Ewing's sarcoma cell surface antigen p30/32MIC2. *Am J Pathol* 1991;**139**;317-325.
- 22 42. Lopez-Guerrero JA, Noguera R, Llombart-Bosch A. GIST: particular aspects related to cell cultures, xenog
- 23 43.Machado I, Giner F, Mayordomo E, Carda C, Navarro S, Llombart-Bosch A. Tissue microarrays analysis in chondrosarcomas: light microscopy, immunohistochemistry and xenograft study. *Diagn Pathol* 2008;**3 Suppl 1**;S25.
- 24 44.Mayordomo E, Machado I, Giner F et al. A Tissue Microarray Study of Osteosarcoma: Histopathologic and Immunohistochemical Validation of Xenotransplanted Tumors as Preclinical Models. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*.
- 25 45.Subramaniam MM, Navarro S, Pellin A y cols. Tissue microarray profiling of primary and xenotransplanted synovial sarcomas demonstrates the immunophenotypic similarities existing between SYT-SSX fusion gene confirmed, biphasic, and monophasic fibrous variants. *Virchows Arch* 2006;**449**;435-447.
- 26 46. Subramaniam MM, Noguera R, Piqueras M et al. Evaluation of genetic stability of the SYT gene rearrangement by break-apart FISH in primary and xenotransplanted synovial sarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;**172**;23-28.
- 27 54.Bovee JV, Hogendoorn PC. Molecular pathology of sarcomas: concepts and clinical implications. *Virchows Arch* 2010;**456**;193-199.
- 28 55. Bovee JV, Hogendoorn PC. Pitfalls in pathology of soft tissue sarcomas. *Cancer Treat Res* 2004;**120**;81-97.
- 29 54.Bovee JV, Hogendoorn PC. Molecular pathology of sarcomas: concepts and clinical implications. *Virchows Arch* 2010;**456**;193-199.
- 30 55. Bovee JV, Hogendoorn PC. Pitfalls in pathology of soft tissue sarcomas. *Cancer Treat Res* 2004;**120**;81-97.
- 31 Machado I, Noguera R, Pellin A et al. Molecular diagnosis of Ewing sarcoma family of tumors: a comparative analysis of 560 cases with FISH and RT-PCR. *Diagn Mol Pathol* 2009;**18**;189-199.
- 32 Machado I, Noguera R, Pellin A et al. Molecular diagnosis of Ewing sarcoma family of tumors: a comparative analysis of 560 cases with FISH and RT-PCR. *Diagn Mol Pathol* 2009;**18**;189-199.
- 33 Machado I, Noguera R, Pellin A et al. Molecular diagnosis of Ewing sarcoma family of tumors: a comparative analysis of 560 cases with FISH and RT-PCR. *Diagn Mol Pathol* 2009;**18**;189-199.
- 34 143.Paulussen M, Bielack S, Jurgens H, Casali PG. Ewing's sarcoma of the bone: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009;**20 Suppl 4**;140-142.
- 35 143.Paulussen M, Bielack S, Jurgens H, Casali PG. Ewing's sarcoma of the bone: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009;**20 Suppl 4**;140-142.
- 36 164.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.
- 37 187.Navarro S, Cavazzana AO, Llombart-Bosch A, Triche TJ. Comparison of Ewing's sarcoma of bone and peripheral neuroepithelioma. An immunocytochemical and ultrastructural analysis of two primitive neuroectodermal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 1994;**118**;608-615.

- 38 187. Navarro S, Cavazzana AO, Llombart-Bosch A, Triche TJ. Comparison of Ewing's sarcoma of bone and peripheral neuroepithelioma. An immunocytochemical and ultrastructural analysis of two primitive neuroectodermal neoplasms. *Arch Pathol Lab Med* 1994;**118**;608-615.
- 39 196. de Alava E, Antonescu CR, Panizo A et al. Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer* 2000;**89**;783-792.
- 40 197. Honoki K, Stojanovski E, McEvoy M et al. Prognostic significance of p16 INK4a alteration for Ewing sarcoma: a meta-analysis. *Cancer* 2007;**110**;1351-1360.
- 41 200. Lopez-Guerrero JA, Machado I, Scotlandi K et al. Clinicopathological significance of cell cycle regulation markers in a large series of genetically confirmed Ewing's Sarcoma Family of Tumors. *Int J Cancer*.
- 42 201. Lopez-Guerrero JA, Pellin A, Noguera R, Carda C, Llombart-Bosch A. Molecular analysis of the 9p21 locus and p53 genes in Ewing family tumors. *Lab Invest* 2001;**81**;803- 814.
- 43 202. Noguera R, Machado I, Piqueras M et al. Tissue microarrays: applications in study of p16 and p53 alterations in Ewing's cell lines. *Diagn Pathol* 2008;**3 Suppl 1**;S27.
- 44 219. Machado I, Navarro S, Giner F, Alberghini M, Bertoni F, Llombart-Bosch A. Ezrin immunohistochemical expression in chondrosarcomas, osteosarcomas and Ewing sarcoma family of tumors. *Virchows Arch* 2010;**457**;87-89