



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD. HOSPITAL DE PEDIATRÍA
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE ONCOLOGO PEDIATRA

TITULO

**FACTORES PRONOSTICOS, CLINICOS Y MOLECULARES, ASOCIADOS A LA SOBREVIVENCIA
SARCOMA DE EWING. EXPERIENCIA DE DIEZ AÑOS.**

PRESENTA

TESISTA: ANA BERENICE AGUILAR ROMÁN¹

TUTOR: JAVIER ENRIQUE LOPEZ AGUILAR²

ASESOR METODOLOGICO: DRA. ANA CAROLINA SEPULVEDA VILDOSOLA³

COLABORADORES: DRA. GEORGINA SIORDIA REYES⁴

1. MEDICO RESIDENTE DE SEGUNDO AÑO DE LA SUBESPECIALIDAD EN ONCOLOGIA PEDIATRICA UMAE PEDIATRIA
2. JEFE DE SERVICIO ONCOLOGIA PEDIATRICA UMAE PEDIATRIA
3. JEFE DE SERVICIO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN SALUD UMAE PEDIATRIA
4. MEDICO PATOLOGO ADSCRITO AL SERVICIO DE PATOLOGIA UAME PEDIATRIA.



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.

INDICE

Resumen estructurado.....	3
Marco teórico.....	5
Justificación.....	13
Planteamiento del problema.....	14
Pregunta de investigación.....	14
Hipótesis.....	14
Objetivos.....	15
Material y métodos.....	15
Variables.....	16
Tabla de variables.....	17
Análisis estadístico.....	18
Factibilidad del estudio.....	18
Descripción general del estudio.....	18
Resultados.....	20
Discusión.....	28
Conclusiones	32
Anexos	33
Referencias.....	37

RESUMEN ESTRUCTURADO

Título. Factores pronósticos, clínicos y moleculares, asociados a la sobrevida Sarcoma de Ewing. Experiencia de diez años.

Introducción. El Sarcoma de Ewing representa el tumor óseo maligno que ocupa el segundo lugar en la edad pediátrica. Es parte de una familia de neoplasias, todas ellas indiferenciadas en diferentes grados, con una expresión fenotípica múltiple pero con una alteración génica en la que se afecta el gen EWS (cromosoma 22q12). Se conoce muy poco acerca de los factores etiológicos relacionados con estos tumores así como del comportamiento biológico del mismo. El estudio de factores pronósticos es importante tanto a nivel morfológico como genético y de biología molecular. En la actualidad los factores pronósticos que se han asociado a la sobrevida son la localización y extensión de la enfermedad. Sin embargo pese a los logros obtenidos en el tratamiento de estos tumores, su pronóstico continúa siendo sombrío, más aun en el tipo metastásico, en el que la sobrevida no rebasa el 30%. Recientemente se ha iniciado el estudio de marcadores tumorales en este tipo de tumores, siendo el Ki67, el p53 y el HER-2 los que se han relacionado con el comportamiento biológico de la enfermedad así como la respuesta al tratamiento y sobrevida de estos pacientes.

Objetivos. Determinar cuáles son los factores clínicos y moleculares que influyen en la respuesta al tratamiento y sobrevida en pacientes con Sarcoma de Ewing.

Material y métodos. Lugar de realización. Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional SXXI. Servicio de Oncología, laboratorio de investigación.

Tipo de estudio. Se realizó un estudio retrospectivo, longitudinal, descriptivo, observacional en el que se incluyeron a todos los pacientes con Sarcoma de Ewing en el periodo comprendido entre el 1° de Enero del 2000 al 1° de Enero de 2010.

Resultados. Se estudiaron 34 pacientes, 61.8% fueron hombres (n=21) y 38.2% mujeres (n=13), la relación hombre mujer fue 1:1.6, con una media de edad de 11 años (3-17 años).

Del total de pacientes, el 23.5% están vivos (n=8) y el 76.5% (n=26) muertos. El 82% presentó enfermedad metastásica al diagnóstico, y 17.6% enfermedad localizada, los sitios de metástasis fueron en orden de presentación: pulmón 67% (n=23), sistema nervioso central 17.6% (n=6) y hueso en 8.8% (n=3). Se observó que de los 26 pacientes con metástasis pulmonares al diagnóstico murieron 21, con una $p=0.007$, OR 12.6 (IC 95% 1,93-82.087). La falla al tratamiento inicial, ya sea por enfermedad progresiva o por recaída, con cambio a alguno de los esquemas alternos mostró una p de 0.007, OR 4.310 (IC 95% 0.74-25.031) respecto al riesgo de morir. No se encontró significancia estadística el realizar la comparación respecto a la localización del tumor y la sobrevida. Lamentablemente no pudo realizarse inmunohistoquímica, ya que el material fue sustraído del servicio de Patología del Hospital.

Conclusiones. Existe una diferencia en la supervivencia de los pacientes con Sarcoma de Ewing cuando está localizado, y cuando hay metástasis al diagnóstico, siendo las metástasis pulmonares y a SNC de peor pronóstico en estos pacientes. En nuestra serie, las metástasis al SNC ocuparon el segundo lugar, con un 17.6%, mientras que en la literatura mundial la frecuencia es muy baja, lo cual pudiera estar en relación con los estadios tan avanzados de la enfermedad en los que se realiza el diagnóstico. Se reporta una menor sobrevida en los pacientes son falla al tratamiento inicial. No encontramos diferencias significativas en cuanto al uso de tratamiento locorregional, ya sea cirugía, radical o de preservación, y/o radioterapia con el pronóstico de la enfermedad. Se necesita realizar estudios citogenéticos y de biomarcadores para poder establecer el comportamiento biológico de la enfermedad y con esto poder brindar un tratamiento más adecuado a cada tipo de pacientes

MARCO TEORICO

El sarcoma de Ewing ocupa el segundo lugar de los tumores malignos de hueso, y es parte de un grupo heterogéneo de neoplasias formadas por células redondas pequeñas y azules con localizaciones anatómicas muy diversas, afectando preferentemente al hueso pero también partes blandas y distintos órganos. Es poco común antes de los 8 años y después de los 25 años. La media de edad reportada por el European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Study group (EICES) es de 14 años, de los cuales 57% son hombres y 47% mujeres, a excepción antes de los 10 años en donde es más frecuente en las mujeres.¹ Es más común en blancos que en negros, con una incidencia muy baja en afroamericanos.² Se reporta una incidencia anual de 2.9 casos por millón por año en Estados Unidos³. En nuestro país los tumores óseos ocupan el quinto lugar de frecuencia, representando el 5.7% de las malignidades en la infancia, y en particular el Sarcoma de Ewing representa el 1.1%.^{4,5}

Presentación clínica

El síntoma de presentación más común es el dolor, en 96% de los pacientes, el cual es de carácter intermitente, severo, de predominio nocturno, y se asocia hasta en 16% con el hallazgo de una fractura patológica. El hallazgo de masa palpable en la zona del tumor es constante en hasta dos tercios de los pacientes. Se han descrito parestesias en algunos de los pacientes, y síntomas constitucionales como fiebre, síntomas inespecíficos en caso de enfermedad avanzada en el 2% de los pacientes.³ En cuanto a los sitios de presentación, el EICSS reporta el 24.7% localizada en pelvis, 16.4% en fémur, 16.7% por debajo de la rodilla, 12% parrilla costal, 8% en vertebras y 4.8% húmero. De estas localizaciones se dividen en dos grandes grupos que tienen significado pronóstico: aquellos que se localizan en las extremidades (fémur, tibia, peroné, huesos del pie o de la mano) o también llamado extra axial y los presentes en el tronco y cabeza/cuello (pelvis, costillas, región torácica, vértebras, etc) o axiales.¹ Es una enfermedad que presenta metástasis al diagnóstico en aproximadamente 25% de los pacientes, siendo pulmón y otros huesos los sitios mas frecuentes de metástasis⁶, sin embargo hasta un 80% de los pacientes presentan metástasis

microscópicas, desarrollando posteriormente enfermedad metastásica macroscópica, lo que empobrece su pronóstico. En la enfermedad localizada gracias a los múltiples avances en el tratamiento ha habido una mejoría en la sobrevida. De manera opuesta los pacientes con enfermedad diseminada la sobrevida es apenas de 20%.⁷ En diferentes estudios, el volumen tumoral, la edad, la respuesta a la quimioterapia, y los sitios de metástasis son los factores pronósticos más reconocidos.

Nomenclatura

La familia de los sarcomas de Ewing (ES) pertenecen al grupo de tumores de células pequeñas redondas y azules, incluye al ES clásico de hueso, ES extraesquelético, tumor de Askin en pared torácica y tumor neuroectodémico primitivo periférico (pNET) también conocido como neuroepitelioma periférico, el cual es altamente agresivo, poco diferenciado y con una histogénesis desconocida. De acuerdo a estudios genéticos e inmunológicos se ha podido agrupar a estos tumores como Familia de tumores de Ewing, ya que hay evidencia que sugiere que todos ellos derivan de una misma stem cell.⁸ La Organización Mundial de la Salud incluye a todos en el término de ES/PNET.³ Esta nomenclatura hace referencia a la alteración génica en la que se afecta el gen EWS (cromosoma 22q12), por lo que se dividen en los siguientes subtipos o variedades histológicas: Ewing clásico (convencional), Ewing atípico, de células grandes, de células claras, diferenciación neuroectodérmica, Neuroepitelioma periférico (PNETp)⁹.

Hoy en día se considera su origen citogenético en células pluripotenciales procedentes de la cresta neural, desechando otras posibilidades como son mesénquima, endotelio o pluripotenciales hematopoyéticas. El origen neural se basa en la capacidad que tienen estas células para sintetizar acetilcolina transferasa, enzima especial para la síntesis de acetilcolina junto con la falta de síntesis de precursores adrenérgicos, sitúa su origen en células primordiales parasimpáticas posganglionares, células situadas en condiciones normales a lo largo del sistema nervioso autónomo, mediados por IGF-1 y su receptor, y por el polipéptido liberador de gastrina y su receptor.¹⁰ La diferenciación neural resulta mucho más evidente en los sarcomas de Ewing atípicos y en PNET.¹¹

Inmunohistoquímica

El advenimiento del anticuerpo monoclonal CD99, característico del gen MYC 2 del sarcoma de Ewing, vino a facilitar el diagnóstico inmunohistológico de estas neoplasias; CD99 se expresa en el sarcoma de Ewing y en los PNET por lo cual es útil en el diagnóstico de los TNEP. Otros anticuerpos que se detectan en los PNET son la Proteína S-100, sinaptofisina, vimentina, cromogranina y queratina. Se ha descrito desmina en dos casos de PNET con rosetas.¹²

Se han detectado otro grupo de marcadores entre los que se han descrito los siguientes: Enolasa neuronal específica (NSE), HNK-1 (Leu7) equivalente al CD57, S-100, PGP 9.5, neurofilamentos, receptores de transferrina y antígenos HLA-C II. La expresión de estos epítomos neurales serviría para marcar un mayor grado de diferenciación neuroectodérmica. Se ha observado una mayor positividad del número de marcadores neurales en aquellos que presentan diferenciación neuroectodérmica con rosetas tipo Homer-Wright.¹³ Se ha defendido la necesidad de que se expresen dos o tres marcadores neurales para aceptar el carácter neuroectodérmico del ES, independientemente de su configuración morfológica (presencia o no de rosetas de Homer-Wright),¹⁴ y se ha encontrado relación entre el grado de diferenciación neural y la presencia/ausencia de marcadores, de forma que los pPNET expresan con regularidad 2 o 3 epítomos neuroectodérmicos, mientras que el ES clásico puede también hacerlo, aunque es más inusual así como también puede tan solo expresar vimentina. La presencia de marcadores epiteliales ha sido vista en diversos tipos de ES, tanto en cultivo de tejidos como en material fresco. Recientemente, se han publicado nuevos datos sobre este tema descubriéndose positividad hasta de un 20% de casos de células aisladas tipo ES entre la citoqueratina CAM 5.2 y EA1, EA3.¹⁵ Recientemente se han publicado resultados positivos en el SE frente a β -1 integrina proteína-kinasa, encontrando positividad del c-kit y el SCF (stem cell factor) en los ES. Esta proteína está ligada a la proliferación celular previniendo la apoptosis. También se han efectuado estudios inmunohistoquímicos

empleando el producto del gen EWS/FLI-1 para lo cual se ha utilizado el péptido correspondiente a la región c-terminal del FLI-1.¹⁶

Factores pronósticos

El estudio de factores pronósticos es importante para ofrecer al paciente un tratamiento individualizado, esto incluye factores clínicos, radiológicos así como a nivel morfológico, genético y de biología molecular. En la actualidad se conocen algunos factores pronósticos asociados a la sobrevida, entre los que destacan la localización y extensión de la enfermedad, así como hiperdiploidia, con más de 50 cromosomas, aneuploidia, mutaciones en p53, deleciones en INK4, expresión de telomerasa se ha descrito como marcadores de mal pronóstico.¹⁷ Con el estudio de estos marcadores se espera encontrar una expresión común de la enfermedad para de esta forma encontrar patrones característicos y con el tiempo encontrar una terapia estratificada según el riesgo de estos pacientes.

En cuanto a las mutaciones en el gen p53 se han detectado en el 8 a 12% de los pacientes con SE, correlacionándolo con peor pronóstico de la enfermedad y mayor riesgo de muerte, así como resistencia a la quimioterapia, especialmente en agentes que dañan al ADN. La respuesta a la quimioterapia se ha relacionado a la expresión de Ki 67 y al tamaño del tumor.¹⁸ Las alteraciones en la proliferación celular, que surgen de la pérdida de control del ciclo celular, pueden ser estudiadas y cuantificadas determinando la expresión nuclear de proteína Ki-67 mediante técnicas de inmunohistoquímica. La expresión de Ki-67 se correlaciona bien con el grado y estadio tumoral. Cada vez existen más estudios mostrando en el análisis multivariado que la expresión de Ki-67 es un marcador pronóstico independiente de recidiva, como de progresión.¹⁹ En los tumores de grado bajo e intermedio (G1-G2) considerados de bajo riesgo, la determinación de Ki-67 permite diferenciar grupos de mayor agresividad, que justificaría una terapia más agresiva. Incluso en aquellos tumores únicos y bien diferenciados, la expresión de Ki-67 nos indica aquellos con mayor probabilidad de recaídas en cáncer de vejiga, mama, etc.²⁰

La expresión de Ki 67 se ha asociado también a recurrencia tumoral y peor pronóstico en pacientes adultos con ES, ya que en estudios realizados, se ha observado que los pacientes con positividad de Ki 67 presentaron recaída de la enfermedad a 8 meses, contra cinco años en pacientes que no mostraron positividad.²¹ En otros estudios se han relacionado la expresión de p53 con alteraciones genéticas que alteran la expresión de ciclinas que regulan el ciclo celular, sin establecerse una correlación clara entre estas y la expresión de Ki 67.^{22 23} La expresión de Ki 67 se ha reportado hasta en 57% de los pacientes con ES, correlacionándolo con una disminución del 50% de la supervivencia en los pacientes con positividad para Ki 67.²⁴

El protooncogén del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*HER2 neu*) se localiza en el 17q21 y codifica una glucoproteína tirosina-quinasa de transmembrana. La sobreexpresión del gen *HER2* se correlaciona con pronóstico adverso en numerosos carcinomas humanos, como el mamario, el ovárico y el pulmonar. En algunos de estos tumores, el incremento en la expresión del *HER2* se asoció con mayor génesis tumoral y potenciales metástasis o con resistencia a la quimioterapia. Respecto de los tumores músculo esqueléticos, se ha estudiado la expresión del *HER2* en el momento del diagnóstico en los sarcomas de tejidos blandos, osteosarcomas (OS) y sarcomas de Ewing (ES). En el estudio de Scotlandi et al,²⁵ estudiaron si la detección por inmunohistoquímica de la proteína HER2 en el momento del diagnóstico podía identificar a los pacientes con alto riesgo, así como determinar la expresión de glucoproteína p. en este estudio con 113 pacientes, se comprobó la presencia de HER2 en 16% de los casos, sin mostrar correlaciones significativas con otras variables clínico patológicas (sexo, edad, subtipo histológico, localización anatómica, protocolo quimioterapéutico, terapia local, cirugía, márgenes quirúrgicos, volumen tumoral al momento del diagnóstico, necrosis tumoral luego de la quimioterapia preoperatoria) en el SE o en el OS, sugiriendo que estos marcadores son independientes de las características clínico patológicas de los tumores. En el estudio de Amir et al,³² se realizaron biopsias a 37 pacientes con Sarcoma de Ewing, realizando estudios de inmunohistoquímica para determinar p53, Ki67 y HER2/neu,

encontrando sobreexpresión de p53 en 43% de los pacientes, Ki67 en 57%. No se encontró sobreexpresión de HER2. Sin embargo se han reportado estudios en los que se ha relacionado la expresión de HER2/neu con la regulación de topoisomerasa II alfa y su expresión en el SE, reportando un incremento en la apoptosis y la sensibilidad a drogas como VP16 y adriamicina.²⁶ En enfermedades como el cáncer de mama, ovario es blanco de múltiples estudios con el fin de mejorar la respuesta al tratamiento, ya que se ha encontrado mejoría en la sobrevida de estos pacientes.^{27 28}

Diagnóstico

La sospecha diagnóstica se basa en los hallazgos en la exploración clínica así como la información obtenida en la historia clínica. Dentro de los estudios de gabinete, la radiografía simple de la extremidad continua siendo de gran importancia. En esta podemos observar una lesión expansiva, permeativa y destructiva, que afecta la diáfisis de huesos largos, así como el hallazgo de reacción perióstica multilaminada, también llamada en hojas de cebolla y el triángulo de Codman. Estudios como la Tomografía axial computarizada (TAC) y la Resonancia magnética de la extremidad son útiles para evaluar la extensión intra y extramedular de la tumoración y el compromiso de los tejidos blandos adyacentes, así como para delimitar la afección intra y extracompartmental. Durante el seguimiento de los pacientes también es de utilidad para valorar la respuesta a la quimioterapia. Dentro de los estudios de extensión, la TAC de tórax es principalmente útil para valorar enfermedad metastásica pulmonar y el gammagrama óseo con Tc99 para valorar metástasis óseas.³

En cuanto a la realización de biopsia, se prefiere la biopsia incisional, ya sea abierta o cerrada dependiendo de las características del paciente y del centro hospitalario, ya que es un método que se ha reportado con una exactitud de hasta el 95%, mientras que cuando se realiza por aspiración con aguja fina, la exactitud es del 90%.³

Tratamiento

En la llamada era prequimioterapia, el tratamiento estaba restringido únicamente a cirugía o radioterapia y más del 90% de los pacientes morían por enfermedad metastásica. Sin embargo, los avances en el tratamiento con el inicio de tratamiento multimodal han logrado una mejora en la sobrevida. El tratamiento con agentes quimioterápicos del Sarcoma de Ewing, inicio a partir de los años sesenta, con drogas alquilantes como la ciclofosfamida en el Hospital de St Jude, posteriormente se agregaron drogas como mecloroetamina, melfalán, encontrando una mejor respuesta con el uso de ciclofosfamida, la cual hasta el momento es pilar en el tratamiento de esta enfermedad. Posteriormente se incluyó en el tratamiento a la actinomicina, un inhibidor de microtúbulos, con mejoría en la respuesta clínica. En la década de los 70's se reportó la eficacia de las antraciclinas como la doxorubicina. Este fue el inicio de la era moderna en el tratamiento, con el advenimiento de la terapia multimodal, a base de quimioterapia y radioterapia. El régimen basado en la combinación de cuatro drogas; vincristina, actinomicina, ciclofosfamida y doxorubicina (VACD) logró prolongar la sobrevida de estos pacientes a 12 meses.³ Actualmente el Intergroup Ewing Sarcoma Study IESS reporta la superioridad de estas cuatro drogas en comparación a utilizar únicamente tres (VAC) un control de la enfermedad, reportando una sobrevida libre de enfermedad a 5 años de 76% contra 54%²⁹ La gran mayoría de los estudios están enfocados en el tratamiento sistémico de la enfermedad, sin embargo es importante el control local aun en enfermedad diseminada.³⁰ La quimioterapia neoadyuvante ha mostrado múltiples ventajas, entre las que destacan permitir una evaluación completa a cada paciente, disminuir el volumen tumoral y disminuir el riesgo de fracturas patológicas en comparación al uso de radioterapia sola. Se reporta una tasa de respuesta al tratamiento alta, hasta en 90%, con tasas de necrosis excelentes, mejorando el pronóstico de los pacientes, en comparación con los que se ha reportado mala respuesta al tratamiento.³¹ El objetivo del tratamiento quirúrgico en enfermedades malignas es la resección completa del tumor, con resección en bloque que permita márgenes quirúrgicos adecuados. La técnica quirúrgica dependerá tanto de las

características de la lesión como de la infraestructura con la que cuente el centro hospitalario.

El ES es una enfermedad que usualmente responde de forma adecuada al tratamiento multimodal con cirugía, quimioterapia y radioterapia, con tasas de curación hasta del 60%. El tratamiento con radioterapia ha mostrado una mejora en la sobrevida, en comparación con el tratamiento con cirugía y quimioterapia solas. El uso de radioterapia adyuvante es controversial entre los diferentes grupos de tratamiento, el grupo del Children's Oncology Group reserva esta terapia únicamente a los pacientes que muestran una respuesta histológica mala, con menos de 10% de necrosis. La dosis total es de 55.8 Gy en fracciones de 1.8 Gy, dejando márgenes de 2 a 4 cm con el fin de evitar complicaciones como linfedema.³² Existe aún controversia entre los diferentes grupos de tratamiento acerca de los lineamientos generales para la radioterapia en niños. Actualmente la tendencia en general en la oncología es la terapia blanco, sin que existan alternativas en esta entidad. Es imprescindible conocer más a fondo la génesis de las enfermedades para poder tener avances en el tratamiento.

JUSTIFICACION

El Sarcoma de Ewing ocupa el segundo lugar en las patologías óseas malignas más frecuentes en la edad pediátrica, con una supervivencia a cinco años de 74% cuando se combina la quimioterapia y cirugía. Los pacientes con enfermedad metastásica presentan tan solo una sobrevida a cinco años del 10%. Los factores de mal pronóstico conocidos son la localización, la extensión de la enfermedad (metastásica o no metastásica), respuesta al tratamiento con quimioterapia, entre otros factores moleculares que se encuentran aún en estudio. Se ha observado un curso de la enfermedad es más agresivo cuando se ha encontrado la sobreexpresión de p53, positividad para el antígeno de proliferación celular Ki 67, asociándose con un peor pronóstico. Los reportes del protooncogen HER-2/ neu son controversiales en esta enfermedad. La mayor parte de los estudios publicados se han enfocado a la asociación con las alteraciones cromosómicas, siendo el marcador Ki 67 de vital importancia en el pronóstico de la enfermedad por lo que es necesario contar con mayor información acerca de estas alteraciones.

Se necesita conocer más ampliamente los factores pronósticos que presentan los niños con sarcoma de Ewing que acuden a nuestro hospital, que puedan ser asociados a mayor sobrevida para poder estratificar más adecuadamente a estos pacientes y poder brindar un tratamiento más apropiado con el fin de para mejorar la sobrevida en este grupo de pacientes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente el tratamiento del Sarcoma de Ewing es en general el mismo para todos los pacientes, lo cual pudiera ser modificado con base al conocimiento de factores pronósticos tanto clínicos como moleculares, tales como localización, enfermedad metastásica al diagnóstico, así como la expresión de antígenos de proliferación como el Ki 67, el antígeno p53 y el antígeno HER-2, justificando así un tratamiento diferente, e incluso más agresivo en este grupo de pacientes lo cual contribuiría a incrementar la sobrevida en este grupo de pacientes.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Cuales son los factores pronósticos, clínicos y moleculares, asociados a la sobrevida en los pacientes con Sarcoma de Ewing?

HIPOTESIS

1. La enfermedad metastásica es un factor de mal pronóstico en los pacientes con Sarcoma de Ewing, con una sobrevida 50% menor comparada con los que no tienen enfermedad metastásica
2. Las localizaciones extra axiales del sarcoma de Ewing disminuyen hasta en un 50% la sobrevida de los pacientes.
3. La expresión del antígeno Ki 67, el antígeno p53 y HER-2 disminuirá en un 50% la sobrevida de los pacientes con Sarcoma de Ewing.

OBJETIVOS

General

Determinar cuáles son los factores clínicos y moleculares que influyen en la respuesta al tratamiento y sobrevida en pacientes con Sarcoma de Ewing.

Específicos

1. Encontrar la asociación entre la extensión de la enfermedad (metastásica y no metastásica), con la respuesta al tratamiento y la sobrevida de los pacientes con Sarcoma de Ewing.
2. Definir la asociación entre la localización de la enfermedad (axial y extra axial), la respuesta al tratamiento y la sobrevida de los pacientes con Sarcoma de Ewing
3. Establecer la asociación entre la expresión del antígeno Ki 67, el antígeno p53 y el antígeno HER-2 con la respuesta al tratamiento y la sobrevida de los pacientes con Sarcoma de Ewing

MATERIAL Y METODOS

Lugar de realización. Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional SXXI. Servicio de Oncología, laboratorio de investigación.

Tipo de estudio.

Por número de mediciones: longitudinal

Por número de grupos: descriptivo

Por tener una maniobra: observacional

Temporalidad: retrospectivo.

Periodo y población de estudio. Se incluyeron a todos los pacientes con Sarcoma de Ewing en el periodo comprendido entre el 1° de Enero del 2000 al 1° de Enero de 2010.

Criterios de inclusión

1. Pacientes de primera vez, cualquier género (hombre o mujer) con el diagnóstico de Sarcoma de Ewing diagnosticado en el servicio de Patología del Hospital del Centro Médico Nacional SXXI.
2. Pacientes que contaban con expediente completo que permita la adecuada recolección de datos.
3. Pacientes que tuvieron bloque de parafina del tumor en estudio para realizar el estudio inmunohistoquímico para Ki 67, p53 y HER-2.

Criterios de exclusión

1. Pacientes que no tuvieron expediente completo para la adecuada recolección de datos

VARIABLES

Variables universales. Edad, sexo.

Variables independientes. Localización y extensión de la tumoración (metastásica y no metastásica). Expresión de Ki 67, expresión de p53 y expresión de HER-2 en las muestras obtenidas.

Variables dependientes. Respuesta al tratamiento y sobrevida.

Tabla de variables

Definición conceptual, operativa y escala de medición de las variables de estudio				
Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Evaluación	Escala de medición
Edad	Espacio de años que han corrido entre el nacimiento y el momento actual.	Edad en años en el momento de la atención	Años cumplidos.	Cuantitativa continua
Sexo	Condición orgánica, masculina o femenina, de los animales y las plantas. Características sexuales fenotípicas.	A partir de la exploración física las características fenotípicas	Femenino Masculino	Cualitativa nominal
Localización de la enfermedad	Región anatómica afectada por la enfermedad	Se clasifica en cuatro a la localización con el eje medio	Axial Extra axial	Cualitativa nominal
Extensión de la enfermedad	Extensión anatómica de la enfermedad.	Si hay metástasis a distancia	Metástasis pulmonares, oseas, SNC	Cualitativa nominal
Expresión de Ki 67	Ki 67 se considera un marcador de proliferación celular	Expresión de Ki 67 posterior a estudios de inmunohistoquímica	Se expresa o no se expresa.	Cualitativa nominal
Expresión de p53	p53 es una proteína nuclear que controla la transcripción genética y regula el ciclo celular	Expresión de p53 posterior a estudios de inmunohistoquímica	Se expresa o no se expresa.	Cualitativa nominal
Expresión de HER-2	El HER-2 se relaciona con la expresión del factor de crecimiento epitelial	Expresión de HER-2 posterior a estudios de inmunohistoquímica	Se expresa o no se expresa.	Cualitativa nominal
Respuesta al tratamiento	Respuesta favorable en la evolución clínica del tumor posterior al inicio de quimioterapia	Respuesta favorable o desfavorable.	Se tomará en base a la sobrevida. Vivo o muerto	Nominal
Sobrevida	Proporción de personas vivas a un tiempo especificado.	Tiempo libre de enfermedad posterior al inicio del tratamiento.	Meses de vida posterior al inicio del tratamiento.	Cuantitativa continua

Tamaño de la muestra. El tipo de muestreo fue no aleatorio y el tamaño de muestra se decidió por conveniencia ya que se incluyeron todos los pacientes con diagnóstico de Sarcoma de Ewing en el periodo de tiempo especificado para la realización de este estudio.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó epidemiología descriptiva para caracterizar la muestra, frecuencias simples, prueba Chi cuadrada , para comparar el porcentaje de respuesta tumoral, y cálculo de sobrevivida de acuerdo al método actuarial, así como la prueba de Long Rank para determinar diferencias entre ambas curvas. Los datos fueron analizados con el paquete SPSS 19.0.

FACTIBILIDAD

Contamos con los recursos materiales y humanos para la realización de este estudio.

- Para cada paciente del estudio, expediente clínico completo y bloque de parafina.
- Médico subespecialista en Oncología Pediátrica.
- Médico Oncólogo Pediatra tutor del estudio.
- Laboratorio de investigación para realizar inmunohistoquímica

ASPECTOS FINANCIEROS

No se requirieron para la recolección de datos y se cuenta con el laboratorio de investigación para la realización de estudios de inmunohistoquímica.

ASPECTOS ETICOS

De acuerdo a la ley General de Salud, este protocolo de estudio no tiene implicaciones éticas ya que no pone en riesgo de ninguna forma al paciente, se considera de riesgo mínimo al ser realizado sobre bloques de parafina, por lo que no requiere consentimiento informado.

DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO.

Se recolectaron datos del expediente clínico y se solicitaron los bloques de parafina en el servicio de Patología de la UMAE Pediatría para estudio inmunohistoquímico para cada uno de los antígenos a estudiar. Desafortunadamente no pudieron realizarse los estudios

de inmunohistoquímica ya que los bloques de parafina fueron sustraídos del Servicio de patología del Hospital. La técnica de inmunohistoquímica se describe en el anexo 1.

RESULTADOS

Se obtuvo una muestra inicial de 46 pacientes, de los cuales se analizaron 34 pacientes, ya que no fue posible recolectar los datos por falta de información en el archivo clínico.

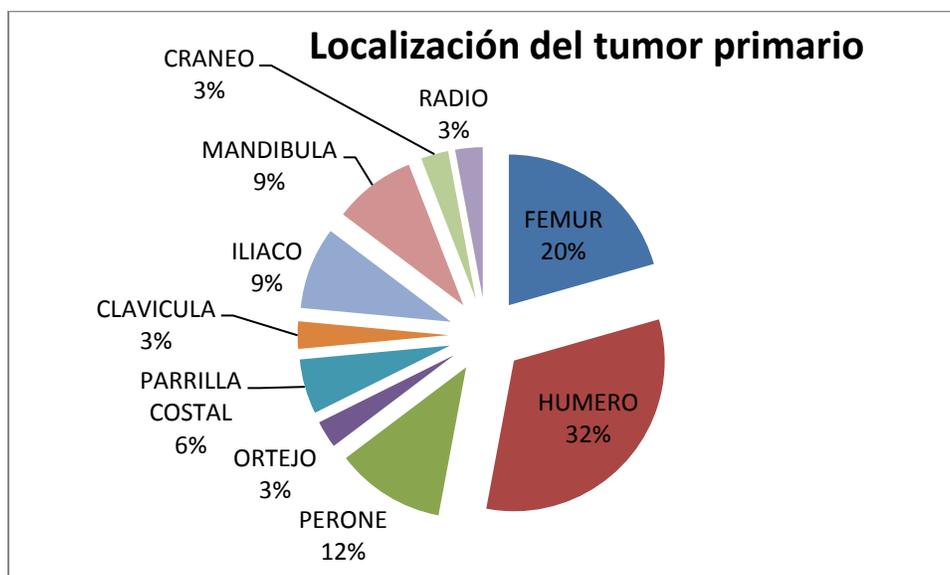
Cabe mencionar que por eventualidades que escapan de las manos del investigador, no fue posible realizar inmunohistoquímica en el estudio, tal como se había planteado al inicio de este. El motivo de tal eventualidad es secundario a que fue sustraído por personal del servicio de patología el material necesario, es decir, bloques de parafina, por lo que únicamente nos referiremos a factores clínicos durante la descripción de los resultados y el análisis de los mismos.

De los 34 pacientes estudiados, 61.8% fueron hombres (n=21) y 38.2% mujeres (n=13), la relación hombre mujer fue 1:1.6, con una media de edad de 11 años (3-17 años). Del total de pacientes, el 23.5% están vivos (n=8) y el 76.5% (n=26) muertos. Las causas de muerte fueron las siguientes: 16 pacientes por progresión de la enfermedad, 9 pacientes por infecciones graves y sus complicaciones y en un caso por nefrotoxicidad. Las características de la población se muestran en la tabla 1. La localización de enfermedad primaria se muestra en el gráfico 1.

En cuanto a la extensión de la enfermedad, el 82% presentó enfermedad metastásica al diagnóstico, y 17.6% enfermedad localizada. Los sitios de metástasis fueron: pulmón 67% (n=23), sistema nervioso central (SNC) 17.6% (n=6) y hueso en 8.8% (n=3). Cabe aclarar que algunos pacientes presentaron metástasis más de un sitio, es decir pulmones y SNC en tres de los casos. El esquema de quimioterapia de primera línea para todos los pacientes incluyó vincristina, actinomicina, ciclosofamida, adriamicina y/o epirrubicina a dosis establecidas en esquemas internacionales. En caso de enfermedad progresiva o recaída, se cambió a algún esquema alternativo. En 17 de los pacientes a esquema VIP: VP16, ifosfamida y cisplatino, en un paciente esquema ICE: Ifosfamida, carboplatino y etoposido y dos pacientes recibieron esquema con ciclofosfamida y VP 16.

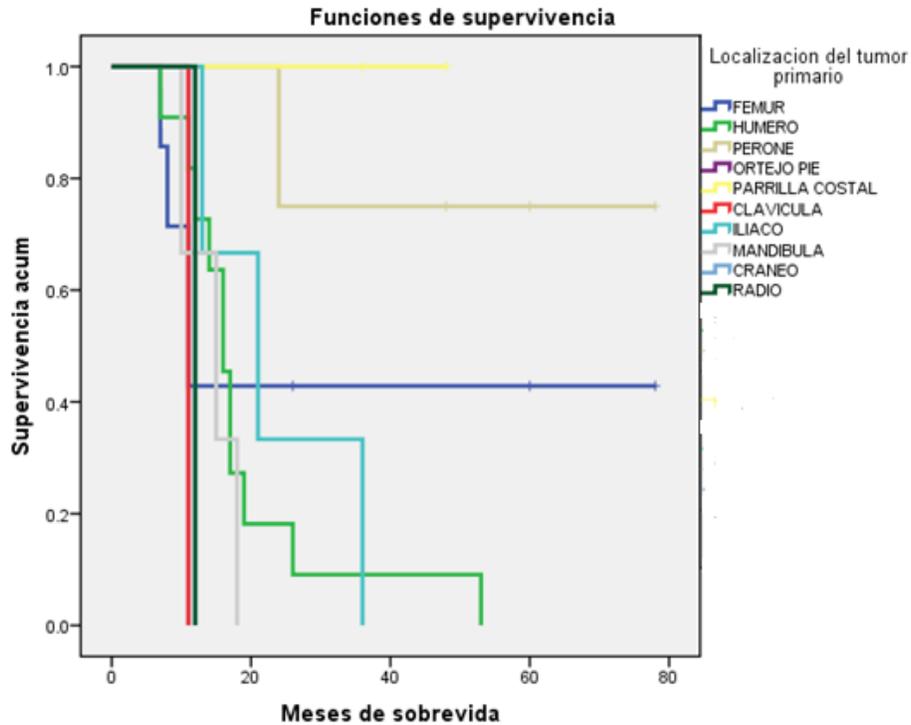
Tabla 1. Características de los pacientes				
		<i>n</i>	%	Rango
Sexo	Mujeres	13	38.2	
	Hombres	21	61.8	
Edad (años)	Mediana: 11 años			1.4- 16
Vivos		8	23.5	
Muertos		26	76.5	
Localización				
Axial		11	32.3	
Extra axial		23	67.6	
Enfermedad metastásica				
Pulmón		23	67.6	
Sistema nervioso central		6	17.6	
Hueso		3	8.8	
Complicaciones				
Nefrotoxicidad		12	35.3	
Mielosupresión		32	94.1	
Infecciones		25	71.4	
Recibieron radioterapia		33	94.3	
Se realizó cirugía		30	88.2	

Las principales complicaciones que se presentaron durante el tratamiento fueron mielosupresión 94%, nefrotoxicidad en un 35.3%, infecciones en 73.5%, lo que explica la alta mortalidad reportada en el estudio. El 97% de los pacientes recibió radioterapia al sitio primario, a dosis estándar (45-55.8Gy), y en el 88.2% se realizó cirugía, de la cual el 55.9% fue radical (amputación de la extremidad) y 29.4% cirugía de preservación. En los pacientes que no se realizó cirugía fue secundario a la inaccesibilidad del sitio primario o que murieron antes de realizar la cirugía. El tiempo promedio entre el diagnóstico y la realización de la cirugía fue de 9 meses.



Gráfica 1

Al realizar el análisis inferencial se observó que de los 26 pacientes con metástasis pulmonares al diagnóstico murieron 21, con una $p= 0.007$, RR 12.6 (IC 95% 1,93-82.087). Las metástasis a SNC y a otros huesos se reportaron con una p de 0.434 y 0.171 respectivamente. En cuanto a la localización, no se encontró significancia por sitio específico, y al realizarla en relación al eje medio (axial, extra axial) se reportó una $p= 0.817$. En este sentido, cabe mencionar que al realizar el análisis por sitio específico, únicamente los pacientes con afección a fémur, peroné y parrilla costal mostraron una respuesta adecuada al tratamiento, ya que el resto de los pacientes ha fallecido (grafica 2).



Gráfica 2. Sobrevida por sitio específico

De las complicaciones reportadas, es decir nefrotoxicidad, mielosupresión e infecciones, ninguna mostró una p menor a 0.05.

La falla al tratamiento inicial, ya sea por enfermedad progresiva o por recaída, con cambio a alguno de los esquemas alternos mostró una p de 0.007, RR 4.310 (IC 95% 0.74-25.031). Se reportó la radioterapia con $p=0.235$. Se muestran los resultados anteriores en la tabla 2.

El esquema de tratamiento alternativo con VIP se utilizó en 17 pacientes, de los cuales tuvieron buena respuesta únicamente 4 de ellos después de 8 ciclos de tratamiento en promedio. El 76% es decir, 13 pacientes, no respondió al tratamiento después de 6 meses con una mortalidad del 100% en este grupo. Se utilizó solo en un caso esquema con esquema ICE como segunda línea de tratamiento, con una mortalidad de 100%. Dos de los pacientes recibieron esquema con Ciclofosfamida/VP16, después de tratamiento inicial con VACE y dos ciclos de VIP, la mortalidad en este grupo fue del 50%.

Tabla 2. Asociación de las variables con la sobrevida			
	<i>p</i>	RR	IC 95%
Metástasis pulmonares	0.007	12.6	1,93-82.087
Localización	0.817	1.4	21.15-31.31
Falla al tratamiento	0.017	4.31	0.74-25.031

La sobrevida global fue de 20.9% a 78 meses, con una media de 30.23 meses (IC95% 21.1-39.3) correspondiente al gráfico 3.

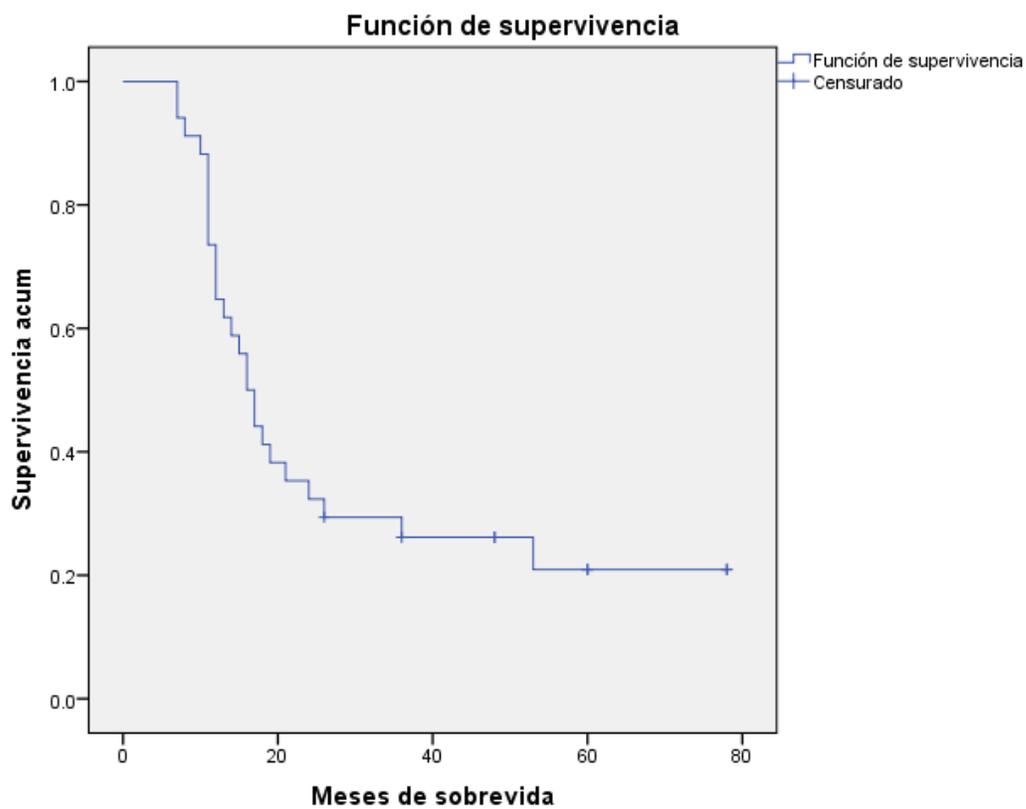
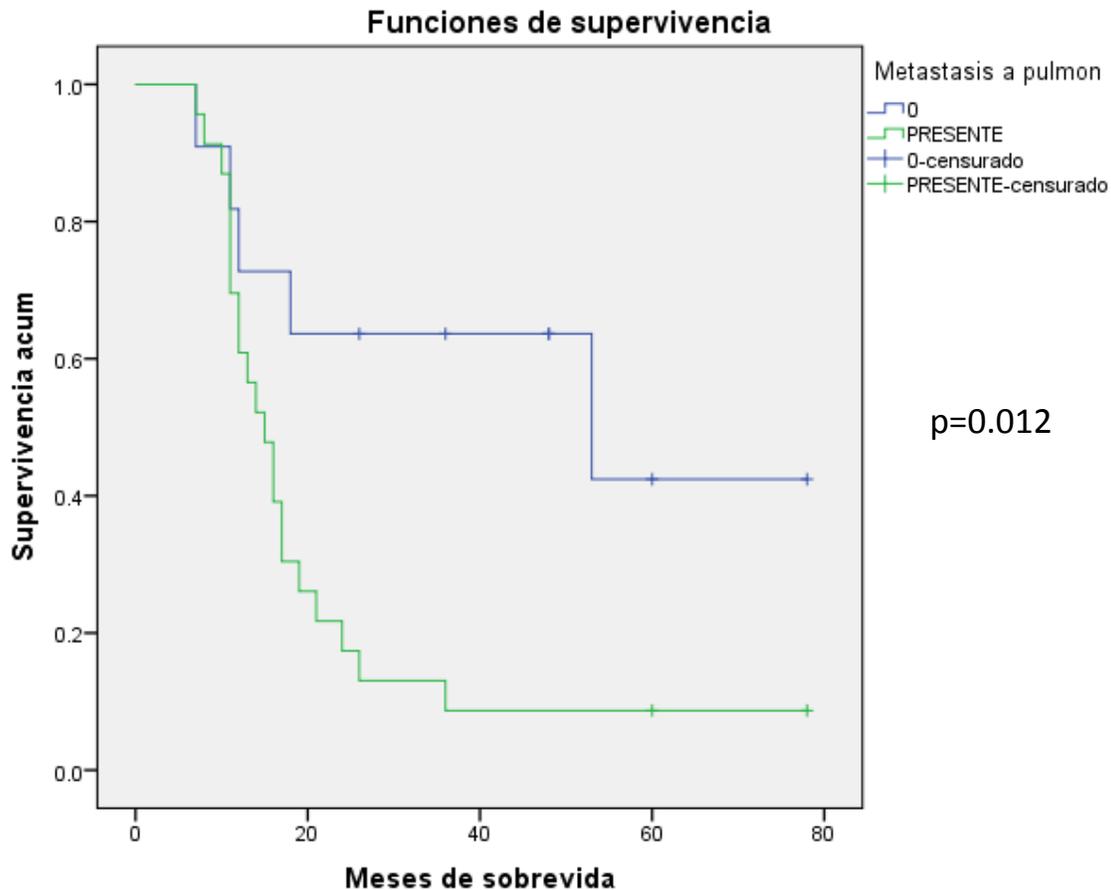


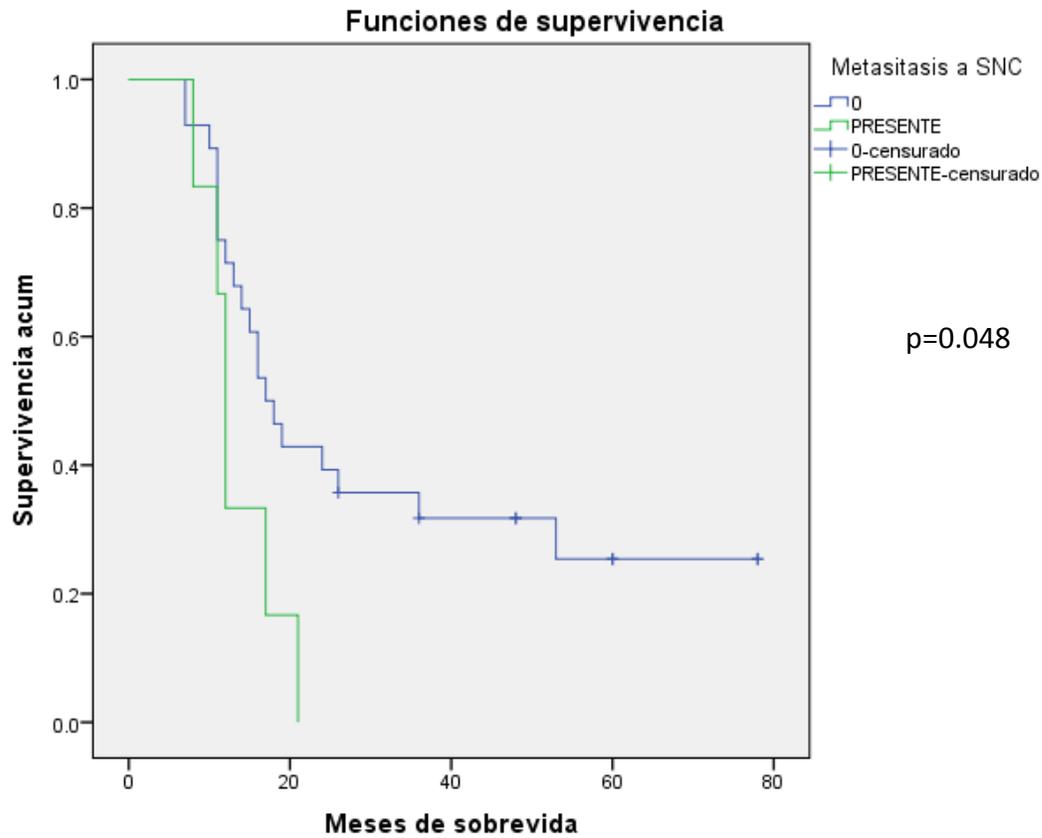
Gráfico 3. Sobrevida global a 78 meses

La curva de sobrevivencia (gráfico 4) muestra la diferencia entre el grupo de pacientes con metástasis pulmonares al diagnóstico y los que no la tuvieron, de 8.7% y 42.4% a 78 meses respectivamente. La prueba estadística de Long Rank Test mostró una significancia estadística de 0.012.



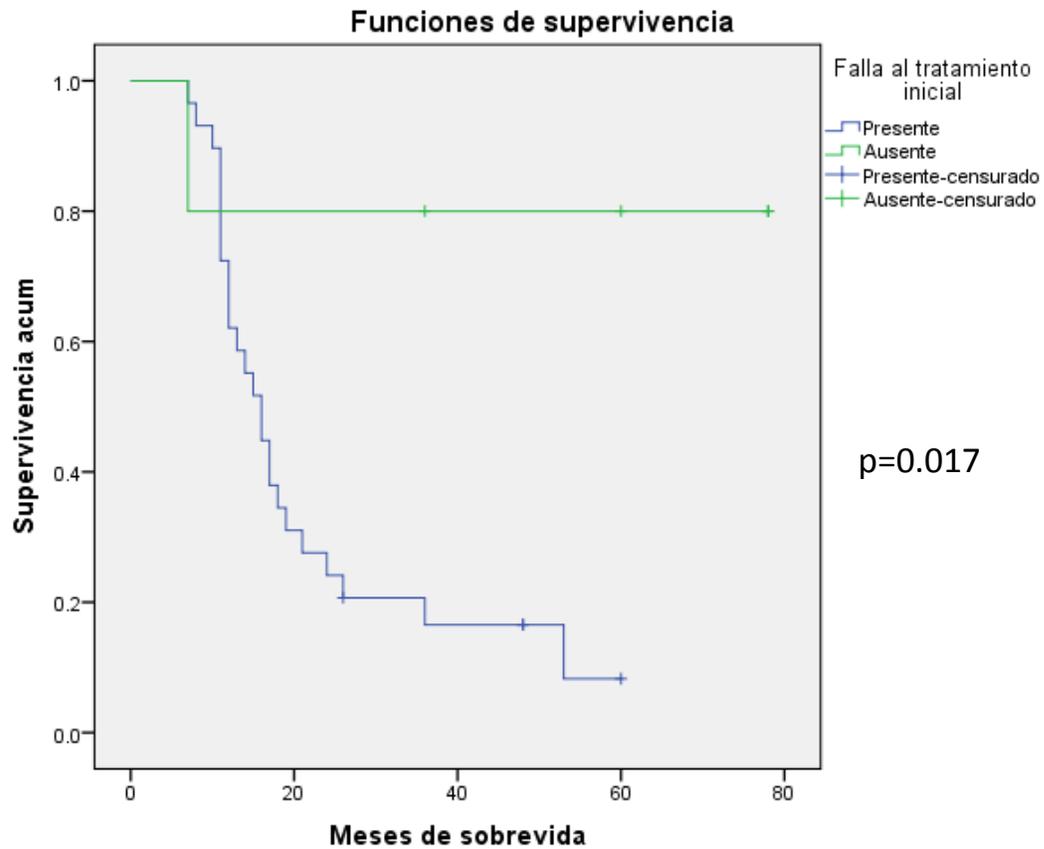
Gráfica 4. Sobrevivencia de acuerdo a metástasis en pulmón al diagnóstico

Realizamos la curva de sobrevivencia entre el grupo de pacientes con metástasis a SNC al diagnóstico y los que no la tuvieron, reportándose en 25.4% a 78 meses en el grupo con metástasis y de cero a 21 meses en los que si las tuvieron, la prueba estadística Long Rank Test reportó una $p= 0.048$, se muestra en la gráfica 5.



Gráfica 5. Sobrevida de acuerdo a metástasis a SNC al diagnóstico.

El análisis de sobrevida por complicaciones en el tratamiento no mostró diferencias significativas. Al comparar falla en el tratamiento, se reportó una sobrevida de 80% a 78 meses en el grupo que no mostró falla en el tratamiento inicial y de 8.3% a 60 meses en el grupo con falla al tratamiento ($p=0.017$). Gráfica 6.



Gráfica 6. Supervivencia de acuerdo a si tuvo falla al tratamiento.

El análisis de regresión logística reportó significancia estadística en el grupo de pacientes con metástasis a pulmón ($p=0.001$) y cuando se presenta falla al tratamiento inicial ($p=0.001$).

DISCUSION

El Sarcoma de Ewing es una enfermedad de baja frecuencia en la edad pediátrica, pero con una mortalidad muy elevada, la cual se ha reportado en la literatura desde 80% hasta un 20%, dependiendo de la extensión de la enfermedad, características clínicas y moleculares en las diferentes series consultadas.^{6,13,19} En cuanto a las características de los pacientes, la literatura mundial refiere una mayor incidencia de presentación en la tercer década de la vida, mientras que en nuestra serie se presentó en la segunda, a los 11 años. En cuanto a la relación hombre mujer los hallazgos concuerdan con lo reportado en la literatura, de 1:1.2.³ La localización extra axial representó el 67.6%, contrastando con los reportes de que la localización más frecuente es en esqueleto axial, en particular en los huesos de la pelvis. En nuestro estudio los sitios más frecuentes de presentación fueron humero, fémur y peroné. Cabe aclarar que por las características de los pacientes al diagnóstico, se incluyeron únicamente a los que tenían afección a hueso, ya que en algunos pacientes la afección abarcaba más allá de los huesos de la pelvis, motivo por el que fueron excluidos en este estudio por la dificultad de determinar el origen de la lesión primaria. No se pudo establecer una diferencia significativa en la sobrevida, sin embargo cabe mencionar que al realizar el análisis por sitio específico, únicamente los pacientes con afección a fémur, peroné y parrilla costal tuvieron una respuesta adecuada al tratamiento, ya que el resto de los pacientes ha fallecido, mostrando una mortalidad de 100% en los pacientes con afección al esqueleto axial, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura, en la que se reporta un peor pronóstico en los pacientes con afección al esqueleto axial, con un RR 1.3 ($p < 0.03$) para desarrollar enfermedad metastásica en este grupo de pacientes.¹

La enfermedad metastásica al diagnóstico es un factor de mal pronóstico ampliamente descrito en la literatura, que se ha relacionado con mayor riesgo de morir ($p = 0.001$)^{1,3,11}. Las metástasis a pulmón y hueso se han relacionado fuertemente con el pronóstico en grandes series reportadas, como la del European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. En esta serie se analizaron 975 casos de pacientes con Sarcoma de Ewing, de los cuales solo el 18.4% tenían enfermedad metastásica al diagnóstico, lo cual contrasta

fuertemente con el análisis realizado en nuestros pacientes, donde los pacientes con enfermedad metastásica representan el 82%. Llama la atención que en esta serie que no se reporta ningún caso con metástasis a SNC, que en nuestro estudio, constituyó el 17.6%, y en los pacientes con enfermedad metastásica a hueso no se reportó metástasis en pulmón, lo cual pudiera estar relacionado tanto al estadio avanzado al momento del diagnóstico o con algunos otros factores citogenéticos y biomoleculares aún desconocidos en nuestro medio.

Las metástasis en SNC se reportan como un sitio raro de metástasis en la literatura en general. La experiencia reportada por el grupo de investigación del Hospital de St. Jude en un periodo de 36 años, reportó que de un total de 335 pacientes con Sarcoma de Ewing, únicamente el 3.3% (n=11) presentaron metástasis a SNC. En este estudio se reporta una sobrevivida de 2.7 meses posterior al diagnóstico de metástasis a SNC, con una sobrevivida estimada a un año de 23.5%. Concluyen que aunque las metástasis a SNC son raras, confieren un pronóstico muy pobre y que el tratamiento combinado es la mejor opción para este grupo de pacientes.³³ En el estudio de Paulino et al,³⁴ se realiza una revisión de pacientes con Sarcoma de Ewing metastásico, en el que se incluyeron 30 pacientes, reportando sitios muy poco comunes de metástasis: SNC, hígado y bazo, encontrando un pronóstico aún peor en este grupo de pacientes, con una $p < 0.0001$ al realizar un análisis de regresión logística, sugiriendo un tratamiento mas agresivo para estos pacientes, que incluya quimioterapia y radioterapia.

En general los tumores sólidos tienen una baja frecuencia de metástasis a nivel de SNC. Kebudi et al, realizaron un estudio en el que se incluyeron 1100 pacientes con tumores extracraneales sólidos de los cuales únicamente 16 presentaron metástasis en SNC. 12 de ellos fueron sarcomas: 5 osteosarcomas, 4 Sarcoma de Ewing, un rabdomiosarcoma, un sarcoma alveolar y un caso de tumor de células claras. El resto fueron dos pacientes con Tumor de Wilms y dos con tumores de células germinales. El 25% de los pacientes tuvieron metástasis en SNC al momento del diagnóstico mientras el 75% restante lo

desarrollo durante el tratamiento o como recaída, en promedio 16 meses posterior al diagnóstico. Los pacientes murieron en promedio 2 meses posteriores al diagnóstico.³⁵

En nuestro estudio la presencia de metástasis en SNC es por mucho, mayor a la reportada en la literatura internacional, lo cual se correlaciona de forma estrecha con la mortalidad tan elevada en nuestro estudio, dejando claro que es pertinente realizar más estudios para establecer si esta relación es secundaria a algún factor intrínseco de nuestra población o si tiene relación con el momento tan tardío del diagnóstico en nuestro medio.

En cuanto a la tercera hipótesis, es una gran lástima no haber realizado el trabajo con inmunohistoquímica, como inicialmente fue planteado para buscar marcadores moleculares que pudieran orientarnos en las diferencias que presenta nuestra población con lo reportado en la literatura mundial, que actualmente es la tendencia en general.³⁶ Es necesario hacer estudios tanto de citogenética como de marcadores moleculares que puedan orientar al tratamiento específico de cada paciente.

Respecto al tratamiento, los esquemas de quimioterapia utilizados en nuestro Hospital se apegan a los utilizados mundialmente, donde las drogas de primera línea son vincristina, actinomicina, adriamicina y ciclofosfamida, así como ifosfamida para pacientes en recaída. En nuestra serie se encontró que los pacientes que ameritaron cambio en el esquema, secundario a recaída o progresión tuvieron un mayor riesgo de morir, con un OR 4.3 (IC95% 0.74-25.031) y una mortalidad del 100%. Cotterill et al,¹ reportan una $p=0.001$ para los pacientes en recaída y el riesgo de morir cuando se ha cambiado a un esquema alterno de tratamiento. Como ya se mencionó, la mejoría en la sobrevida en general, a pesar de los avances obtenidos en los esquemas de quimioterapia desde la década de los setentas es muy pobre, incrementando la sobrevida apenas en un 22%.²⁹ En la actualidad, la tendencia en general es la utilización de esquemas de quimioterapia más intensos desde el inicio del tratamiento, con radiación total hiperfraccionada y quimioterapia mieloablative, así como utilizar la llamada terapia blanco, como el Imatinib en otras entidades, con el fin de lograr la mayor reducción de carga tumoral desde las fases iniciales del tratamiento, ya que esta bien demostrada la relación de mayor riesgo de recaída o falla al tratamiento en aquellos

pacientes con mala respuesta a esquemas de quimioterapia iniciales^{1, 3, 7} En los protocolos en los que se utiliza quimioterapia más intensa, llamada “megaterapia” esta descrito el uso concomitante de trasplante alogénico o autólogo de medula ósea, a pesar de lo cual la sobrevida no ha mostrado una mejoría sustancial, ya que aún con la implementación de “megaterapia”, la mortalidad continua siendo del 50%, ya sea por recaída de la enfermedad o por toxicidad secundaria a la quimioterapia.³⁷ Sin embargo, al utilizar tratamientos enérgicos, las complicaciones tales como infecciones, mielosupresión y por lo tanto una mortalidad elevada, son muy frecuentes, alcanzando un 90% en nuestra serie, lo cual está en relación a la elevada mortalidad reportada.

En términos del tratamiento locorregional, se reporta que la cirugía ofrece mayores tasas de curación y menor tasa de recaída comparada con la radioterapia (RT) y el uso combinado de ambas modalidades. Dunsts et al³⁸ realizaron un estudio donde compararon la frecuencia de recidiva y la sobrevida de los pacientes quienes recibieron RT o cirugía contra los pacientes que recibieron ambas modalidades de tratamiento. El 63% recibieron ambas modalidades de tratamiento de los cuales 5% presentaron recaída local. Llegando a la conclusión que el tratamiento combinado tal vez pueda mejorar la sobrevida en estos pacientes. En nuestro estudio no encontramos relación entre la terapia locorregional y el riesgo de morir.

Una de las principales limitantes de este estudio radica en la pérdida de pacientes, ya que de los 46 pacientes únicamente se cuenta con datos completos de 34, sin embargo, a pesar de no haber sido incluidos en el análisis, localizamos a 8 de los pacientes no incluidos, y 5 de ellos están vivos.

CONCLUSIONES

1. Existe una diferencia en la supervivencia de los pacientes con Sarcoma de Ewing cuando está localizado, y cuando hay metástasis al diagnóstico, siendo las metástasis pulmonares y a SNC de peor pronóstico en estos pacientes.
2. No encontramos diferencias significativas en cuanto al uso de tratamiento locorregional, ya sea cirugía, radical o de preservación, y/o radioterapia con el pronóstico de la enfermedad.
3. Se necesita realizar estudios citogenéticos y de biomarcadores para poder establecer el comportamiento biológico de la enfermedad y con esto poder brindar un tratamiento más adecuado a cada tipo de pacientes.
4. La detección oportuna de la enfermedad permitiría una mejora en la sobrevida, ya que el hallazgo de enfermedad metastásica al diagnóstico se relacionó de forma significativa con la sobrevida en los pacientes con Sarcoma de Ewing, por lo cual es pertinente hacer énfasis en medidas encaminadas al diagnóstico oportuno.
5. El pronóstico de la enfermedad continúa siendo sombrío, a pesar de los avances en el tratamiento que se han realizado a lo largo de los años, desde la llamada era prequimioterapia hasta los inicios de la terapia local combinada con la quimioterapia, por lo que ampliar en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad pudiera dar luz en la búsqueda de terapia blanco en este grupo de pacientes con el fin de mejorar la sobrevida.

ANEXOS.

ANEXO 1. Técnica de inmunohistoquímica

Se describe a continuación la técnica de inmunohistoquímica.

1. Desparafinar. Se coloca el bloque en la parrilla a 60°C por 30 minutos, se deja reposar en Xileno durante cinco minutos para retirar el exceso de parafina, se realizan posteriormente diez lavados con xileno, diez con alcohol absoluto, diez con alcohol al 70%, diez con alcohol al 50% y se escurren. Posteriormente se dejan en agua bidestilada durante un minuto para mantener húmedo. Finalmente permanece en TBS hasta por un día.
2. Recuperación. Se enjuaga en agua bidestilada por diez lavados y se escurre. Se sumerge en DIVA y con un vaso se pasa a la olla de 500ml con agua de garrafón y destilada hasta que la alarma complete el tiempo necesario. En ese momento la solución tendrá aspecto lechoso y se deberá sacar la olla junto con el recipiente para esperar que se temple con la temperatura ambiente en un aproximado de 20 minutos. Se escurre y sumerge en agua bidestilada, se realizan diez lavados más y se escurre. Finalmente pasa a TBS
3. Inmunohistoquímica. Del TBS se pasan a la IQ Kinetic (estufa) secando una por una. Deben estar en el primer cubo para mantener las laminillas húmedas. Se retira el exceso de agua con una gasa y se usa el pap pen, se colocan una a una en el IQ Kinetic para humectar con TBS. Se escurre.

Se aplica background sniper dropper bottle de una a tres gotas a 25°C, se lava y se enjuaga. Se aplican de una a tres gotas del anticuerpo primario por 30 a 60 minutos a 25°C y se enjuaga. Se aplica Match 1 Probe Dropper Bottle, Match 1 Universal HRP- Polymer Bottle y se retira de la estufa. Se aplica el revelador (DAB) 100 microlitros por laminilla de tres a cinco minutos y se enjuaga con agua bidestilada y se deja caer en un recipiente con cloro. Se carga la rejilla con las laminillas y se sumergen en hematoxilina por cinco minutos, se enjuaga con agua corriente. Finalmente regresa al tren para diez ciclos de lavado y escurrido con agua

bidestilada, alcohol al 50%, alcohol al 70%, alcohol absoluto y xileno, respectivamente.

4. Montaje. En cada laminilla se aplicará a la orilla una gota de Eco Mount para pegar el cubreobjetos y se deja secar al interperie.

ANEXO 2. HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

SARCOMA DE EWING. FACTORES PRONOSTICOS Y SOBREVIDA. EXPERIENCIA DE DIEZ AÑOS

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

SEXO: Femenino Masculino

EDAD AL DIAGNOSTICO: _____ **AÑOS**

DIAGNÓSTICO DEL PACIENTE _____

FECHA DEL DIAGNÓSTICO |__|_| - |__|_|_| - |__|_|_|_|_|
 dd mmm aaaa

FECHA DE ULTIMA CITA |__|_| - |__|_|_| - |__|_|_|_|_|
 dd mmm aaaa

FECHA DE DEFUNCION |__|_| - |__|_|_| - |__|_|_|_|_|
 dd mmm aaaa

FECHA DE RECAIDA |__|_| - |__|_|_| - |__|_|_|_|_|
 dd mmm aaaa

LOCALIZACION DEL TUMOR

EXTENSION DE LA ENFERMEDAD

METASTASICA |__|

NO METASTASICA |__|

SITIO _____

EXPRESION DE:

Ki 67 _____

p 53 _____

HER-2 _____

TRATAMIENTO UTILIZADO (ESQUEMAS DE QUIMIOTERAPIA)

RADIOTERAPIA (DOSIS)

CIRUGIA (TIPO)

TAC DE TORAX AL DIAGNOSTICO

COMPLICACIONES DEL TRATAMIENTO

NEFROTOXICIDAD

MIELOSUPRESION

INFECCIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ¹ Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, et al. Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study group. *J Clin Oncol* 2000;18:3108-3114
- ² Kissane JM, Askin FB, Foulkes M, et al. Ewing's sarcoma of bone: clinicopathologic aspects of 303 cases from the Intergroup Ewing's Sarcoma Study. *Hum Pathol* 1983;14:773-779.
- ³ Pizzo P, Poplack. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Lippincot Williams & Wilkins; 2006: 1002-1032.
- ⁴ Juárez-Ocaña S, González-Miranda G, Mejía-Aranguré JM, Rendón-Macías ME, Martínez-García Mdel C, Fajardo-Gutiérrez A. Frequency of cancer in children residing in Mexico City and treated in the hospitals of the Instituto Mexicano del Seguro Social (1996-2001). *BMC Cancer*. 2004 Aug 13;4:50.
- ⁵ Fajardo-Gutiérrez A, Juárez-Ocaña S, González-Miranda G, Palma-Padilla V, Carreón-Cruz R, Ortega-Alvárez MC, Mejía-Aranguré JM. Incidence of cancer in children residing in ten jurisdictions of the Mexican Republic: importance of the Cancer registry (a population-based study). *BMC Cancer*. 2007 Apr 19;7:68.
- ⁶ Haeusler A. The Value of local treatment in patients with primary, disseminated, multifocal Ewing Sarcoma. *Cancer* 2010
- ⁷ Ladenstein R, Lasset C, Pinkerton R, et al. Impact of megatherapy in children with high-risk Ewing's tumours in complete remission: a report from the EBMT Solid Tumour Registry. *Bone Marrow Transplant*. 1995;15:697-705.
- ⁸ Ambros I.M, Strehl S, et al. MIC2 is a specific marker for Ewing Sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer*, 1991; 67: 1886-1893.
- ⁹ Aryee DNT, Sommergruber W, Muehlbacher K, Dockhorn-Dworniczak B, Zoubek A, Kovar H. Variability in gene expression patterns of Ewing tumor cell lines differing in EWS-FLI1 fusion type. *Lab Invest* 80 200;12:1833-44, 2000
- ¹⁰ Scotlandi K, Benini S, et al. Insuline like grow factor I receptor mediated circuit in Ewing's Sarcoma/peripheral neuroectodermal tumor: a possible therapeutic target. *Cancer res*; 1996: 86; 1806-1814.
- ¹¹ Sierrasesúmaga. *Tratado de oncología pediátrica*. Pearson Prentice Halla.; 2006: 617-636.
- ¹² Parham DM, Dias P, Kelly DR, Rutledge JC, Houghton P. Desmin positivity in primitive neuroectodermal tumors of childhood. *Am J Surg Pathol*. 1992 May;16(5):483-92.
- ¹³ Kovar H. Progress in the molecular biology of Ewing tumors. *Sarcoma* 1998;2:3-17.
- ¹⁴ Lee G, Kim H, Elkabetz Y, Al Shamy G, Panagiotakos G, Barberi T et al. Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 1468–1475.
- ¹⁵ Scotlandi K, Remondini D, Castellani G, Manara MC, Nardi F, Cantiani L et al. Overcoming resistance to conventional drugs in Ewing sarcoma and identification of molecular predictors of outcome. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2209–2216

-
- ¹⁶ Toomey EC, Schiffman JD, Lessnick SL. Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Oncogene* 2010 12;29(32):4504-16.
- ¹⁷ Lietman SA, Joyce MJ. Bone sarcomas: Overview of management, with a focus on surgical treatment considerations. *Cleve Clin J Med.* 2010;77: S8-12.
- ¹⁸ de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA, Huvos AG, Pardo-Mindán FJ, Healey JH, Ladanyi M. Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer* 2000, 15;89:783-92.
- ¹⁹ Stavropoulos NE, Filiadis I, Ioachim E, Hastazeris K, Tsimaris I, Kalogeras D et al. Prognostic significance of p53, bcl-2 and Ki-67 in high risk superficial bladder cancer. *Anticancer Res.* 2002;22:3759-3764.
- ²⁰ Moyano Calvo JL, Blanco Palenciano E, Beato Moreno A, Gutiérrez González M, Pérez-Lanzac Lorca A, Samaniego Torres A, Montañó JA, Castiñeiras Fernández J. Cadherina E, Catenina Beta, Antígeno Ki-67 y proteína p53 en el pronóstico de la recidiva tumoral en los tumores superficiales de vejiga. *Actas Urol Esp.* 2006;30:871-878.
- ²¹ Pitak-Arnop P, Bellefqih S, Bertolus C, Chaine A, Dhanuthai K, Gruffaz F, Bertrand JC. Ewing's sarcoma of jaw bones in adult patients: 10-year experiences in a Paris university hospital. *J Craniomaxillofac Surg* 2008; 36: 450-5.
- ²² Pindzola JA, Palazzo JP, Kovatich AJ, Tuma B, Nobel M. Expression of p21WAF1/CIP1 in soft tissue sarcomas: a comparative immunohistochemical study with p53 and Ki-67. *Pathol Res Pract.* 1998;194:685-91.
- ²³ Ahmed A, Gilbert-Barness E, Lacson A. Expression of c-kit in Ewing family of tumors: a comparison of different immunohistochemical protocols. *Pediatr Dev Pathol* 2004;7:342-7.
- ²⁴ Amir G, Issakov J, Meller I, Sucher E, Peyser A, Cohen IJ, Yaniv I, Ben Arush MW, Tavori U, Kollender Y, Ron N, Peylan-Ramu N. Expression of p53 gene product and cell proliferation marker Ki-67 in Ewing's sarcoma: correlation with clinical outcome. *Hum Pathol* 2002 ;33: 170-4.
- ²⁵ Scotlandi K, Manara MC, Hattinger CM, Benini S, Perdichizzi S, Pasello M, Bacci G, Zanella L, Bertoni F, Picci P, Serra M. Prognostic and therapeutic relevance of HER2 expression in osteosarcoma and Ewing's sarcoma. *Eur J Cancer.* 2005 Jun;41(9):1349-61.
- ²⁶ Zhou Z, Jia SF, Hung MC, Kleinerman ES. E1A sensitizes HER2/neu-overexpressing Ewing's sarcoma cells to topoisomerase II-targeting anticancer drugs. *Cancer Res.* 2001 Apr 15;61(8):3394-8.
- ²⁷ Wang SC, Zhang L, Hortobagyi GN, Hung MC. Targeting HER2: recent developments and future directions for breast cancer patients. *Semin Oncol.* 2001 Dec;28(6 Suppl 18):21-9.
- ²⁸ Wang SC, Hung MC. HER2 overexpression and cancer targeting. *Semin Oncol.* 2001 Oct;28(5 Suppl 16):115-24.
- ²⁹ Oberlin O, Deley MC, Bui BN, et al. Prognostic factors in localized Ewing's tumours and peripheral neuroectodermal tumours: the third study of the French Society of Paediatric Oncology (EW88 study). *Br J Cancer.* 2001;85:1646-1654.
- ³⁰ Rodriguez-Galindo C, Spunt SL, Pappo AS. Treatment of Ewing sarcoma family of tumors: current status and outlook for the future. *Med Pediatr Oncol.* 2003;40:276-287.

-
- ³¹ Wunder JS, Paulian G, Huvos A, et al. The histological response to chemotherapy as a predictor of the oncological outcome of operative treatment of Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:1020
- ³² Halperin, Perez, Brady. Principles and practice of radiation oncology. 5 ed. Lippincott, Williams & Wilkins; 345-367.
- ³³ Parasuraman S, Langston J, Rao BN, Poquette CA, Jenkins JJ, Merchant T, Cain A, Pratt CB, Pappo AS. Brain metastases in pediatric Ewing sarcoma and rhabdomyosarcoma: the St. Jude Children's Research Hospital experience. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1999;21(5):370-7.
- ³⁴ Paulino AC, Mai WY, Teh BS. Radiotherapy in Metastatic Ewing Sarcoma. *Am J Clin Oncol.* 2012 ; 27
- ³⁵ Kebudi R, Ayan I, Görgün O, Ağaoğlu FY, Vural S, Darendeliler E. Brain metastasis in pediatric extracranial solid tumors: survey and literature review. *J Neurooncol.* 2005;71(1):43-8.
- ³⁶ van Maldegem AM, Hogendoorn PC, Hassan AB. The clinical use of biomarkers as prognostic factors in Ewing sarcoma. *Clin Sarcoma Res.* 2012; 8;2(1):7.
- ³⁷ Burdach S, et al. Allogeneic and autologous stem-cell transplantation in advanced Ewing tumors. An update after long-term follow-up from two centers of the European Intergroup study EICESS. Stem-Cell Transplant Programs at Düsseldorf University Medical Center, Germany and St. Anna Kinderspital, Vienna, Austria. *Ann Oncol.* 2000 ;11(11):1451-62.
- ³⁸ Dunst J, Schuck A. Role of radiotherapy in Ewing tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2004 ;42(5):465-70.