



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Medicina  
Hospital Infantil de México Federico Gómez.

---

# COMPARACION DE DOS METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR EN PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE RABDOMIOSARCOMA ALVEOLAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE PATOLOGO PEDIATRA  
PRESENTA:

ERI PEÑA MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS:

MC. MARÍA DEL PILAR EGUÍA AGUILAR.

ASESORES DE TESIS:

DR. JOSE MARIO PEREZPEÑA DIAZCONTI.

DR. STANISLAW W. SADOWINSKI PINE.



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO  
FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

65 AÑOS DE EXCELENCIA EN PEDIATRÍA  
Salud para las Nuevas Generaciones

MÉXICO D.F. 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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**

A todo el personal del comedor  
por poner a prueba día  
a día mi inmunidad.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

**HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO**

**“FEDERICO GÓMEZ”**

TÍTULO: COMPARACION DE DOS METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR  
EN PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE RABDOMIOSARCOMA ALVEOLAR.

TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TITULO DE:  
PATOLOGO PEDIATRA

PRESENTA  
ERI PEÑA MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. MARÍA DEL PILAR EGUÍA AGUILAR

ASESORES DE TESIS:

DR. JOSE MARIO PEREZPEÑA DIAZCONTI

DR. STANISLAW SADOWINSKI PINE



## INDICE

INTRODUCCIÓN.....	pág. 5
MARCO TEORICO.....	pág. 8
ANTECEDENTES.....	pág. 9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	pág. 12
JUSTIFICACION.....	pág. 13
OBJETIVOS.....	pág. 14
HIPOTESIS.....	pág. 15
MATERIAL Y METODOS.....	pág.16
RESULTADOS .....	pág. 23
DISCUSIÓN.....	pág. 30
CONCLUSIONES.....	pág. 33
BIBLIOGRAFÍA.....	pág. 34



## INTRODUCCION.

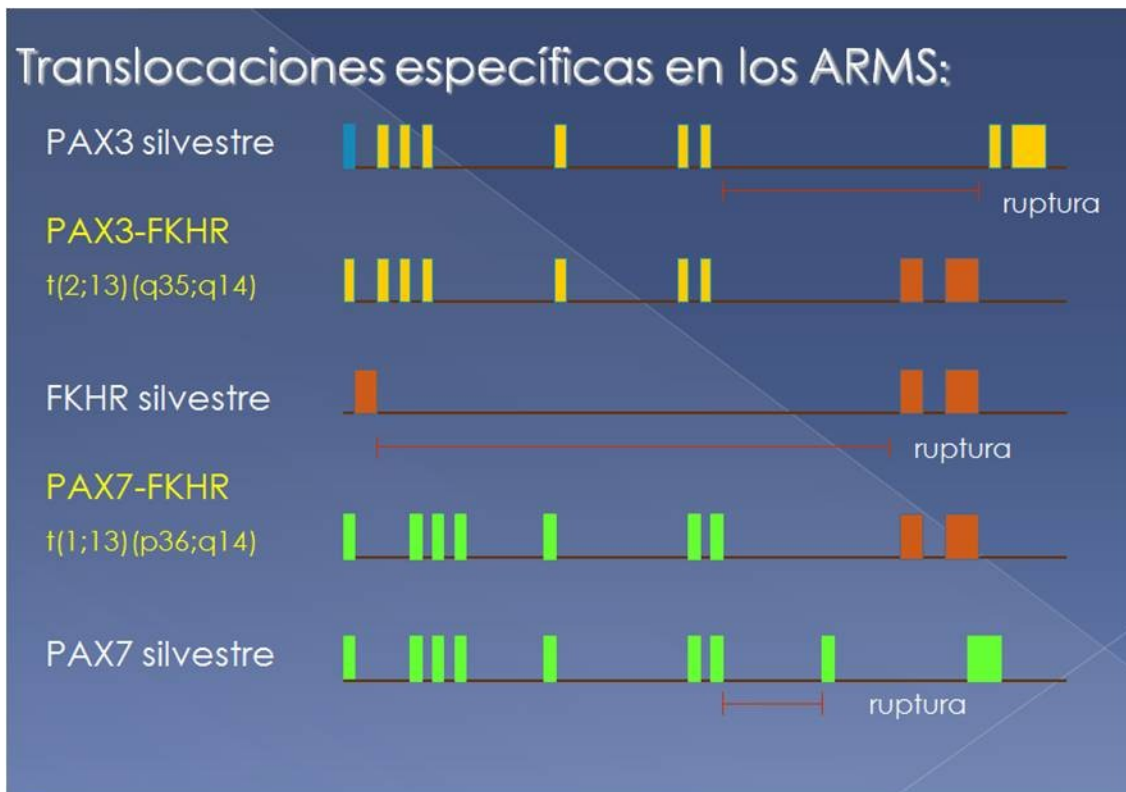
El rhabdomioma es el tumor más frecuente de tejidos blandos que se presenta en la infancia, representa del 5 al 10 % de los tumores sólidos en esa edad.<sup>1,2,3,4</sup> Basados en hallazgos histológicos se presentan dos tipos de rhabdomioma en los pacientes pediátricos, estos son el rhabdomioma alveolar y el rhabdomioma embrionario, este último se presenta con mayor frecuencia. De estos dos el rhabdomioma alveolar se caracteriza por presentar un comportamiento más agresivo, y presentar dos translocaciones específicas que son la translocación  $t(2;13)(q35;q14)$ , que se presenta en el 70% de los casos, y la translocación  $t(1;13)(p36;q14)$ , que se presenta en el 10 de los casos. Los genes afectados por estas translocaciones son PAX3 y PAX7, que se localizan en el cromosoma 2q35 y 1p36 respectivamente. Ambos se encuentran íntimamente relacionados con el desarrollo de músculo durante la embriogénesis. Cualquier alteración en el funcionamiento de estos genes puede resultar en el desarrollo de músculo anormal. Las translocaciones antes mencionadas resultan de la fusión del dominio de unión al ADN de los genes PAX3 y PAX7 con el dominio de activación transcripcional del gene FKHR, el cual se encuentra localizado en el cromosoma 13q14. La fusión de estos genes da origen a la expresión a través de transcritos quiméricos de proteínas quiméricas, las cuales activan la transcripción del sitio de unión PAX con una alta potencia más que la correspondiente al tipo silvestre.<sup>5,6,7</sup> El restante 20% aproximado de rhabdomiomas alveolares son negativos para estas



translocaciones, forman un grupo más heterogéneo, poco explorado, en el cual la clasificación es ambigua. En estos casos el diagnóstico diferencial con los rhabdomyosarcomas embrionarios se basa en métodos clásicos tales como la histología, por lo que permanecen aún como un reto debido a la ausencia de marcadores inmunohistoquímicos específicos, así como de ultraestructura.<sup>7</sup> Estos genes pueden ser utilizados como marcadores diagnósticos únicos para los rhabdomyosarcomas alveolares, motivo por el cual se utilizan diversas técnicas de biología molecular tales como la transcripción reversa-reacción en cadena polimerasa (RT-PCR), y la hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Ambas pueden ser utilizadas para determinar el tipo de translocación presente, que llega a tener una correlación con el diagnóstico histopatológico hasta del 95 %.<sup>8</sup> La técnica de RT-PCR utilizando cortes de tejido fijado en formol e incluido en parafina tiene aplicación para detectar transcripciones quiméricas de manera confiable y con alta sensibilidad y especificidad diagnóstica. Sin embargo, algunas veces el ARN mensajero (ARNm) aislado, no es de la calidad que se requiere para amplificar las fusiones de los genes, y estudios adicionales como el FISH pueden ser de utilidad para esclarecer la naturaleza de resultados inesperados o erróneos<sup>23</sup>. Finalmente, el tejido fijado en formol incluido en parafina representa una importante fuente de material biológico para realizar estudios retrospectivos, cuando la muestra del tumor es pequeña o en casos donde no hay tejido congelado.<sup>9,10</sup> Un diagnóstico oportuno, así como la referencia a un centro especializado son de vital importancia para una mejor



calidad de vida para los pacientes. La supervivencia ha mejorado de manera importante en los últimos diez años.<sup>11</sup>



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





## MARCO TEORICO CONCEPTUAL

Los rhabdomyosarcomas pertenecen a una familia de sarcomas de tejidos blandos que muestran evidencia de diferenciación a musculo esquelético, tanto por el inmunofenotipo, como ultraestructuralmente. Estos tumores surgen como resultado de una pérdida en el control de crecimiento y de diferenciación a células miogénicas. Las translocaciones cromosómicas son alteraciones genéticas consistentes, específicas, que se comparte en varios tipos de sarcomas y otras neoplasias. En cada translocación se yuxtaponen dos genes para crear un gen quimérico que codifica una proteína de fusión, las cuales presentan actividad oncogénica. Esto último ha sido motivo de varias investigaciones, sin embargo los mecanismos por los cuales el *loci* de cromosomas separados se yuxtaponen y re-arreglan en la tumorigénesis son aun desconocidos. Mediante el ensayo de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se ha demostrado que el exón 7 de PAX3 se fusiona consistentemente con el exón 2 de FKHR en el transcrito quimérico PAX3-FKHR. En el caso de PAX7-FKHR se fusiona el exón 7 de PAX7 con el exón 2 y 3 de FKHR.<sup>6,11.</sup>



## ANTECEDENTES

En 1958 Horn y Enterline<sup>13</sup> 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.<sup>14,15,16</sup> 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 una 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.<sup>2</sup> 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 Knudson en 1971<sup>17</sup> 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 %<sup>14,15</sup>, 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.<sup>18</sup> 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.<sup>19</sup> Por su parte Anderson reportó 40 % en PAX3-FKHR, 8.7% PAX7-FKHR y 50 % sin translocación.<sup>20</sup> Ambas han sido asociadas únicamente con rhabdomiomas 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.<sup>12</sup>



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Actualmente se cuenta con las técnicas de RT-PCR y FISH en el Departamento de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, las cuales se han utilizado para la detección de alteraciones cromosómicas en diferentes tipos de neoplasias. Los rhabdomyosarcomas presentan translocaciones características que se pueden detectar por ambas técnicas. Es importante conocer la presencia de dichas translocaciones, debido a implicaciones tanto diagnósticas como de pronóstico. Lo cual implica un mayor costo. Por lo anterior es necesario conocer las ventajas y desventajas de cada una de estas técnicas.



## JUSTIFICACION

Los rhabdomyosarcomas alveolares 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 rhabdomyosarcomas alveolares 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. Por lo tanto, comparar ambas técnicas nos permite conocer el costo-beneficio de cada una.



## **OBJETIVO**

### **-GENERALES**

Comparar la técnica de FISH con RT-PCR a través de la determinación del tipo de translocación presente en rhabdomiomas alveolares.

### **-PARTICULARES**

Estandarizar la técnica de FISH y RT-PCR en rhabdomiomas alveolares a partir de muestras de tejido incluido en parafina.

Determinar la sensibilidad de la técnica de FISH y RT-PCR.



## **HIPOTESIS**

La técnica de FISH presenta una sensibilidad superior a la técnica de RT-PCR, en tejido fijado en formol e incluido en parafina debido a que el ADN es más estable que el ARN utilizado para la RT-PCR.





## **MATERIAL Y METODOS**

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 histopatológico de rhabdomyosarcoma alveolar.
- 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.



## **Características de los pacientes y muestras.**

Se seleccionaron 30 muestras de tejido fijado en formol e incluido en parafina de los archivos del Departamento de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, diagnóstico de Rabdomiosarcoma alveolar. Dos observadores verificaron el diagnóstico histopatológico mediante un corte teñido con hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica con los marcadores: vimentina, desmina, miogenina, WT-1, MyoD1 y CD34. Cada caso fue registrado con un número progresivo sin ninguna información del paciente. Los datos clínicos tales como edad, género, localización del tumor, estadio clínico y sobrevida, fueron recabados de los expedientes clínicos de los pacientes.

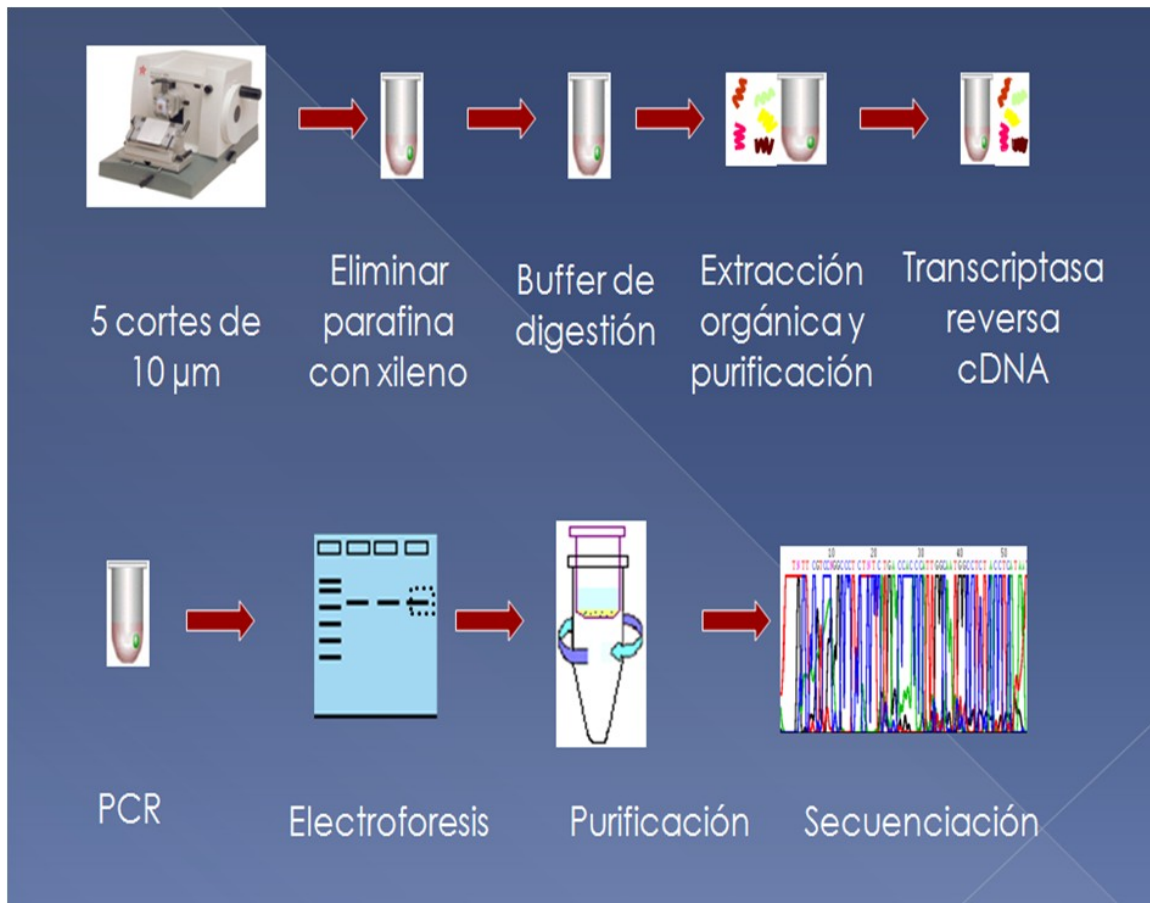
## **Extracción del ARN**

La extracción del ARN se realizó en cinco cortes de 10  $\mu\text{m}$  de tejido fijado en formol e incluido en parafina según la técnica descrita por Bonin *et al* (2003). Los cortes fueron colocados en microtubos y se eliminó la parafina con xilol y lavado en etanol absoluto. Posteriormente el tejido se incubó en una solución de lisis que contenía 500  $\mu\text{g/ml}$  de proteinasa-K, 1% de SDS, 20 mmol/Lt de Tris-HCl (pH 7.8), todo preparado en agua libre de ribonucleasas. Después de aproximadamente 35 h de digestión a 42°C, en la solución de lisis, el ARNm fue obtenido mediante una mezcla de fenol-cloroformo y precipitado en isopropanol, posteriormente se resuspendió en 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de ribonucleasas.



## **Análisis de RT-PCR.**

Con la misma metodología se obtuvo ARN de los controles positivos derivados de dos líneas celulares incluidas en parafina, la CW 9019 para la t(1;13) y la RH28 para la t(2;13), ambas donadas por el Dr. Frederic Barr (Departamento de Patología, Universidad de Pennsylvania, E.U.A.). La secuencia de los oligonucleotidos utilizados para amplificar la t(2;13) fue: PAX3 5'-GCTATACAGACAGCTTPGT-3' y FKHR1 5'-TCCAGTTCCTTCATTCTGCA-3'. Para de la t(1;13) fue: PAX7 5'-GCTTCTCCAGCTACTCTGAC-3', FKHR2 5'-CTCTGGATTGAGCATCCACC-3'. La expresión de de la fosfo-glicerato cinasa, PGK, fue utilizada como un control positivo para la presencia de ARN amplificable. Las secuencias del oligonucleotido son: PGKf 5'-CAGTTTGGAGCTCCTGGAAG-3', y PGKr 5'-TGCAAATCCAGGGTGCAGTG-3'. Para la reacción de RT-PCR se utilizo el kit Titan (Roche). La amplificación inicial fue de 50 °C por 30 minutos y 94 °C, dos minutos. Posteriormente fueron 40 ciclos a 94 °C un minuto, 60 °C un minuto, 68 °C 45 segundos, y extensión final de 68 °C por 7 minutos. Se tomaron 15µL del producto de la PCR y se fraccionaron en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio. El tamaño de los productos amplificados fue de 185 pb y 147 pb, para la identificación de las t(1;13) y t(2;13), respectivamente. El tamaño de la amplificación del gen PGK fue de 247 pb. Todos los fragmentos amplificados fueron secuenciados y las translocaciones fueron confirmadas.



**Diagrama de flujo para el proceso de RT-PCR.**



### **Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH).**

Se diseñaron tres sondas a partir de clonas con vectores BAC (cromosoma artificial bacteriano) y PAC (cromosoma artificial derivado de P1). Las clonas utilizadas fueron **RP11-71J24** para PAX3, **RP11-89L15** para FKHR y **RP1-93P18** para PAX7<sup>21</sup>. Los insertos de 174 kb de PAX 3 y FKHR fueron clonados en pBACe3.6. Para PAX7 el inserto de 110 kb fue clonado en pCYPAC2. Las clonas fueron obtenidas de una genoteca humana BACPAC (Resources Center at Children's Hospital Oakland Research Institute). Se realizó FISH en dos colores, los genes PAX3 y PAX7 se marcaron con dUTP naranja y FKHR con dUTP verde. Se marcó 1 µg de DNA de cada sonda con la técnica nick translation. Los protocolos fueron realizados de acuerdo con Nishio *et al* con algunas modificaciones.<sup>21</sup> La preparación de los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina fue la siguiente: se utilizaron cortes de tejido tumoral de 4 µm de grosor y se colocaron en laminillas cargadas positivamente, para eliminar la parafina se mantuvieron los cortes toda la noche a 60 °C y posteriormente fueron desparafinadas en citrisolv. El tejido fue deshidratado en alcohol absoluto por cinco minutos, en dos ocasiones a temperatura ambiente. Posteriormente las laminillas se colocaron 20 minutos en HCl 0.2 N. De manera sucesiva se lavaron con agua bidestilada y amortiguador de lavado ( Vysis 32-801200). Las laminillas fueron incubadas en solución de pre-tratamiento (Vysis 32-801200) por 20 minutos a 37°C. Luego fueron lavadas en amortiguador y se dejaron secar. A continuación se colocaron en formalina amortiguada al 10% por 10 minutos, lavadas con agua destilada y deshidratadas. Para la hibridación se mezcló buffer de hibridación LSI/WCP (Vysis 32-3804826) con 200 a 400 ng de cada sonda. Se



colocó el cubreobjetos y se selló con cemento IRIS (pegamento artístico). En este momento se realizó la codesnaturalización a 72 °C por 5 minutos. Las muestras se dejaron incubando en una caja humidificada a 37 °C por un mínimo de 20 horas. Para realizar el procedimiento de post-hibridación, las laminillas fueron inmersas primero en 2XSSC/0.3 % NP-40 a 73°C dos minutos, luego en 2XSSC/0.1 % NP-40 a temperatura ambiente por un minuto. Finalmente, se tiñeron los núcleos con medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector H-1200), las laminillas fueron analizadas en un microscopio Leica DMRX, se tomaron fotografías con el software FISH Applied Imaging Cytovision. Se incluyó como control positivo de la técnica la sonda CEP 8 spectrum aqua (Vysis cat. 32-131008), controles positivos de las dos translocaciones y control negativo de tejido muscular esquelético. Las señales de hibridación fueron analizadas en 100 núcleos en interfase. La muestra fue interpretada como positiva si las señales para los genes PAX3 o PAX7 (naranja) se encontraban fusionadas con las señales de la sonda para el gen FKHR (verde) en más de 10 % de los núcleos evaluados.



**Diagrama de flujo para el diseño de sondas y realización de FISH.**



## RESULTADOS

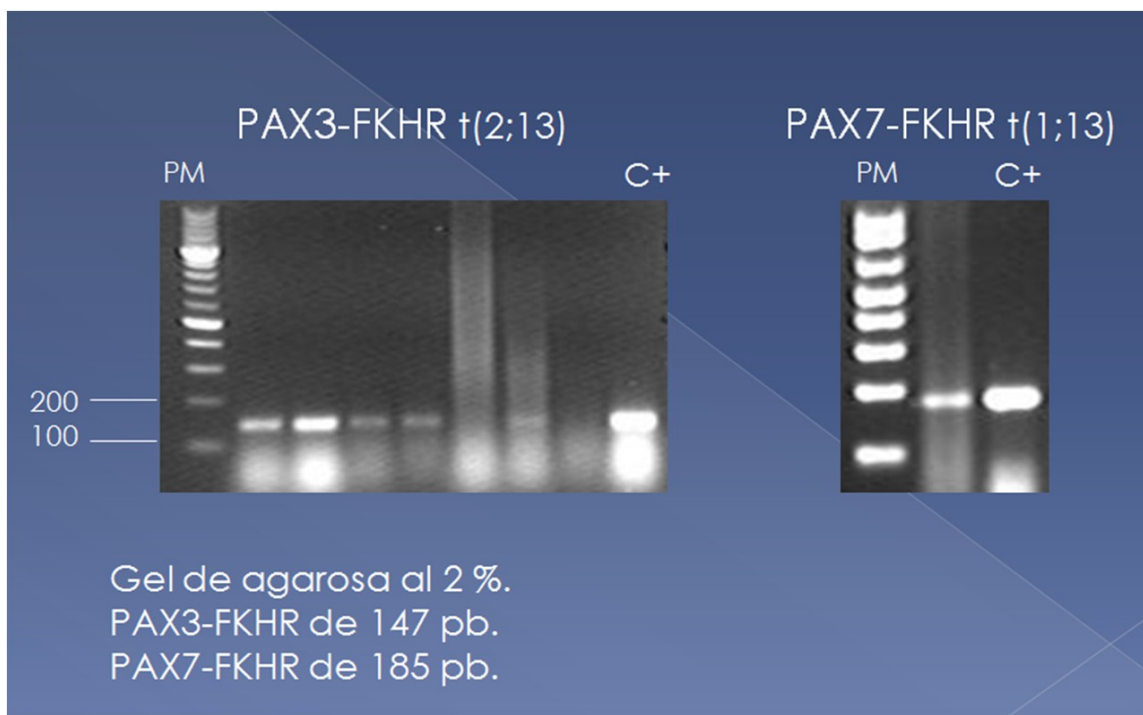
Con la técnica de RT-PCR se encontraron 15 tumores (50 %) con la translocación t(2;13)/PAX3-FKHR, uno (3 %), con la translocación t(1;13)/PAX7-FKHR, nueve casos (30 %) con ninguna de las dos translocaciones. En cinco muestras (17 %) no se pudo obtener ARN amplificable (Tabla 1). Algunas de las muestras ensayadas mediante RT-PCR son mostradas en la Figura 1. El bloque de parafina con mayor antigüedad del cual se obtuvo RNA de buena calidad fue de 15 años. Por otro parte el análisis con FISH de estas muestras mostró resultados importantes (Tabla 1), hubo 19 tumores (63 %) con la translocación t(2;13)/PAX3-FKHR; contra 15 (50 %) observados mediante RT-PCR, un caso (3 %) con la translocación t(1;13)/PAX7-FKHR; y diez casos (33 %) con ninguna de las dos translocaciones. Es importante recalcar que la sensibilidad del estudio de FISH reveló cuatro casos con la translocación t(2;13)/PAX3-FKHR y un caso con ninguna de las translocaciones. Estos casos no se pudieron evaluar por RT-PCR debido a que el ARN estaba degradado. Las señales producidas por cada sonda en el FISH fueron óptimas para realizar el análisis (Figura 2). Las muestras se consideraron como positivas cuando se observó una señal naranja yuxtapuesta con una señal verde. Con estos resultados es importante hacer notar que la técnica de FISH puede complementar los análisis de RT-PCR, además de ser una herramienta útil en la identificación de las translocaciones características de los rhabdomyosarcomas alveolares.



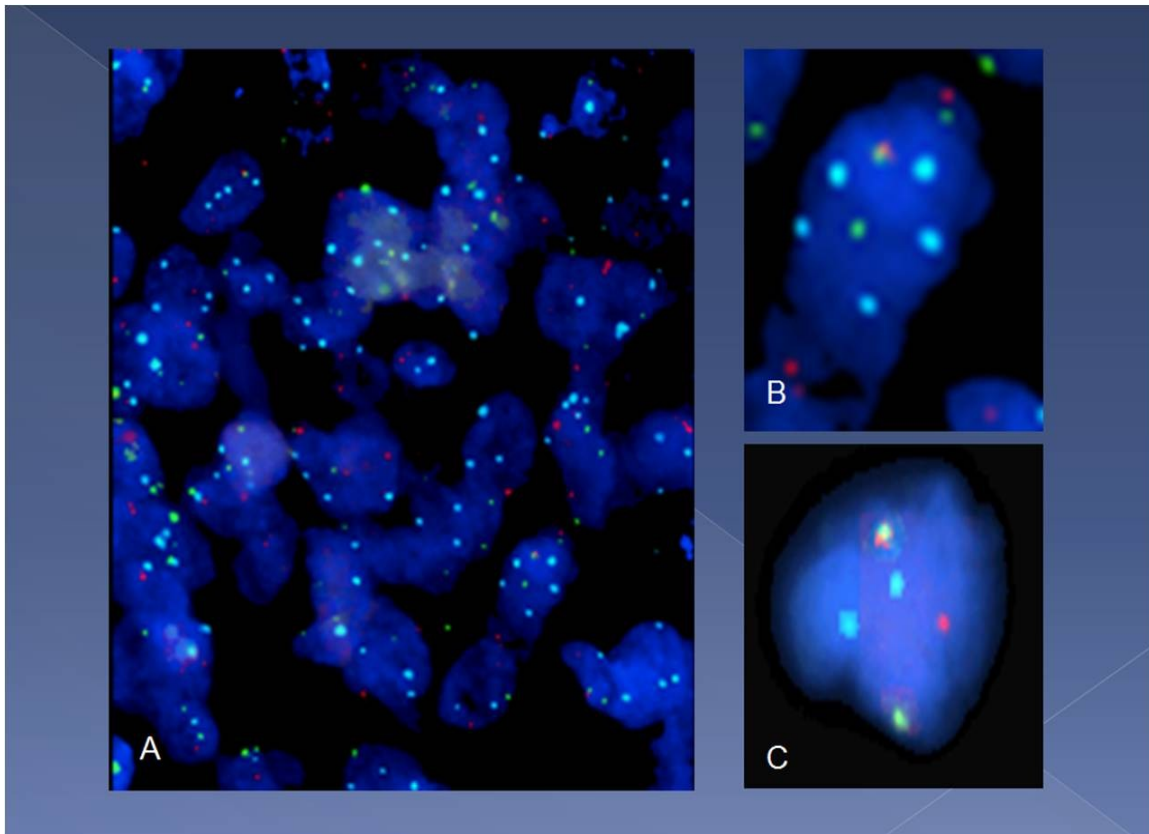


	PAX3-FKHR		PAX7-FKHR		NINGUNA		NO VALORABLE	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
RT-PCR	15	(50)	1	(3)	9	(30)	5	(17)
FISH	19	(63)	1	(3)	10	(31)	0	(0)

**TABLA 1.** Estado de fusión de los genes de los 30 rabdomiosarcomas alveolares analizados.



**FIG 1.** Electroforesis en gel de agarosa mostrando la amplificación de los productos por RT-PCR de fusión de genes PAX3-FKHR y PAX7-FKHR. Del lado izquierdo se observa la escalera molecular del ADN con los tamanos indicados. Cada columna ilustra un caso diferente (paciente). La columna del extremo derecho corresponde al control positivo.



**FIG 2. A.** FISH realizado en tejido fijado en formol e incluido en parafina donde se observan las señales de las sondas en diferentes colores, el gen FKHR en color verde, el gen PAX3 en naranja y la región del centrómero del cromosoma 8 en azul, 100 X. **B.** Acercamiento del campo seleccionado en **A** donde se observa mejor la señal de las 3 sondas mostrando la translocación t (2;13), PAX3-FKHR. **C.** Muestra de otro paciente donde se vuelve a evidenciar la t(2;13), 100.



Se realizó una correlación entre la presencia o ausencia de las translocaciones características, y varios datos clínicos de los pacientes (Tabla 2). Debido a que hubo un solo caso con la translocación t(1;3)/PAX3-FKHR no fue posible establecer ninguna correlación. Hubo una tendencia entre la presencia de la translocación t(2;13)/PAX3-FKHR en pacientes mayores, con una media de 9 años, la presencia de ninguna de las dos translocaciones en paciente menores, con una media de 4 años ( $p < 0.05$ ). Las localizaciones más frecuentemente observadas fueron cabeza y cuello, y extremidades. Con respecto a la localización del tumor no se encontró correlación entre la presencia de de la translocación t(2;13), ni tampoco de los caos con ninguna de las dos translocaciones. La presencia de la translocación t(2;13) se asocio a pacientes mayores y a un estadio más avanzado. Los pacientes de menor edad presentaron tumores con ninguna de las translocaciones, y en esta serie los pacientes se presentaron en un estadio clínico más avanzado.



	GEN	EDAD		PROM	SITIO				ESTA	ESTA
	ERO			EDIO					DIO	DIO
	H/M	≤ 6	>7	EDAD	H	G	E	T	I y II.	III y IV.
<b>t(2;13)</b>	11/8	7	12	9	7	4	6	2	6	13
<b>t(1;13)</b>	0/1	1	0	5	-	1	-	-	-	1
<b>Ninguna</b>	6/4	8	2	4	5	1	3	1	0	10

**TABLA 2.** Correlación entre los rasgos clínicos con las translocaciones características y los casos con ausencia de estas translocaciones. M: hombre, f: mujer, H: cabeza y cuello, G: genitourinario, E: extremidad y T: tronco.



Finalmente, se realizó un análisis de la sobrevida con el fin de evaluar si tipo de la translocación presenta alguna influencia en la sobrevida de los pacientes. Los pacientes con presencia de la translocación t(2;13) comparados con los que no presentaron ninguna de las translocaciones características tuvieron una sobrevida menor ( $p < 0.0001$ ). Por lo tanto, hay un efecto negativo en la sobrevida en general en pacientes con presencia de la translocación t(2;13), como se ha reportado en otros estudios.



## DISCUSION

La prioridad de este estudio fue revelar la presencia de algún tipo de translocación descrita en los rhabdomiomas alveolares por dos técnicas de estudio molecular (RT-PCR y FISH) en fijado en formol e incluido en parafina. Además, conocer si los pacientes hispanos presentan las mismas correlaciones descritas en otras series con pacientes anglosajones. Los resultados mostraron una sensibilidad del 100 % con la técnica de FISH para identificar las translocaciones en los rhabdomiomas alveolares. Esta sensibilidad fue reportada por McManus *et al* en 1996 para detectar la translocación t(2;13) en los rhabdomiomas alveolares.<sup>9</sup> En este estudio con la técnica de FISH detectaron más casos que con análisis cariotípico. El potencial de la técnica de FISH fue demostrada también por Biegel *et al* en 1995.<sup>22</sup> Fritsch *et al* (2003) fueron los primeros en describir la aplicación de la técnica de FISH en material fijado en formalina.<sup>23</sup> Encontraron que la técnica de FISH es útil en aquellos casos en los que la técnica de RT-PCR muestra resultados dudosos. En este estudio se observó una situación semejante debido a que con la técnica de FISH se detectaron cinco casos que por RT-PCR no se pudieron valorar debido a una deficiente calidad de ARN de la muestra. Las sondas de FISH utilizadas en este estudio fueron descritas por Nishio y col. quienes demostraron que son confiables y altamente específicas para identificar t(1;13) y t(2;13) en tejido procesado de manera rutinaria, y para diferenciar a los rhabdomiomas alveolares de otros tumores de células redondas pequeñas y azules. También



demonstraron que la técnica de FISH puede ser una prueba más sensible que la técnica de RT-PCR para identificar nuevas translocaciones, con este método se identificaron rupturas en el gen FOXO1, pero no en el gen PAX. La mayor estabilidad del ADN con respecto al ARN puede ser una propiedad importante que permite mayor sensibilidad del FISH para detectar este tipo de translocaciones en los rhabdomiomas.<sup>24</sup>

Los primeros estudios que abordaron la identificación de translocaciones por RT-PCR fueron realizados en tejido fresco. El potencial para realizar estudios retrospectivos identificando las translocaciones t(2;13) y t(1;13) en tejido fijado con formol e incluido en parafina realizado por Edwards et al (1997), ellos tuvieron una sensibilidad de 93 % en tejido en parafina, contra 100 % en tejido congelado.<sup>25</sup> Esta alta sensibilidad fue reportada por otros como Chen *et al* y Jin *et al*.<sup>26,27</sup> El estudio de Jin et al (2003) menciona que si se trabaja con tejido incluido en parafina se necesitan de 200 a 1000 células para poder amplificar e identificar algún tipo de translocación. Lo cual contrasta con la detección de esta fusión de genes en por lo menos 50 células en cortes congelados. Esto en parte explica las diferencias observadas en la sensibilidad reportada en tejido fijado en formol e incluido en parafina fijado con formalina. En el presente estudio identificamos la fusión de genes en el 50% de los casos, y de acuerdo con los resultados de la amplificación del gen PGK, el ARN de cinco muestras no fue óptimo para desarrollar la técnica. Mediante la técnica de RT-PCR obtuvimos 50 % de casos positivos para la translocación t(2;13) lo que





es comparable con el 55% reportado por Sorensen *et al.*<sup>19</sup> Sin embargo, hay un amplio rango de variación desde el 40% reportado por Anderson *et al.*, al 71% reportado por Barr *et al.*<sup>20,26</sup> En este trabajo reportamos 31 % de casos sin ninguna traslocación con la técnica de RT-PCR, que es comparable con el 23 % reportado por Sorensen *et al.*<sup>19</sup> Sin embargo hay una amplia variación que va del 10 % reportado por Barr *et al.*, al 50 % reportado por Anderson *et al.*<sup>20,28</sup> Los casos negativos representan otro grupo donde posiblemente existen nuevos rearrreglos, como el demostrado por Wachtel *et al.* quienes describen una nueva translocación t(2;2)/PAX3-NCOA1.<sup>29</sup> NCOA1 es un receptor nuclear que posee propiedades de transactivación similares a las de la fusión PAX3-FKHR. Otra nueva translocación fue reportada por Barr *et al.* en la que el gen PAX3 o PAX7 se fusionan al gene AFX, que es similar en estructura y función al gen FKHR.<sup>7</sup> Por otro lado, se ha descrito recientemente un rearrreglo en rhabdomyosarcomas embrionarios y se ha identificado una translocación novedosa que afecta al cromosoma 2q35, el cual es el locus del gen PAX3, pero el gen compañero en este rearrreglo aun debe ser descrito.<sup>30</sup>

En el presente estudio se observó una relación entre la edad y el tipo de translocación que fue consistente con la asociación previamente descrita por Anderson y col.<sup>20</sup> Estos autores mencionan que la fusión PAX3-FKHR se presenta en niños mayores de 7 años (63%), con una edad promedio de 9 años y un estadio mayor de enfermedad (68%).<sup>20</sup> Su estudio describió una edad promedio de 9 años y el 63 % de los casos con estadio III y IV, muy similar a



nuestros resultados. Lo cual contrasta con los resultados obtenidos por Barr *et al.*<sup>28</sup> ellos documentaron la fusión de PAX3 en pacientes con mayor edad (43 %), pero 66 % en un estadio más avanzado. En los pacientes menores (4 años en promedio) no se reporto ninguna de las translocaciones, (80 %), pero en el 100 % de los casos en estadio más avanzado. Nuestros resultados se correlacionan únicamente con el reporte de Anderson *et al.*<sup>20</sup> donde los casos con ninguna translocación se observaron en pacientes menores con una edad promedio de 4 años (72 %), lo cual se compara con el 69 % reportado por Barr *et al.*<sup>28</sup> Los casos positivos para la translocación t(2;13) se asociaron a pacientes mayores y con un mayor estadio clínico. Los casos sin translocación correspondieron a pacientes menores, también con un estadio clínico mayor. Esto se puede deber a la atención medica del paciente que es diagnosticado en un estadio clínico más avanzado en nuestro país.



Podemos concluir que la técnica de FISH tiene una sensibilidad de 100 % para identificar algún tipo de translocación o ninguna translocación en los casos de rabadomiosarcoma alveolar en tejido fijado en formol e incluido en parafina, y puede complementar los resultados obtenidos mediante la técnica de RT-PCR.



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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 rhabdomyosarcoma and related childhood sarcomas. *Cancer* 1994; 74: 2579-2588.
2. Coffin CM. The new international rhabdomyosarcoma 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 analysis 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. Mc Manus A P, O'Reilly M A, Jones K P, Gusterson B A, Mitchell C D, Pinkerton C R, Shipley J M. Interphase fluorescence in situ hybridization detection of t(2;13)(q35;q14) in alveolar rhabdomyosarcoma –a diagnostic tool in minimally invasive biopsies. *Pathol* 1996; 178: 410-414.
10. Edwards R H, Chatten J, Xiong Q B, Barr F G. Detection of gene fusions in rhabdomyosarcoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay of archival samples. *Diagn Mol Pathol* 1997; 6: 91-97.
11. McDowell HP. Update on childhood rhabdomyosarcoma. *Arch Dis Child* 2003; 88:354-357.
12. Barr FG. Molecular genetics and pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *J. Pediatric Hematol./Oncol.* 1997; 19: 483-491.
13. Horn RC, Enterline HT. Rhabdomyosarcoma: a clinicopathological study and classification of 39 cases. *Cancer* 1958; 11: 181-199.



14. Gonzalez-Crussi F, Black-Schaffer S. Rhabdomyosarcoma of infancy and childhood. Problems of morphological classification. *Am J Surg Pathol* 1979; 3:157-171.
15. 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.
16. 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.
17. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971; 69: 820-823.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Nishio J, Althof P A, Bailey J M, Zhou M, Neff J R, Barr F G, Parham D M, Teot L, Qualman S J, Bridge J A. Use of a novel FISH assay on paraffin-embedded tissues as an adjunct to diagnosis of alveolar rhabdomyosarcoma. *Lab Invest* 2006; 86: 547-556.
22. Biegel J A, Nycum L M, Valentine V, Barr F G, Shapiro D N. Detection of the  $t(2;13)(q35;q14)$  and PAX3-FKHR fusion in alveolar rhabdomyosarcoma by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 12: 186-192.
23. Fritsch M K, Bridge J A, Schuster A E, Perlman E J, Argani P. Performance characteristics of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of tumor-specific transcripts from archival tissue. *Pediatr Dev Pathol* 2003; 6: 43-53.
24. Mehra S, de la Roza G, Tull J, Shrimpton A, Valente A, Zhang S. Detection of FOXO1 (FKHR) gene break-apart by fluorescence in situ hybridization in formalin-fixed, paraffin-embedded alveolar rhabdomyosarcoma and its clinicopathologic correlation. *Diagn Mol Pathol* 2008; 17: 14-20.
25. Reichmuth C, Markus M A, Hillemanns M, Atkinson M J, Unni K K, Saretzki G, Höfler H. The diagnostic potential of the chromosome



- translocation t(2;13) in rhabdomyosarcoma: a PCR study of fresh-frozen and paraffin-embedded tumour samples. *J Pathol* 1996; 180: 50-57.
26. Chen B F, Chen M L, Liang D C, Huang Y W, Liu H C, Chen S H. Detection of PAX3-FKHR and PAX7-FKHR fusion transcripts in rhabdomyosarcoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using paraffin-embedded tissue. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1999; 62: 86-91.
27. Jin L, Majerus J, Oliveira A, Inwards C Y, Nascimento A G, bugart A G, Lloyd R V. Detection of fusion gene transcripts in fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections of soft-tissue sarcomas after laser capture microdissection and RT-PCR. *Diagn Mol Pathol* 2003; 12: 224-230.
28. Barr, F G, Smith L M, Lynch J C, Strzelecki D, Parham D M, Qualman S J, Breitfeld P P. Examination of gene fusion status in archival samples of alveolar rhabdomyosarcoma entered on the intergroup rhabdomyosarcoma study-III trial. *J Mol Diag* 2006; 8: 202-208.
29. Wachtel M, Dettling M, Koscielniak E, Stegmaier S, Treuner J, Simon-Klingenstein K, Bühlmann P, Niggli F K, Schäfer B W. Gene expression signatures identify rhabdomyosarcoma subtypes and detect a novel t(2;2)(q35;p23) translocation fusing PAX3 to NCOA1. *Cancer Res* 2004; 64: 5539-5545.





30. Hosoi H, Kakazu N, Konishi E, Tsuchihashi Y, Hada S, Amaya E, Nakabayahi Y, Misawa-Furihata A, Tabata-Maruyama H, Iehara T, Sugimoto T, Yamane H, Yamasaki M, Shiwaku K, Yanagisawa A, Ono M, Tokiwa K, Iwai N, Hashiba M, Abe T, Sawada T. A novel PAX3 rearrangement in embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2009 Mar; 189(2):98-104.