



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**DETERMINACIÓN DEL REARREGLO CROMOSÓMICO
PAX3-FKHR Y PAX7-FKHR PRESENTES EN EL
RABDOMIOSARCOMA ALVEOLAR UTILIZANDO
HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

Dra. Olinka Reyes Posada

**DIRECTOR DE TESIS
M. en C. María del Pilar Eguía Aguilar**

**ASESOR DE TESIS
Dr. José Mario Pérezpeña Diazconti
Dr. Stanislaw Sadowinski Pine**



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO

FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

MÉXICO, D. F.

Agosto 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Con todo mi amor a mi mamá, por nuestra lucha
incesante.

A mi hijo Abraham y a Mario, porque son mi razón
de estar aquí.

Por la confianza y apoyo a la Dra. M. del Pilar
Eguía Aguilar M en C. y al Dr. Mario Perezpeña
Diazconti para incluirme en este proyecto de
trabajo; así como por la orientación y enseñanzas
otorgadas.

Al Dr. Stanislaw Sadowinski Pine, por el
entusiasmo que me inspiro a realizar la
especialidad.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO

“FEDERICO GÓMEZ”

**TÍTULO: DETERMINACIÓN DEL REARREGLO CROMOSÓMICO PAX3-FKHR Y PAX7FKHR PRESENTES
EN EL RABDOMIOSARCOMA ALVEOLAR UTILIZANDO HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)**

TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER LA SUBESPECIALIDAD EN PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA

OLINKA REYES POSADA

ASESORES

M. EN C. MARÍA DEL PILAR EGUÍA AGUILAR

DR. JOSE MARIO PEREZPEÑA DIAZCONTI

DR. STANISLAW SADOWINSKI PINE

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	pág. 5
MARCO TEORICO.....	pág. 7
ANTECEDENTES	pág. 8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	pág. 10
JUSTIFICACION.....	pág. 11
OBJETIVOS.....	pág. 12
HIPOTESIS.....	pág. 12
MATERIAL Y METODOS	pág. 13
DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	pág. 14
RESULTADOS	pág. 21
DISCUSIÓN.....	pág. 24
CONCLUSIONES.....	pág. 25
BIBLIOGRAFÍA.....	pág. 26

INTRODUCCIÓN

El sarcoma de tejidos blandos más frecuente en niños es el rabdomiosarcoma y representa del 5-10 % de los tumores sólidos en la infancia (1,2,3,4). Los dos tipos de rabdomiosarcomas son alveolar y embrionario. El rabdomiosarcoma alveolar (ARMS) se caracteriza por la presencia de la t(2;13) y t(1;13). Esta translocación involucra los genes PAX3 (paired box), PAX7 que se localizan sobre el cromosoma 2 y 1, respectivamente. Estos dos genes se sabe que son importantes en el desarrollo del músculo durante la embriogénesis. La alteración en la función de estos genes puede resultar en el desarrollo de músculo anormal. Ambas translocaciones t(2;13)(q35;q14) y t(1;13)(p36;q14) resultan de la fusión del dominio de unión al DNA de PAX3 y PAX7 con el dominio de activación transcripcional de FKHR (fork head region) sobre el cromosoma 13 (Fig. 1). Los genes de fusión resultantes son expresados como transcritos quiméricos que codifican proteínas quiméricas y activan la transcripción de sitios de unión PAX con una alta potencia más que la correspondiente al tipo silvestre (5, 6,7). Ambos genes de fusión proporcionan un marcador diagnóstico único para ARMS razón por la que se utilizan diversas técnicas moleculares como la técnica de FISH (hibridación *in situ* fluorescente) y la RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Ambas pueden utilizarse para determinar el tipo de translocación con una correlación del 95 % con el diagnóstico histopatológico (8). El diagnóstico temprano y una apropiada remisión a un centro especializado guían a un tratamiento oportuno que se refleja en mejor calidad de vida para el paciente. En los últimos 10 años la supervivencia ha mejorado dramáticamente (9).

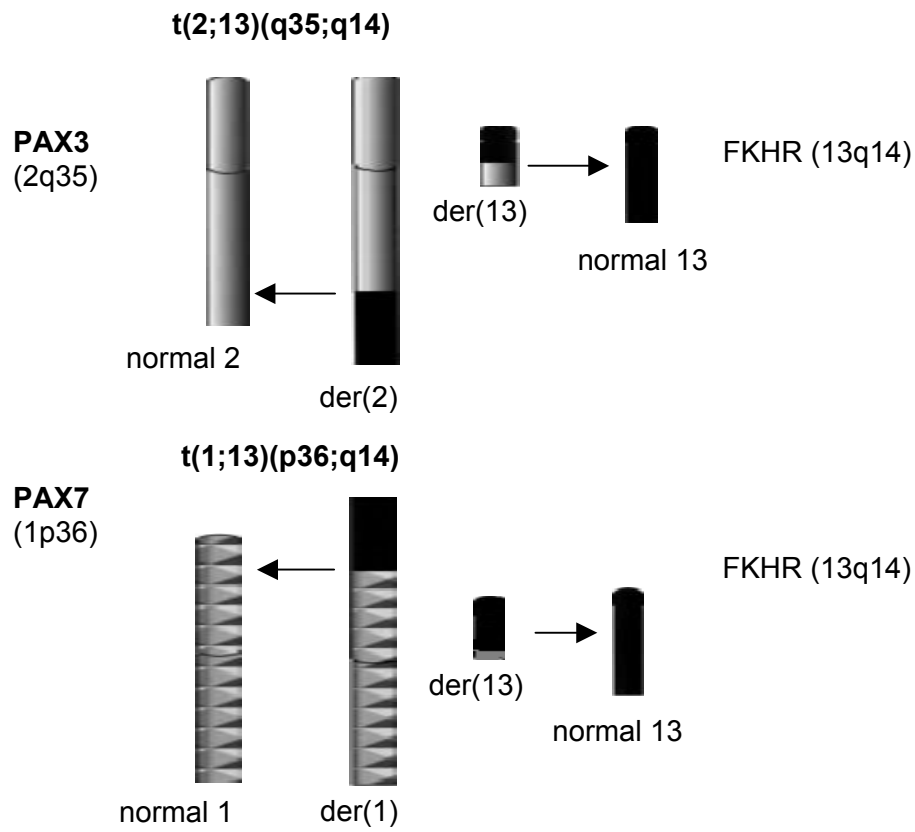


Fig 1. Diagrama de las translocaciones cromosómicas que resultan en la fusión de genes PAX3 y PAX7 con FKHR.

MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

Los rhabdomyosarcomas (RMS) pertenecen a la familia de sarcomas de tejidos blandos que muestran evidencia inmunofenotípica y ultraestructural de diferenciación del músculo esquelético. Este tipo de tumor surge a consecuencia de la pérdida en el control del crecimiento y diferenciación de células miogénicas. Las translocaciones cromosómicas son alteraciones genéticas consistentes y específicas en varios tipos de sarcomas de tejidos blandos y de hueso. Las bases moleculares de las translocaciones en ARMS y en otros sarcomas han revelado que en cada translocación se yuxtaponen dos genes para crear un gen quimérico que codifica una proteína de fusión. El análisis funcional de estas nuevas proteínas ha demostrado su actividad oncogénica. Los aspectos funcionales de las translocaciones en sarcomas son el centro de varias investigaciones, sin embargo los mecanismos por los cuales los loci de cromosomas separados se yuxtaponen y rearreglan en la tumorigénesis son aún desconocidos. Mediante el ensayo de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se ha demostrado que el exon 7 de PAX3 se fusiona consistentemente con el exon 2 de FKHR en el transcrito quimérico PAX3-FKHR. En el caso de PAX7-FKHR se fusiona el exon 7 de PAX7 con el exon 2 y 3 de FKHR (6,10).

ANTECEDENTES

En 1958 Horn y Enterline (11) hicieron la primera clasificación basada en datos clínicos y de histopatología. Describieron los 4 patrones clásicos constituidos por el rhabdomioma pleomórfico, alveolar, embrionario y botrioides. Esta clasificación es la base de todas las clasificaciones posteriores y es conocida como el esquema convencional. Los términos embrionario y alveolar fueron introducidos en 1950 por Store y Dargeon y en 1956 por Riopelle y Thériault, respectivamente. Algunos autores demostraron que el patrón histológico alveolar era de conducta biológica más agresiva que los rhabdomiomas embrionarios por lo tanto con pronóstico de supervivencia menor en relación a los mismos (12,13,14). El Grupo Interinstitucional para el Estudio del Rhabdomioma (IRS) en su primer informe mostró diferencias en la supervivencia de los pacientes si se tomaba como base el sitio primario y estadio clínico, pero no se tomó como variable el tipo histológico de los rhabdomiomas. A partir del segundo informe, se incluyó la variante histológica que fue de gran importancia pues en los resultados se encontró supervivencia a los cinco años de 95 % para la variante botrioides, 88% para la variante de células fusiformes, 66% para la variante embrionaria y 54 % para el patrón alveolar (2). Actualmente se ha establecido claramente que el fenotipo de malignidad es determinado genéticamente y la interacción entre el medio ambiente y el desarrollo genético de la célula influye en el desarrollo de neoplasias específicas. La investigación en cáncer ha progresado a partir de la consolidación del conocimiento y comprensión de los procesos fundamentales asociados a estas enfermedades. De esta manera la evolución del estudio de las neoplasias se ha basado en teorías revolucionarias como la de Knudsen en 1971 (15) apoyadas en mejores técnicas para demostrar las mismas como el estudio de los cromosomas y posteriormente la reacción en cadena de la polimerasa con sus variantes. El esfuerzo de investigadores alrededor del mundo teniendo rigurosas reglas universales ha dado como resultado datos certeros y nuevas hipótesis. Los rhabdomiomas alveolares han mostrado constantemente la presencia de la translocación t(2;13) o la variante t(1;13) que resultan en la fusión de productos oncogénicos PAX3-FKHR y PAX7-FKHR, respectivamente. La t(2;13)(q35;q14) se ha detectado en 70 % de casos de rhabdomioma alveolar, la variante t(1;13)(p36;q14) en 10 % (14, 15), probablemente por la complejidad de completar la fusión funcional de PAX7-FKHR, la cual requiere tres rupturas en vez de dos, para cambiar la orientación de

uno de los genes (7). Sin embargo estos porcentajes varían de tal forma que Sorensen (2002) obtuvo un porcentaje de 55 % con PAX3-FKHR, 22% PAX7-FKHR y en 23% la fusión fue negativa (17). Por su parte Anderson (2001) reportó 40 % en PAX3-FKHR, 8.7% PAX7-FKHR y 50 % sin translocación (18). Ambas han sido asociadas únicamente con rhabdomyosarcomas alveolares por lo que hasta este momento parecen ser marcadores moleculares específicos de esta neoplasia. Lo anterior se explica debido a la fusión de los genes PAX con el gen FKHR, lo cual da como resultado una proteína muy similar en estructura, con una identidad hasta del 97% entre los genes PAX3 y PAX7. Esta identidad sugiere que ambas proteínas de fusión reconocen blancos similares y pueden regular un grupo de genes blancos involucrados en la patogénesis de los rhabdomyosarcomas alveolares. Ambos genes se expresan en el desarrollo de somitas al momento de la formación del dermomiótomo. La expresión de PAX3 ocurre antes de la migración del mioblasto y la formación de la musculatura, y la expresión de PAX7 comienza pocos días después y se mantiene durante la diferenciación de los músculos del tronco y extremidades. El hallazgo de la expresión de los genes PAX3 y PAX7 en precursores de músculo esquelético es consistente con la actividad de sus promotores en el ARMS, con diferenciación a lo largo de la vía del músculo estriado (10).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México no se han desarrollado técnicas moleculares que permitan la identificación de los diferentes subtipos biológicos presentes en el rhabdomioma alveolar. En este momento en el laboratorio de biología molecular del departamento de patología del HIM, estamos desarrollando la técnica de FISH para aplicarla de forma rutinaria, con el resultado final de planificación óptima en el tratamiento de pacientes con diagnóstico de rhabdomioma.

JUSTIFICACIÓN

Los rhabdomyosarcomas alveolares (ARMS) se caracterizan por presentar translocaciones recíprocas y específicas que generan la fusión del gen PAX3/PAX7 – FKHR estas alteraciones representan eventos fundamentales en el desarrollo de estas neoplasias, además de ser marcadores útiles para el diagnóstico y blancos potenciales para intervención terapéutica, la mayoría de estos tumores son diagnosticados correctamente usando histología convencional e inmunohistoquímica, sin embargo, el papel pronóstico de las translocaciones hace necesario el uso de herramientas moleculares. La implementación de estas técnicas aumentará el conocimiento sobre la presentación de los diferentes subtipos biológicos de ARMS de tal forma que la presencia de determinado tipo de translocación se relacione con la supervivencia de los pacientes. Además estos tipos de tumores tienen una rápida diseminación a otros órganos por lo que un diagnóstico certero y temprano es fundamental para el desarrollo de tratamientos terapéuticos adecuados.

OBJETIVOS

Desarrollar el método de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), para demostrar las translocaciones presentes en los rhabdomiosarcomas alveolares.

- Obtener cultivos de bacterias *E. coli* transformadas con el vector recombinado.
- Obtener sondas de un tamaño adecuado para el FISH que es de 200- 800 pb.
- Marcar las sondas mediante la técnica "nick translation".
- Realización del FISH sobre células en metafase para comprobar que las sondas correspondan con los genes involucrados en las translocaciones del ARMS.

HIPÓTESIS

Las translocaciones t(2;13) y la variante t(1;13) presentes en el rhabdomiosarcoma alveolar pueden ser demostradas en forma precisa utilizando la técnica de FISH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio: Observacional y transversal.

Muestra: Por conveniencia

Criterios de inclusión

- a) Pacientes menores de 18 años
- b) De uno u otro sexo
- c) Con diagnóstico histopatológicos de rhabdomioma realizado en el Departamento de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez
- d) Contar con bloques de parafina en el archivo de Departamento de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez

Criterios de exclusión

- a) No contar con bloques de parafina en el archivo de Departamento de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez
- b) Tejido necrótico en 90% de la superficie tumoral
- c) Cambios por mala fijación en el tejido tumoral

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Manejo de clonas

Las clonas fueron obtenidas de una genoteca humana BACPAC Resources Center at Children's Hospital Oakland Research Institute (WWW.bacpac.chori.org). La cepa hospedadora es *E coli* DH10 con vectores BAC (cromosoma artificial bacteriano) y PAC (cromosoma artificial derivado de P1) que albergan las regiones de los genes PAX3, PAX7 y FKHR. (tabla 1)

Nombre de clona y locus	Vector	Tamaño vector (kb)	Tamaño de inserto (kb)	Gen recombinado
RP1-93P18 (1p35.2-1p36.23)	pCYPAC2	18.754	110	PAX7
RP11-71J24 (2q35-2q36.2)	pBACe3.6	11.612	174	PAX3
RP11-89L15 (13q12.13-13q21.1)	pBACe3.6	11.612	174	FKHR

Tabla 1. Características de las clonas y vectores utilizados para la identificación por FISH de los genes involucrados en las translocaciones de los ARMS.

Recuperación de colonias bacterianas de cultivos almacenados en agar

- Con un asa bacteriológica se tomó un inóculo de bacterias y se diseminó sobre un plato de agar Luria-Bertani (LB) fresco suplementado con kanamicina (25 µg/ml) para PAC y cloranfenicol (12.5 µg/ml) para BAC.
- Incubar el plato a 37 °C de 12 a 24 hrs hasta que las colonias se desarrollen.

Precultivo

- Con el asa bacteriológica se tomó una colonia bien aislada y saludable y se inoculó en 3 ml de LB suplementado con kanamicina para PAC y cloranfenicol para BAC. Se utilizaron tubos de polipropileno de 12 a 15 ml de capacidad.
- Las bacterias se dejaron crecer toda la noche (hasta 16 hrs), con agitación de 225 a 300 rpm a 37 °C.
- Se guardó un concentrado de bacterias en glicerol al 3%.

Cultivo

- En un matraz Erlen Meyer de 1.5 litros se prepararon 500 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente.
- Se tomó 1 ml de precultivo y se inoculó en medio LB.
- Se dejó el cultivo en crecimiento durante toda la noche, con agitación de 225 a 300 rpm a 37 °C.

Purificación del plásmido (Maxiprep)

La extracción de DNA del vector recombinado se llevó a cabo según protocolo Plasmid Maxi kit de Quiagen (cat. 12163) con algunas modificaciones. A continuación se detalla el método:

- Se colectaron las células bacterianas por centrifugación a 6000 rpm (rotor Sorvall GSA) por 15 min a 4 °C.
- Se resuspendió la pastilla bacteriana en 10 ml de buffer P1. Resuspender completamente por pipeteo hasta que se observe una suspensión homogénea.
- Se agregaron 10 ml de buffer P2, se mezcló gentilmente invirtiendo el tubo de 4-6 veces y se incubó a t.a (15-25 °C) por 5 min.
- Se agregaron 10 ml de buffer P3 frío, se mezcló inmediatamente invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces y se incubó por 20 min. El material precipitado contiene DNA genómico, proteínas, detritos celulares y KDS.
- Se centrifugó a máxima velocidad (10,000 a 13,000 rpm, rotor Sorvall SS-34) por 30 min. a 4 °C. El sobrenadante que contiene DNA del plásmido se colocó en un tubo limpio y se eliminó cualquier partícula suspendida que obstruyera la columna.

- Se equilibró una columna Quiagen-tip 500 aplicando 10 ml de buffer QBT, permitir que drene completamente.
- El sobrenadante que contiene el plásmido recombinado se depositó en la columna y se dejó que fluyera por gravedad.
- La columna se lavó 2 veces con 30 ml de buffer QC en cada ocasión.
- Se eluyó el ADN 3 veces con 10 ml en cada ocasión de buffer QF a 65 °C. Se colectó el eluido en tubo limpio.
- El ADN se precipitó agregando 0.7 volúmenes (21 ml por 30 ml de buffer de elusión) de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló y centrifugó inmediatamente a 10,000 rpm por 30 min. Decantar cuidadosamente el sobrenadante porque la pastilla puede ser transparente y estar ligeramente unida a la pared del tubo.
- Se lavó la pastilla de ADN con 15 ml de etanol al 70 % y centrifugar a 10,000 rpm por 10 min. Decantar cuidadosamente el sobrenadante. El etanol al 70 % remueve las sales precipitadas y el isopropanol haciendo que el ADN sea más fácil de disolver.
- La pastilla se secó abriendo el tubo de 5 a 10 minutos y se redisolvió el ADN en 200 µl de buffer TE pH 8.0 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Evitar pipetear el ADN para evitar que se rompa. Para construcciones muy grandes la resuspensión puede tomar más de 1 hora.
- Se cuantificó la concentración de ADN en un NanoDrop (ND 3300 Roche)
- Se hizo una digestión de 5 µl de ADN con Not I 10 U/µl (Promega, cat. R6435) para liberar el inserto. Utilizar de 2 a 10 veces un exceso de enzima con respecto al DNA. El sustrato de ADN va de 0.2-1.5 µg. Colocar en un tubo estéril en el siguiente orden:

H ₂ O estéril desionizada	3.65 µl
Buffer 10 X RE	1 µl
BSA acetilada 10 µg/µl	0.1 µl
ADN 1 µg/µl	5 µl
Enzima Not I 10 u/µl	0.25 µl
Vol final	10 µl

- Incubación a 37 °C de 1 a 4 horas.
- Se verificó el tamaño de inserto y cuantificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7 %, en buffer TAE1X y se tiñó con bromuro de etidio 0.5 µg/µl. Se utilizó lambda DNA ladder 0.5 µg/µl (invitrogen 15612-013).

Tamaño de sondas

- Se llevaron a cabo ensayos con enzima DNasa y ADN para obtener sondas con tamaño de 200 a 800 pb

Marcaje de sondas-“nick translation”

El ADN de PAX3 y PAX7 se marcó con dUTP naranja y FKHR dUTP verde (Vysis, cat. 30-803200). La reacción se llevó acabo de la siguiente manera:

Reactivo	µl
H ₂ O	no
Buffer 2, 10x	5
dNTP	5
dUTP	1
ADN	33
Polimerasa (5U/µl)	5
DNasa	1
Vol. final	50

Incubar la reacción a 15 °C por 1 hora.

Cultivo de leucocitos

- Se obtuvieron 3 ml de sangre periférica con jeringa heparinizada.

Los siguientes pasos se realizan en condiciones de esterilidad.

- En un tubo Falcon con capacidad de 15 ml se colocaron 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 con L-glutamina a 37 °C y 100 µl de mitógeno fitohemaglutinina. Agitar por inversión.
- Se agregaron 0.5 ml de la muestra de sangre y se agitó por inversión.
- Se incubó por 72 hrs a 37 °C.
- Después de la incubación se agregaron 30 µl de colchicina al 0.02 % y se incubó durante 30 min a 37 °C.

En los siguientes pasos no son necesarias las condiciones de esterilidad.

- Se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió con vortex.
- Se agregaron 8 ml de solución hipotónica de cloruro de potasio 75mM y se incubó por 30 min a temperatura ambiente.
- Se colocaron 0.5 ml de metanol-ac. acético 3:1 como pre-fijador. Se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Repetir este paso una vez más.
- Se colocaron 3 gotas de fijador (metanol-ac.acético) sobre un porta-objetos y se agregaron 3 gotas de cultivo de leucocitos.
- Se colocó otra gota de fijador y se colocó el porta-objetos sobre una platina a 37 °C por 1 min.
- Se colocó el porta-objetos en un vaso de Coplin conteniendo SSC 2X y se incubó por 20 min a 37 °C.

Procedimiento de FISH en sangre periférica

Se realizó la técnica de FISH sobre leucocitos en metafase para identificar los genes involucrados en las translocaciones del ARMS. El procedimiento fue el siguiente:

- Se deshidrató la muestra en etanol al 70%, 85% y absoluto 2 min en cada uno. Retirar y dejar secar.

- Se colocó en un microtubo 0.5 µl de sonda control marcada con dUTP verde (CEP X alpha, Vysis) y se mezcló con 17 µl (400 ng aprox.) de la sonda PAX3, PAX7 y FKHR. Se hizo por separado con cada uno de los genes involucrados en las translocaciones. Las sondas se mezclaron y centrifugaron.
- Hibridación: sobre la muestra se colocaron 17 µl de la mezcla de sondas, se colocó el cubre-objetos y se selló con rubber cement (Vysis, cat ROS 00044) para evitar que se seque la sonda.
- Se co-desnaturalizó en platina caliente a 71 °C por 2 min.
- Se incubó a 37 °C toda la noche.
- Con pinzas se procedió a retirar el pegamento y se quitó el cubre-objetos deslizandolo.

Lavados posthibridación (lavados de astringencia para eliminar el exceso de sonda:

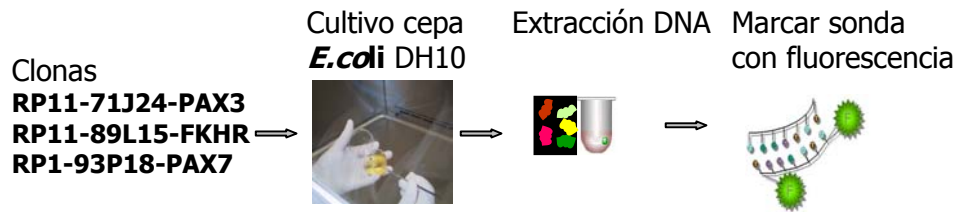
- Se lavaron los porta-objetos 2 min en la siguiente mezcla que debe estar a 73 °C y pH 7.0

SSC	0.4 %
NP-40	0.3 %
H ₂ O	

- El segundo lavado se realizó a temperatura ambiente, durante 30 segundos.

SSC	2X
NP-40	0.1%
H ₂ O	

- Transferir las muestras a un vaso de Coplin con agua destilada para eliminar las sales.
- Las muestras se dejaron secar en la oscuridad.
- Se agregaron 10 µl de DAPI III (42 ng DAPI/ml en antifade mounting solution), colocar cubreobjetos y sellar.
- Se analizaron las muestras al microscopio para lo cual se utilizó el software de FISH Applied Imaging Cytovision, y microscopio Leica DMRX.

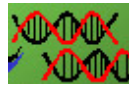


FISH

Desnaturalización



Hibridación de muestra con sonda marcada



Microscopio de fluorescencia

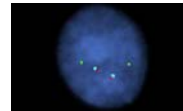


Fig. 2. Esquema simplificado del método

RESULTADOS

El crecimiento de la población bacteriana de las clonas RP1-93P18, RP11-71J24 y RP11-89L15 fue determinado mediante métodos turbidimétricos siendo en promedio para las tres clonas de 1×10^8 bacterias/ml.

A partir de este número de bacterias se obtuvo en la maxiprep 50 μg aprox. de ADN del vector recombinado.

Se obtuvieron sondas con tamaño de 200 a 800 pb utilizando una concentración de DNAsa para la clona J y P de 0.0035U/ μl , y para L de 0.008 U/ μl . (Fig. 3)

La técnica de FISH se desarrolló tres veces sobre preparaciones de leucocitos en metafase para cada una de las clonas obteniendo hibridación de las sondas con los genes PAX3, PAX7 y FKHR. (Figura 4)

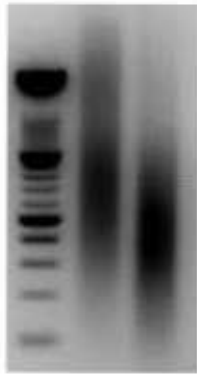


Fig. 3. Ensayos con DNasa y DNA blanco de los genes PAX3, PAX7 y FKHR para obtener sondas de 200 a 800 pb, mismas que se han marcado mediante la técnica "nick translation".

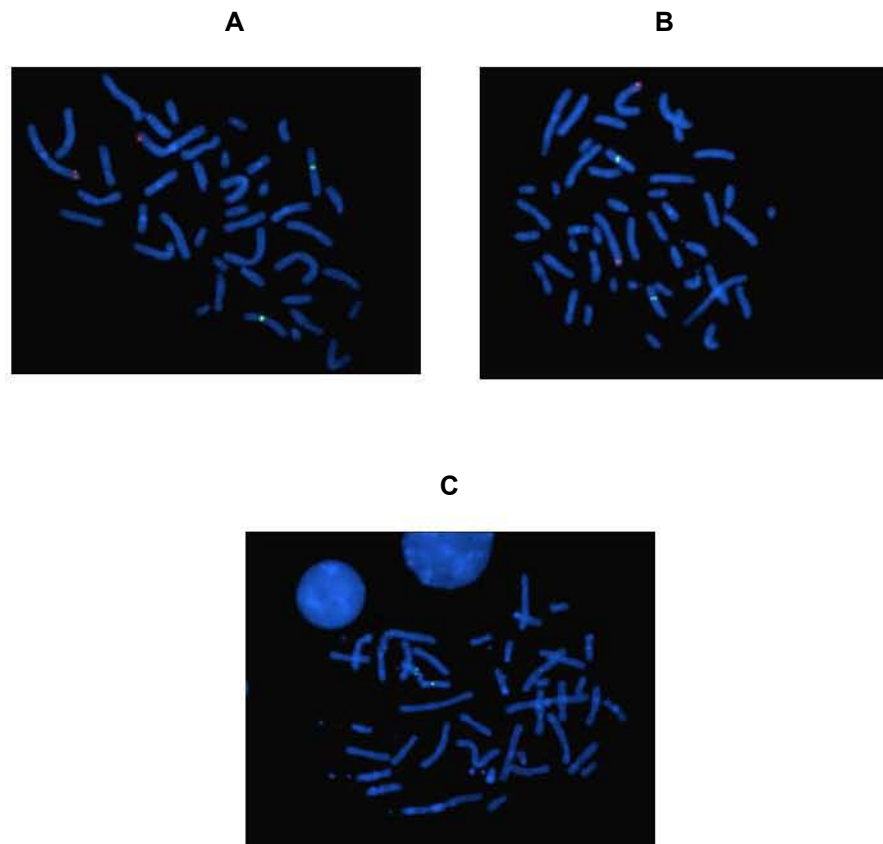


Fig. 4. Hibridación *in situ* fluorescente de:

A PAX7 cromosoma 1 (señal roja). **B.** PAX3 cromosoma 2 (señal roja). En A y B la sonda control es color verde (cromosoma X). **C.** FKHR (cromosoma 13) señal verde.

DISCUSIÓN

La clasificación histológica de los rhabdomyosarcomas del IRS representó un gran paso para predecir la supervivencia de los pacientes. El estudio molecular de estos tumores demostró diferencias importantes en la conducta biológica, en particular, de los rhabdomyosarcomas alveolares. La presencia de la translocación $t(2;13)$ ó $t(1;13)$ específicas del rhabdomyosarcoma alveolar, tienen implicación pronóstica.

El resultado de los transcriptos de fusión PAX3-FKHR y PAX7-FKHR se pueden detectar en material fresco congelado o en material fijado en formol e incluido en parafina. En 10 a 30% de los casos de rhabdomyosarcoma alveolar no se demuestra alguna de estas dos translocaciones, porcentaje que se reduce si se utilizan diferentes métodos de biología molecular, o se estudian otros genes involucrados en la patología del rhabdomyosarcoma alveolar. En nuestro laboratorio podemos practicar RT-PCR y ahora FISH para demostrar las translocaciones mencionadas. Los vectores BAC y PAC son adecuados para realizar este tipo de estudios debido a su capacidad para albergar genes completos lo que redundará en la obtención de una señal intensa. El grupo de sondas diseñadas en vectores BAC y PAC utilizadas para aplicar la técnica de FISH son confiables para llevar a cabo la determinación de translocaciones de ARMS en tejido fresco e incluido en parafina. Estas técnicas se utilizan como auxiliares para la clasificación y tratamiento de los pacientes, en casos en los cuales los rhabdomyosarcomas alveolares son poco diferenciados, con reacciones de inmunohistoquímica no concluyentes, el demostrar la presencia de las translocaciones específicas de los tumores sólidos de los niños son una herramienta invaluable para el patólogo, el oncólogo y el paciente.

La vigilancia de los niños con rhabdomyosarcoma alveolar incluye el estudio de la médula ósea, los métodos de biología molecular permiten demostrar la recaída de la enfermedad aún antes de que sea posible evidenciarla con el estudio de microscópico.

Este estudio sirve como base para realizar una serie de trabajos prospectivos con respecto al pronóstico y supervivencia de los pacientes con diferente translocación. Así como apoyar el uso de métodos no invasivos como las biopsias por aspiración con aguja fina para un diagnóstico y tratamiento oportuno de los pacientes con rhabdomyosarcomas.

CONCLUSIONES

La utilidad de los métodos de biología molecular como parte integral del diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes con diagnóstico de rhabdomioma alveolar ha sido demostrada. Aplicar estos métodos en un centro de tercer nivel es necesario por la alta especificidad y sensibilidad del método, y su importancia en la planificación óptima del tratamiento, la supervivencia y vigilancia de los pacientes. La presencia de metástasis es uno de los factores pronósticos más significativos en los pacientes con diagnóstico de rhabdomioma alveolar. La médula ósea es uno de los sitios más frecuentes de diseminación, lo que hace invaluable el estudio molecular el cual tiene una sensibilidad y especificidad más alta que el estudio histológico o citológico. En el laboratorio del Departamento de Patología del Hospital Infantil de México es posible aplicar técnicas de biología molecular como reversa transcriptasa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT_PCR) e hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asmar L, Gehan EA, Newton WA, Webber BL, Marsden HB, van Unnik AJ et al. Agreement among and within groups of pathologist in the classification of rbdmiosarcoma and related childhood sarcomas. *Cancer* 1994; 74: 2579-2588.
2. Coffin CM. The new internacional rbdmiosarcoma classification, its progenitor, and considerations beyond morphology. *Adv Anat Pathol* 1997; 4: 1-16.
3. Qualman SJ, Coffin CM, Newton WA, Hojo H, Triche TJ, Parham DM et al. Intergroup rhabdomyosarcoma study: update for pathologist. *Ped Dev Pathol* 1998; 1: 550-561.
4. Isaacs H Soft tissue tumors. En Isaacs H editor. *Tumors of the fetus and new born*. Philadelphia: WB Saunders Company 1997. p. 43-108.
5. Barr FG, Lauren EN and Hollows JC. Structural analysis of PAX3 genomic rearrangements in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet. Cytogenet* 1998; 102:32-39.
6. Fitzgerald JC, Adam MS and Barr FG. Structural analisis of PAX7 rearrangement in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 117:37-40.
7. Barr FG, Qualman SJ, Macris MH, Melnyk N, Lawlor ER, Strzelecki DM et al. Genetic heterogeneity in the alveolar rhabdomyosarcoma subset without typical gene fusions. *Cancer Research* 2002; 62:4704-4710.
8. Merlino G and Helman LJ. Rhabdomyosarcoma- working out the pathways. *Oncogene* 1999;18:5340-5348.
9. McDowell HP. Update on childhood rhabdomyosarcoma. *Arch Dis Child* 2003; 88:354-357.
10. Barr FG. Molecular genetics and patogénesis of rhabdomyosarcoma. *J. Pediatric Hematol./Oncol.* 1997; 19: 483-491.
11. Horn RC, Enterline HT. Rbdmiosarcoma: a clinicopathological study and classification of 39 cases. *Canceer* 1958; 11: 181-199.
12. Gonzalez-Crussi F, Black-Schaffer S. Rbdmiosarcoma of infancy and chilhood. Problems pf morphological classification. *Am J Srg Pathol* 1979; 3:157-171.

13. Shimada H, Newton WA, Soule EH, Beltangady MS and Maurer HM. Pathology of fatal rhabdomyosarcoma. Report from intergroup rhabdomyosarcoma study (IRS-I) and IRS-II). *Cancer* 1987; 59:459-465.
14. Weichert KA, Bove KC, Aron BS, Lampkin B. Rhabdomyosarcoma in children: A clinicopathologic study of 35 patients. *Am J Clin Pathol* 1976; 66: 692-701.
15. Knudsen AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971; 69: 820-823.
16. Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ, Emanuel BS et al. Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nature Genetics* 1993; 5: 230-235.
17. Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM et al. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20: 2676-2679.
18. Anderson J, Gordon T, McManus A, Mapp T, Gould S, Kelsey A et al. Detection of the PAX3-FKHR fusion gene in paediatric rhabdomyosarcoma: a reproducible predictor of outcome?. *Br J Cancer* 2001; 85:831-835.
19. Davis RJ, Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA and Barr FG. Fusion of PAX7 to FKHR by variant t(1;13) (p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Research* 1994; 54: 2869-2872.
20. Boman F, Brel D and Antunes L, Alhamany Z, Floquet J and Boccon-Gibod L. Gene alterations and apoptosis in rhabdomyosarcoma. *Pediatric Pathol Lab Med* 1997; 17: 233-247.
21. Barr FG. The role of chimeric paired box transcription factors in the pathogenesis of pediatric rhabdomyosarcoma. *Cancer Research* 1999; 59:1711-1715.
22. Anderson J, Renshaw J, McManus A, Carter R, Mitchell C, Adams S and Pritchard-Jones K. Amplification of the t(2;13) and t(1;13) translocations of alveolar rhabdomyosarcoma in small formalin-fixed biopsies using a modified reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1997; 150: 477-482.

23. Francesca S, Rita A, Giulio Z, Alberto G, Andrea Di C, Modesto C, et al. Results of a prospective minimal disseminated disease study in human rhabdomyosarcoma using three different molecular markers. *Cancer* 2006; 106: 1766-1775.