



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EMPLEO DE LA TRANSCRIPCIÓN INVERSA Y REACCIÓN DE
POLIMERASA EN CADENA (RT-PCR) PARA PRECISAR EL DIAGNÓSTICO
DE TUMORES DE CÉLULAS PEQUEÑAS REDONDAS Y AZULES EN
NIÑOS, Y SU VALORACIÓN INICIAL PARA DETERMINAR ENFERMEDAD
RESIDUAL MÍNIMA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
ABUNDES RAMÍREZ MARCO ANTONIO

Directora de tesis: Dra. M. Verónica Ponce Castañeda

Asesor interno: Q.F.B. Patricia Vidal Millán

Junio 2010





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.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del CMN SXXI del IMSS y en el Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Patología del Hospital Infantil de México Dr. Federico Gómez de la SSA.

Con apoyo otorgado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Fondo Sectorial de Salud 2005-13996.

Bajo la Dirección de la Dra. En Ciencias Biomédicas Martha Verónica Ponce Castañeda y la asesoría de la Q. F. B. Patricia Vidal Millán.

DEDICATORIA

Bueno para empezar ya saben que yo soy “seco” pero aun así, en especial dedico no solo esta tesis si no toda mi formación profesional a mi mamá Rossy y a mi papá Toño, por el amor, confianza y apoyo que siempre me han dado, gracias por todo.

A mis hermanas hermanas Chabe y Fanny, por que ellas también son el orgullo de la familia.

A mi noviecita Deissy por el apoyo que me ha dado desde el primer momento y por todo el tiempo que hemos estado juntos.

También incluyo en esta dedicatoria a todos los que de alguna manera se han preocupado por mí: mis 3 abuelitas, mis tías y tíos, etc.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a la Dra. Verónica Ponce por su enseñanza y por haberme dejado participar en este proyecto, que me ha servido para poner en práctica los conocimientos adquiridos en mi formación profesional y para darme cuenta de los grandes aportes que se pueden hacer con estos proyectos.

A la M en C. Pilar Eguía y a la M en C. Adriana Hernández y por su tiempo, por las técnicas y conocimientos que de ellas aprendí.

A los Servicios de Oncología y Patología tanto del HIM como del Hospital de Pediatría del IMSS.

A mis sinodales: la Mtra. Patricia Vidal, la Dra. Raquel Retana, el Dr. Rubén Marroquín y el Mtro. Pablo Juárez, por los conocimientos y motivación que de ellos recibí en sus cátedras, y que me han sido de gran ayuda en este proyecto.

A mis compañeros: Josefina, Humberto y Paulina por hacer agradable el trabajo en el laboratorio, en especial a Josefina por la ayuda en la búsqueda de pacientes, así como en la toma de muestra y entrevistas realizadas.

A la familia de los pacientes afectados con estos tipos de tumores, por aceptar participar incondicionalmente en el estudio. Pero sobre todo a los más importantes; a los niños y niñas que desafortunadamente tienen esta enfermedad, por el aprendizaje que me dejan al ver como luchan por salir adelante a pesar de tener todo en contra.

ÍNDICE	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO	
3.1 Cáncer definición biológica	4
3.2 Panorama epidemiológico nacional	5
3.3 Clasificación del cáncer pediátrico	5
3.4 Tumores de células redondas azules y pequeñas (TCRAP)	6
3.5 Translocaciones cromosómicas	7
3.6 Conceptos generales de la biología de las translocaciones cromosómicas	7
3.7 Tipos de sarcomas con translocaciones específicas	
3.7.1 Rbdomiosarcoma alveolar	9
3.7.2 Sarcoma de Ewing y Tumor Neuroectodermico Primitivo	9
3.7.3 Sarcoma sinovial	10
3.7.4 Tumor Desmoplásico de células redondas y pequeñas	10
3.8 Transcripción reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la polimerasa. (RT-PCR)	10
3.9 Enfermedad residual mínima (ERM)	11
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
5. OBJETIVOS	
4.1 Generales	13
4.2 Particulares	13
6. HIPÓTESIS	14
7. MÉTODO	
7.1 Tipo de estudio	15
7.2 Población	15
7.3 Criterios de inclusión	15
7.4 Criterios de exclusión	15
7.5 Procedimiento	16
7.5.1 Extracción de ARN de Tejido fijado en formol- parafina	16
7.5.2 Extracción de ARN de Tejido congelado y muestra de sangre periférica	16
7.5.3 Amplificación de los genes involucrados en las translocaciones por RT-PCR	17
8. RESULTADOS	
8.1 Casos incorporados	19
8.2 Clasificación por categorías histopatológicas	20
8.3 Comparación entre el diagnóstico histopatológico y los hallazgos moleculares	20
8.3.1 Sarcoma de Ewing o tumor neuroectodérmico primitivo t (11;22) EWS-FLI, t(21,22) EWS-ERQ	21
8.3.2 Rbdomiosarcoma alveolar t(2;13) y t(1;13) PAX3/7- FKHR	23
8.3.3 Sarcoma Sinovial t(X;18) SYT-SSSX	23
8.4 Análisis de discordancia	24
8.4.1 Otras categorías histopatológicas con hallazgos moleculares	25
8.5 Ensayo del panel completo en muestras de sangre	26
8.6 Resultados del análisis molecular en las muestras de sangre tomadas periódicamente.	26

8.6.1 SE/TNEP t(11;22)EWS – FLI, t (21;22) EWS-ERG	29
8.6.2 ARMS t(2;13) PAX3/7- FKHR	30
8.6.3 SS t(X;18) SYT-SSSX	30
9. DISCUSIÓN	
9.1 Concordancia-discordancia entre categorías histopatológicas y hallazgos moleculares	31
9.2 Translocaciones variantes en él SE/TNEP	31
9.3 Muestras tumorales con translocaciones negativas	31
9.4 Translocaciones en sangre periférica	32
9.5 Presencia continua de translocaciones en sangre	33
9.6 Ausencia continua de translocaciones en sangre	33
9.7 Ausencia- Presencia de translocaciones en sangre	33
9.8 Presencia-Ausencia de translocaciones en sangre	34
9.9 Pacientes fallecidos durante el estudio	34
10. CONCLUSIÓN	35
11. PROPUESTAS- RECOMENDACIONES	36
12. GLOSARIO	37
13. REFERENCIAS	40

1. RESUMEN.

Los tumores de células pequeñas, redondas y azules, entre los que se incluyen: el sarcoma de Ewing, tumor neuroectodérmico primitivo, rabdomiosarcoma alveolar, sarcoma sinovial y el tumor desmoplásico de células redondas y pequeñas, comparten características morfológicas muy similares, y no siempre es posible discriminarlos lo cual representa un desafío clínico importante ya que el tratamiento depende del diagnóstico histopatológico preciso. Se han descrito translocaciones cromosómicas específicas, recurrentes y transcricionalmente activas en este tipo de tumores. La posibilidad de detectar los transcritos quiméricos analizando el RNA de tejidos tumorales y muestras de sangre periférica con la transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), ofrece la oportunidad de aportar criterios moleculares de ayuda para establecer el diagnóstico diferencial, así como detectar células tumorales circulantes, lo cual es útil para dar un factor pronóstico.

Objetivo

Empleando RT-PCR identificar las translocaciones: SS t(X;18), SE/TNEP t(11;22) o t(21;22), ARMS t(1;13) o t(2,13), TDCRP t(11;22) para correlacionar estos hallazgos moleculares con los diagnósticos histopatológicos de pacientes afectados y posiblemente identificarlas también en sangre periférica.

Material y Métodos.

42 pacientes diagnosticados entre el 2007 y 2010 con alguno de los tumores mencionados. RNA tumoral y muestras de sangre periférica. Ensayo enzimático RT-PCR específica para cada translocación.

Resultados

En 25 casos se identificó alguna translocación, en 17 pacientes no se detectó ninguna translocación. De los 25 casos con translocación identificada, 6 (24 %) son incongruentes con el diagnóstico histopatológico. Fue posible detectar translocaciones positivas en células circulantes en la toma de 7 pacientes, en 14 pacientes se detectaron translocaciones positivas en sangre periférica en al menos una muestra tomada periódicamente

Conclusiones

Ha sido posible identificar alguna translocación en tejido tumoral primario en 60% de los casos y en sangre periférica en el 56% de los pacientes, por lo que estos datos moleculares pueden ayudar a diferenciar este grupo de tumores y a dar un factor pronóstico.

2. INTRODUCCIÓN.

El cáncer es una enfermedad multifactorial, genéticamente puede dar origen a mutaciones de las células somáticas y/o germinales. Estas alteraciones le confieren a la célula propiedades de proliferación descontrolada al ser favorecidas por la selección natural originan tumores y producen metástasis. Lamentablemente, cuando un tumor es detectado por primera vez, ya contiene más de mil millones de células. La mayoría de las células de los tumores más comunes contienen aberraciones y reorganizaciones cromosómicas.

Los tumores malignos se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir del cual se originan.

Las neoplasias en los niños son diferentes a las de los adultos. Los casos de cáncer en el grupo pediátrico solo ocupa aproximadamente el 5% del total de tumores malignos en la población. En los menores de 15 años, 92% son de tipo no epitelial y 8% de tipo epitelial; en contraste en adultos de entre 30 a 45 años los tumores de tipo epitelial alcanzan una frecuencia de 80% la cual llega a ser hasta de 90% en edades más avanzadas. Debido a esto desde 1987 se estableció una clasificación para agrupar las diferentes neoplasias en los niños, que es más congruente con estas diferencias biológicas. México tiene un perfil de transición epidemiológica, esto quiere decir que dentro de los problemas de salud más importantes se encuentran tanto las enfermedades asociadas al subdesarrollo económico como las infecciones y también enfermedades más características de países desarrollados como el cáncer. Al comparar las diferentes enfermedades que influyen en la mortalidad entre los niños mexicanos, el cáncer es ya un problema de salud importante. Ocupa el cuarto lugar como causa de muerte en el grupo de 1 a 4 años de edad y el segundo lugar en el grupo de 5 a 14 años. Los sarcomas de hueso y tejidos blandos son un grupo heterogéneo y poco frecuente de tumores. Suponen menos del 5% de todas las neoplasias en pacientes adultos, y aproximadamente de un 10 a 15% de los tumores infantiles. En este grupo se incluyen rhabdomiomas, tumor neuroectodérmico primitivo periférico, sarcoma de Ewing, tumor desmoplásico de células pequeñas y sarcoma sinovial. Estos tumores comparten características morfológicas muy semejantes, por lo que su diagnóstico debe ser precisado por estudios de inmunohistoquímica. Sin embargo estos estudios no siempre son concluyentes, lo que representa un problema muy serio ya que el tratamiento y manejo oncológico del paciente depende del diagnóstico histopatológico preciso.

La descripción de translocaciones cromosómicas específicas durante los últimos 20 años en este tipo de tumores, ha abierto una oportunidad para precisar el diagnóstico y por lo tanto el manejo de este grupo de pacientes. En el caso de los sarcomas mencionados anteriormente cuya apariencia morfológica es muy parecida, se han identificado translocaciones características

correspondientes a cada categoría morfológica. Las consecuencias de estas translocaciones es la generación de genes quiméricos transcripcionalmente activos con funciones nuevas que se ven involucradas en los mecanismos oncogénicos. Debido a que estas translocaciones son recurrentes, específicas y transcripcionalmente activas, es posible la detección de células tumorales a partir de RNA de tejido tumoral y/o sangre periférica. Desde el punto de vista clínico son útiles ya que pueden usarse como marcadores para el diagnóstico diferencial y potencialmente pueden servir para el monitoreo de las células tumorales en circulación.

Para detectar estas translocaciones se utilizan técnicas de biología molecular las cuales son altamente sensibles, por lo que a pesar de contar a veces con una biopsia pequeña, o con morfología distorsionada y o concluyente bajo el microscopio, las células tumorales conservan las alteraciones moleculares básicas, su detección puede ofrecer un criterio molecular para ayudar a establecer un diagnóstico.

La transcripción reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena, RT-PCR es el método más empleado para la detección de translocaciones que resultan en la fusión de dos genes cuyo gene quimérico resultante es transcripcionalmente activo en muestras clínicas. La RT-PCR es sensible y específica, permite la detección de una célula tumoral dentro de una población de 10^4 - 10^6 células normales, en contraste usando técnicas de análisis microscópico se identifica una célula tumoral en un contexto de 100 células normales. Por esta razón la determinación mediante RT-PCR de la presencia de células con transcritos quiméricos tiene una aplicación clínica de indudable potencial. Teniendo en cuenta que la metástasis ocurre por migración de las células tumorales a través del sistema linfático o del torrente circulatorio, y la sensibilidad de la RT-PCR, se pueden detectar células tumorales en sangre periférica, lo cual es útil para dar un factor pronóstico.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1 CÁNCER DEFINICIÓN BIOLÓGICA.

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por la proliferación descontrolada de las células de un órgano: genéticamente puede dar origen a mutaciones de las células somáticas y/o germinales. Para que una célula pueda causar cáncer, a medida que va evolucionando ha de ir adquiriendo una gran cantidad de propiedades y habilidades anormales. Distintos cánceres requieren combinaciones distintas de estas propiedades. Sin embargo, se ha establecido una lista corta de rasgos generales que son clave para las células cancerosas:

- 1 Ignorar las señales internas y externas que regulan la proliferación celular
- 2 Evitar la muerte celular programada (apoptosis)
- 3 Evadir las limitaciones programadas para la proliferación, eludiendo la senescencia replicativa y evitando o limitando la diferenciación
- 4 Ser genéticamente inestables
- 5 Escapar de sus tejidos primarios (es decir, tener capacidad invasiva)
- 6 Sobrevivir y proliferar en entornos ajenos (poder formar metástasis)

Lamentablemente, cuando un tumor es detectado por primera vez, ya contiene más de mil millones de células. La mayoría de las células de los tumores más comunes contienen aberraciones y reorganizaciones cromosómicas (1).

Si la proliferación de una célula anormal está fuera de control, producirá un tumor o *neoplasma*- una masa de células anormales que crece de forma inexorable. Mientras las células neoplásicas permanezcan agrupadas en una masa única, se dice que el tumor es **benigno**. Un tumor se considera **maligno**, si sus células tienen la capacidad de invadir el tejido circundante. La capacidad invasora también implica, generalmente, la habilidad de liberarse, entrar en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos, y formar tumores secundarios o **metástasis** en otros lugares del cuerpo (1).

Los tumores malignos se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular a partir del cual se originan. Los que derivan de células epiteliales se denominan **carcinomas** y los que derivan de tejido conjuntivo o fibras musculares **sarcomas**. Otros tipos de tumores son las diversas formas de **leucemia**, derivadas de células hematopoyéticas, y los tumores derivados del sistema nervioso (TSNC).

3.2 PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO NACIONAL.

El estudio de las neoplasias en niños comprende los casos de cáncer que se presentan en el grupo de menores de 15 años. A pesar de que las neoplasias en los menores de 15 años solo representan entre 1 y 5% del total de las neoplasias en la población, existen razones éticas y de salud pública importantes que justifican su investigación. En algunos países, las neoplasias han llegado a constituir la segunda causa de mortalidad en la población infantil. Al comparar las diferentes enfermedades que influyen en la mortalidad entre los niños mexicanos, el cáncer es ya un problema de salud importante. Ocupa el cuarto lugar como causa de muerte en el grupo de 1 a 4 años de edad y el segundo lugar en el grupo de 5 a 14 años (2). En los menores de un año predominan los tumores embrionarios (meduloblastoma, retinoblastoma, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, tumor de Wilms y hepatoblastoma, principalmente). En el grupo de 1 a 4 años predominan las leucemias, sobre todo la linfoblástica aguda; también son frecuentes los tumores renales, los TSNC y algunos linfomas. En el grupo de 5 a 9 años, nuevamente predominan las leucemias, aumentan los linfomas (entre los cuales predomina la enfermedad de Hodgkin) y se inicia la presentación de los tumores óseos. En el grupo de 10 a 14 años continúa el predominio de las leucemias, pero aumenta la frecuencia de los linfomas y los tumores óseos (2). No existen aún datos nacionales sobre tasas de incidencia, y las tasas de mortalidad son la aproximación más cercana con que se cuenta en el país para estimar la dimensión del problema.

3.3 CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER PEDIÁTRICO.

Las neoplasias en los niños son diferentes a las de los adultos. En los menores de 15 años, 92% son de tipo no epitelial y 8% de tipo epitelial; en contraste en adultos de entre 30 a 45 años los tumores de tipo epitelial alcanzan una frecuencia de 80% la cual llega a ser hasta de 90% en edades más avanzadas. Debido a esto desde 1987 se estableció una clasificación para agrupar las diferentes neoplasias en los niños, que es más congruente con estas diferencias biológicas. Esta clasificación se basa en su aspecto histológico y no en la región topográfica en donde se desarrolla la neoplasia, que es el criterio utilizado para clasificar las neoplasias de los adultos (2).

Las diferentes neoplasias pediátricas se agrupan de acuerdo a la Clasificación Internacional para Cáncer en el Niño (CICN), que son recomendaciones emitidas por la International Agency for Research on Cancer (IARC). Se basa en la clasificación internacional de enfermedades oncológicas y los grupos diagnósticos se definen principalmente en términos de su morfología para facilitar su registro y estudio. Comprende 12 grupos como se muestran en la tabla 1, lo cual es más adecuado ya que considera las particularidades biológicas de los tumores pediátricos.

En contraste las neoplasias del adulto se agrupan principalmente de acuerdo al lugar en donde se desarrolla el tumor y para su clasificación se usa la **Clasificación Internacional de las Enfermedades Oncológicas (CIEO)** en su 9ª o 10ª revisión (2).

I. Leucemias	VII. Tumores hepáticos
II. Linfomas (Enfermedad de Hodgkin y Linfomas no Hodgkin)	VIII. Tumores óseos
III. Tumores del sistema nervioso central	IX: Tumores de los tejidos blandos
IV. Tumores del sistema nervioso simpático	X. Tumores de células germinales, trofoblásticas y otras neoplasias gonadales
V. Retinoblastoma	XI. Carcinomas y otras neoplasias epiteliales malignas
VI. Tumores renales	XII. Otras neoplasias inespecíficas

Tabla 1. Clasificación Internacional para Cáncer en el Niño (CICN) (3).

3.4 TUMORES DE CELULAS REDONDAS, AZULES Y PEQUEÑAS (TCRAP).

Los tumores de células redondas, azules y pequeñas se caracterizan por tener células ligeramente más largas o del doble de tamaño que los eritrocitos cuando se observan en un frotis. Citológicamente, estos tumores están compuestos por una población casi uniforme de células de redondas a ovals con un ligero citoplasma basófilos (4, 5). Son un grupo de tumores que se presentan principalmente en los niños, se encuentran dispersos en los grupos VIII y IX de la clasificación pediátrica, es decir Tumores óseos y Tumores de los tejidos blandos. Datos epidemiológicos del IMSS señalan que estos tumores presentan una frecuencia general del 6.2 y 6.8 % respectivamente y presentan una tasa de mortalidad de 3.2×10^6 y 3.6×10^6 (2). En este grupo se incluyen rhabdomyosarcomas, tumor neuroectodérmico primitivo periférico, sarcoma de Ewing, tumor desmoplásico de células pequeñas y sarcoma sinovial. Estos tumores comparten características morfológicas muy semejantes, por lo que su diagnóstico debe ser precisado por estudios de inmunohistoquímica. Sin embargo estos estudios no siempre son concluyentes, lo que representa un problema muy serio ya que el tratamiento y manejo oncológico del paciente depende del diagnóstico histopatológico preciso. La descripción de translocaciones cromosómicas específicas durante los últimos 20 años en este tipo de tumores, ha abierto una oportunidad para precisar el diagnóstico y por lo tanto el manejo de este grupo de pacientes.

3.5 TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS.

Aunque inicialmente se pensaba que las translocaciones recurrentes solo ocurrían en tumores del sistema hematopoyético, en investigaciones posteriores se han identificado una serie de translocaciones no aleatorias en sarcomas (6). Desde el punto de vista molecular los sarcomas se pueden agrupar en dos tipos principales:

(a) Con translocaciones específicas y recurrentes que originan fusiones génicas (p.ej la t(11;22) que conduce a la fusión EWS-FLI1 en el tumor de Ewing), y

(b) Con alteraciones génicas inespecíficas y cariotipos muy complejos, con ganancias y pérdidas muy numerosas (7).

La identificación de las translocaciones específicas ha abierto tres áreas relevantes en la investigación oncológica:

1. Investigación de la etiología molecular de esos tumores.
2. Identificación de nuevos marcadores útiles para el diagnóstico y monitoreo.
3. Desarrollo de un enfoque terapéutico contra blancos específicos del tumor.

3.6 CONCEPTOS GENERALES DE LA BIOLOGÍA DE LAS TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS.

Las translocaciones cromosómicas pueden tener dos consecuencias generales, 1) conducir a la yuxtaposición de la región codificante de un gene junto o cerca de la región reguladora de otro gene como se ilustra en la Fig.1, este evento conduce a la sobreexpresión o expresión aberrante de uno de los dos genes, 2) puede resultar en la formación de un gen quimérico transcripcionalmente activo con funciones novedosa Fig.2. Además y de modo sobresaliente los genes quiméricos pueden ser usados como marcadores moleculares de las células que poseen esta alteración genética ya que son transcripcionalmente activos (8).

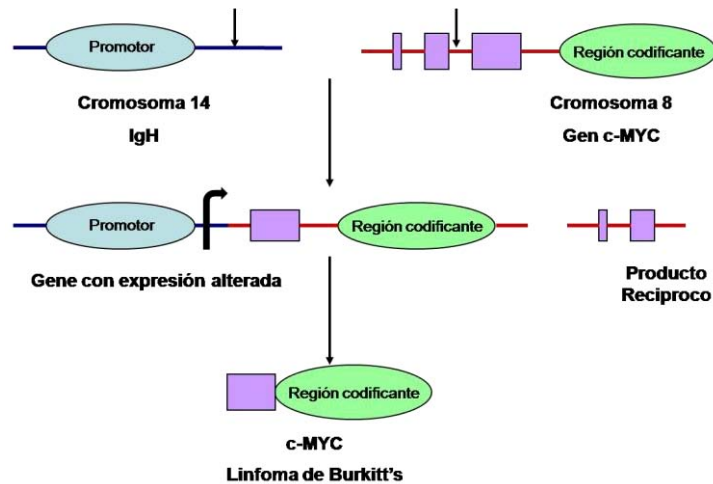


Fig.1. El linfoma de Burkitt se caracteriza por la presencia de la t (8; 14) entre el oncogén c-MYC en el cromosoma 8 y el loci IgH en el cromosoma 14. Provocando la fusión de la región codificante del proto oncogén c-myc con la región reguladora de la IgH, lo cual pone a c-myc bajo el control de los elementos reguladores de la IgH. La expresión del gen MYC aumenta debido al reposicionamiento cerca de los genes de la IgH que se transcriben activamente en las células B (8, 9). Estos cambios conducen a que el gene C-MYC promueva la desregulación y transformaciones celulares a través de sus efectos sobre el ciclo celular, diferenciación, y la apoptosis (10).

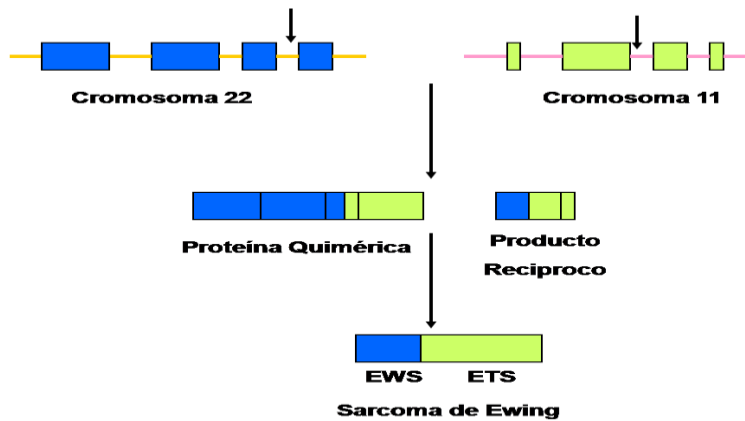


Fig.2. El Sarcoma de Ewing se caracteriza por la presencia de la fusión entre el gen EWS y los genes FLI o ERG, ambos genes son factores de transcripción. La proteína quimérica resultante actúa como un factor de transcripción aberrante (8, 10).

La mayor parte de las proteínas quiméricas resultantes de la fusión génica son generalmente factores de transcripción, es decir, proteínas con capacidad de unión a las regiones de DNA reguladoras de la transcripción de otros genes, estos están habitualmente implicados en funciones clave para la célula, como la proliferación o la supervivencia celular. Sin embargo existen también otras fusiones que involucran genes con funciones catalíticas dando lugar a la formación de cinasas quiméricas (ej. Fibrosarcoma congénito) (6).

En el caso de los sarcomas pediátricos pertenecientes a los tumores de células pequeñas redondas y azules cuya apariencia morfológica es muy parecida, se han identificado translocaciones distintivas resultando en fusiones quiméricas específicas de genes como se ilustra en la tabla 2. Cada fusión del gene está presente en una categoría específica de sarcoma y no se asocia con otro tipo de ellos, esto le confiere propiedades de consistencia y especificidad.

Estas características indican que las translocaciones representan pasos genéticos fundamentales en el desarrollo de esos tumores, y además son potencialmente útiles como marcadores para el diagnóstico y monitoreo de esos tumores (6).

Tumor	Translocación	Fusión	Prevalencia estimada
SE/TNEP	t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1	85%
	t(21;22)(q22;q12)	EWS-ERG	5%
TDCRP	t(11;22)(p13;q12)	EWS- WT1	>90%
SS	t(X;18)(p11.23;q11)	SYT-SSX1	65%
	t(X;18)(p11.21;q11)	SYT-SSX2	65%
ARMS	t(2;13)(q35;q14)	PAX3- FKHR	72%
	t(1;13)(q36;q14)	PAX7- FKHR	9%

Tabla 2. Fusión de genes en sarcomas.

SE= Sarcoma de Ewing; TNEP=tumor neuroectodérmico primitivo; TDCRP = tumor desmoplásico de células redondas y pequeñas; SS= sarcoma sinovial; ARMS = rhabdomyosarcoma alveolar (del inglés Alveolar Rhabdomyosarcoma) (6).

3.7 TIPOS DE SARCOMAS CON TRANSLOCACIONES ESPECÍFICAS.

3.7.1 Rhabdomyosarcoma alveolar: t (2; 13) y t (1; 13).

Pertenece a una familia de tumores que aparecen en pacientes pediátricos y están relacionados con tejido músculo esquelético (8). El rhabdomyosarcoma alveolar se asocia a una translocación recurrente en más del 70% de los casos, involucrando los cromosomas 2 y 13. Una variante de esta translocación se encuentra presente en menos del 10% de los casos e involucra los cromosomas 1 y 13. El resultado de estas dos variantes es un gene quimérico, fusionando respectivamente los genes PAX3 o PAX7, que son factores de transcripción que actúan al inicio de la cascada de regulación miogénica teniendo un papel crucial en la orquestación de la miogénesis ,con el gene FKHR situado en el cromosoma 13 (7, 11).

3.7.2 Sarcoma de Ewing y Tumor Neuroectodérmico Primitivo t (11; 22) y t (21; 22).

Es el segundo tumor primario de hueso más frecuente después del osteosarcoma, presente en niños y adultos jóvenes. Este se localiza en la parte media de los huesos, comúnmente en cadera, costillas, brazos y piernas (8). La translocación cromosómica t(11; 22) esta presente en el 85% de este sarcoma, involucrando al gen FLI. Los restantes 10 a 15% de casos de Sarcoma de Ewing presentan la t (21; 12) e involucra al gen ERG. Ambas translocaciones conducen a la fusión del gen EWS que codifica una proteína que se ve involucrada en la expresión de genes, el transporte y procesamiento de RNA; con el gen FLI que actúa como activador de la transcripción y el gen ERG de la familia de oncogenes ETS (8, 11). El descubrimiento de la fusión EWS-FLI condujo a la conclusión de que el Sarcoma de Ewing y el TNEP son neoplasias relacionadas (12).

3.7.3 Sarcoma sinovial t(x; 18) (p11; q11).

El sarcoma sinovial es un tumor que frecuentemente que ocurre cerca de las articulaciones de los brazos o piernas, pero también puede presentarse en cualquier otro sitio incluyendo sistema nervioso. La translocación cromosómica t(x; 18) descrita por Limon y col. (13) se encuentra en casi 80% de los sarcomas sinoviales, resultando en la fusión del gene SYT del cromosoma 18 con el gene SSX del cromosoma X (8, 14). Estas proteínas pueden funcionar como represores de la transcripción, lo que puede inducir a cambios en los patrones de expresión génica (7). En muchos casos de este tipo de tumor la t(x; 18) es la única anomalía cromosómica detectada, por lo cual es considerada como un evento primario de génesis tumoral (12, 15, 16).

3.7.4 Tumor Desmoplásico de células redondas y pequeñas t (11; 22) (p13; q12).

Se trata de un sarcoma primitivo con una producción excesiva de tejido conectivo, debido a una activación exagerada de los fibroblastos. En más del 90% de los casos se presenta una translocación entre los cromosomas 11 y 22 involucrando a los genes EWS que es el mismo gene involucrado en el sarcoma de Ewing y el gene WT1 (17). Como en muchos otros sarcomas se trata de un factor de transcripción aberrante, que modula la expresión de genes que coinciden parcialmente con las dianas habituales del gen WT1 involucradas en el desarrollo genitourinario (7).

3.8 TRANSCRIPCIÓN REVERSA ACOPLADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).

La transcripción reversa acoplada a la reacción de la polimerasa en cadena, *RT-PCR* es el método más empleado para la detección de translocaciones que resultan en la fusión de dos genes cuyo gene quimérico resultante es transcripcionalmente activo en muestras clínicas. La ventaja más sobresaliente de esta técnica consiste en que es posible la detección de estas translocaciones a partir del RNA tumoral ofreciendo un criterio que apoye la definición de la categoría diagnóstica, a pesar de contar a veces con una biopsia muy pequeña, ya que las células tumorales conservan las alteraciones moleculares básicas (7). Debido a que los puntos de ruptura de las translocaciones tienen lugar habitualmente en intrones, el resultado es que la estructura de la fusión a nivel del DNA genómico es bastante menos predecible que a nivel del RNA, involucrando regiones de DNA muy largas y variables, lo que agrega un nivel de complejidad considerable a la detección si se usa como estrategia únicamente el análisis de DNA mediante la PCR.

En contraste el RNA mensajero que contiene solamente los exones de la fusión génica, ya no contiene los intrones de cada uno de los genes implicados en la fusión y por lo tanto la longitud del fragmento a analizar es más pequeña y más factible de ser detectada empleando RT-PCR (7).

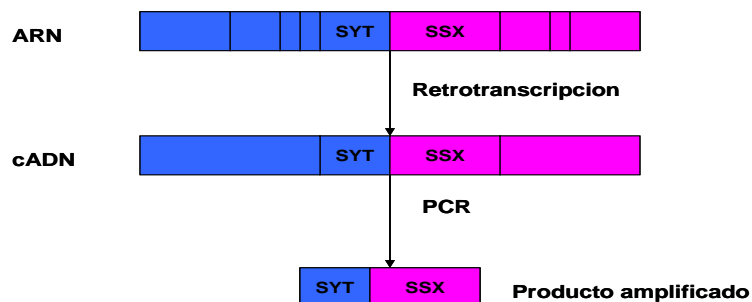


Fig.3. La técnica de la RT-PCR consiste en dos pasos. En el primero el RNA se retrotranscribe a cDNA y en el segundo se amplifica un segmento específico de cDNA que contiene la zona de fusión génica. Aquí se ejemplifica la fusión SYT-SSX característica del sarcoma sinovial.

3.9 ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA (ERM).

La enfermedad residual mínima consiste en la persistencia de células tumorales durante o después de finalizar el tratamiento, lo cual tiene significado pronóstico ya que puede predecir la recaída de la enfermedad (18). Debido a que la evaluación histopatológica de una muestra es exitosa identificando células tumorales solo cuando la relación mínima es aproximadamente de 1 en 100 células normales, los ensayos enzimáticos de amplificación usando RT-PCR y dirigidos a los productos de fusión mencionados, pueden incrementar la sensibilidad de detección de modo muy significativo. La detección por RT-PCR de células tumorales en sangre va de 1 en 10^4 a 10^6 células normales (7, 19, 20). Debido a lo anterior, estos ensayos tienen el potencial de identificar células tumorales a nivel submicroscópico, y con esto la posibilidad de:

1. Contribuir en la estadificación de la enfermedad al momento de la presentación.
2. Detectar células tumorales residuales circulantes después del tratamiento.
3. Identificar recaídas tempranamente después de la remisión.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los tumores de células pequeñas redondas y azules son un grupo de sarcomas que se presentan en los niños, entre los que se incluyen SE/TNEP, rhabdomyosarcoma alveolar, tumor desmoplásico de células pequeñas y sarcoma sinovial. Estos tumores comparten características histopatológicas por lo que su diagnóstico debe ser precisado por estudios de inmunohistoquímica e histopatológicos. Sin embargo estos estudios no siempre son concluyentes lo que representa un gran problema ya que el tratamiento del paciente depende del diagnóstico histopatológico preciso. Durante las últimas dos décadas se han descrito en estos tumores varias translocaciones cromosómicas que han sido caracterizadas a nivel de la actividad del transcrito quimérico resultante de cada translocación por RT-PCR. Cada una de estas translocaciones corresponde a una categoría específica de sarcoma.

De ahí que el empleo de la RT-PCR permitió identificar en el RNA de los tejidos tumorales los transcritos quiméricos específicos y usarlos como marcadores moleculares. Además de: apoyar el diagnóstico histopatológico del tumor primario, buscar estos marcadores moleculares (de las células tumorales) en sangre periférica al momento del diagnóstico inicial. Realizar un rastreo prospectivo periódico en sangre periférica de estos marcadores moleculares lo que permitirá evaluar su utilidad para monitorizar la respuesta del tumor al tratamiento y eventualmente iniciar vigilancia, así como detectar enfermedad residual mínima postratamiento y recidivas tempranamente.

5. OBJETIVOS.

5.1 GENERALES:

- Identificar mediante RT-PCR la presencia de alguna de las siguientes translocaciones: t(11;22) EWS-FLI, t(21;22) EWS-ERG, t(11;22) EWS-WT1, t(X;18) SYT-SSX, t(2;13) PAX3/7-FKHR en muestras de tumor primario y/o sangre periférica. En pacientes que ingresen para ser atendidos por los servicios de oncología tanto del Hospital de Pediatría del CMN SXXI del IMSS, como del Hospital Infantil de México Dr. Federico Gómez de la SSA, con sospecha diagnóstica de SE/TNEP, rhabdomyosarcoma alveolar, sarcoma sinovial o tumor desmoplásico de células redondas pequeñas.
- Una vez identificada la translocación presente en el tumor primario, llevar a cabo la RT-PCR exclusivamente con los oligonucleótidos correspondientes a la translocación identificada en el tumor primario, en el RNA extraído de sangre periférica colectada al momento de la presentación y cada 4 meses.

5.2 PARTICULARES:

- Extraer RNA a partir de tejido tumoral congelado y/o fijado en formol parafina.
- Extraer RNA a partir de leucocitos en sangre periférica de tomas periódicas cada 4 meses correspondiente a cada paciente.
- Correlacionar estos hallazgos moleculares con los diagnósticos histopatológicos correspondientes.
- Registrar presencia o ausencia de la translocación en sangre periférica.
- Realizar seguimiento del rastreo molecular en la sangre periférica de estos pacientes cada cuatro meses por los siguientes 12-24 meses.

6. HIPÓTESIS.

Al analizar RNA de tejidos tumorales y/o sangre periférica de niños con sospecha diagnóstica de algún tumor de células redondas azules y pequeñas (rabdomiosarcoma, SE/TNEP, tumor desmoplásico de células redondas y pequeñas, sarcoma sinovial), utilizando la reacción enzimática RT-PCR, encontraremos las translocaciones correspondientes e identificadas por otros grupos de estudio.

En un subgrupo de pacientes con los diagnósticos mencionados, encontraremos la translocación identificada en el tumor primario, presente en células de sangre periférica al momento de la presentación y en muestras sanguíneas periódicas tomadas cada cuatro meses.

7. MÉTODO.

7.1 TIPO DE ESTUDIO.

Observacional, prospectivo, longitudinal y descriptivo.

7.2 POBLACIÓN.

Tejidos tumorales congelados y/o fijados en formol- parafina así como las muestras de sangre periférica de pacientes diagnosticados histopatológicamente durante el período 2009-2010, con alguno de los tipos de sarcomas antes mencionados que fueron atendidos en los servicios de oncología del Hospital de Pediatría del Centro Medico Nacional Siglo XXI del IMSS y el Hospital Infantil de México, Dr. Federico Gómez de la SSA. Los padres de los pacientes afectados fueron informados sobre este estudio e invitados a participar a través de una carta de consentimiento informado de la cual ellos conservan una copia, y en ella se les informa en términos sencillos, los objetivos del trabajo y los posibles beneficios que se pueden derivar del estudio.

7.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Pacientes menores de 18 años con sospecha diagnóstica de SE/TNEP, rabdomiosarcoma alveolar, sarcoma sinovial o tumor desmoplásico de células redondas pequeñas. Que se presentaron en los Servicios de Oncología tanto del Hospital de Pediatría del CMN SXXI del IMSS como del Hospital Infantil de México, Dr. Federico Gómez de la SSA.
- Disponibilidad de tejido congelado y/o fijado en formol- parafina así como sangre para ser analizado.

7.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Que no se obtenga RNA útil a partir del tumor primario, que los padres no acepten participar en el estudio.

7.5 PROCEDIMIENTO.

7.5.1 Extracción de RNA a partir de Tejido fijado en formol- parafina.

Para los tejidos fijados en formol- parafina; se obtuvieron 4 secciones de 6 micras de cada bloque colocándolas en un tubo Eppendorf estéril. El material se lavo 2 veces con 1 mL de xileno manteniendo a 42°C para desparafinar, seguido de 3 lavados con etanol absoluto para remover el xileno; el tejido se resuspendió en 350µL de buffer de digestión (Tris-HCl pH 7.8 20mM, EDTA 10mM, SDS 1% en agua dietilpirocarbonatada (DEPC), proteinasa K 700µg) se mantuvo a 42°C un promedio de 48 horas.

El RNA se extrajo usando 600µL de reactivo Trizol® (fenol/isotiocianato de guanidina) y 700µL de una mezcla 1:1 de fenol- cloroformo se agito vigorosamente y se mantuvo a temperatura ambiente por 5 minutos. Después de centrifugar, la fase acuosa se coloco en un nuevo tubo Eppendorf, adicionando un volumen de isopropanol igual al recuperado de la fase acuosa y 2µL de glucógeno como coprecipitante, dejando a -20°C toda la noche. Después de centrifugar, el botón obtenido se lavo con 1mL de etanol al 75%. Después de centrifugar, el botón obtenido se resuspendió en 30µL de agua DEPC dando un tratamiento con DNasa siguiendo el protocolo para Turbo DNA-free™ de Ambion Inc.

7.5.2 Extracción de RNA a partir de Tejido congelado y muestra de sangre periférica.

Los tejidos congelados se homogenizaron disgregándolos en hielo seco o nitrógeno liquido, se pesaron y colocaron en un tubo Eppendorf estéril, agregando 1mL de Trizol® por cada 50 a 100 mg de tejido.

Se extrajeron aproximadamente 4 mL de sangre por venopunción en Tubos para Preparación Celular con Citrato de sodio como anticoagulante (BD Vacutainer® CPT™), después de centrifugar para fraccionar la muestra, los leucocitos recuperados fueron lavados 2 veces con Buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4, después de centrifugar las células fueron resuspendidas en 1 mL de PBS, tomando una alícuota para realizar el conteo de células viables con la tinción de azul tripano, la suspensión restante se transfirió a un tubo Eppendorf, centrifugando a 2500 rpm por 5 minutos, se decanto y peso, adicionando 1mL de Trizol® por cada 50 a 100 mg de células, las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su estudio.

Para la extracción de RNA a partir de tejido congelado y/o sangre periférica se adicionaron 200µL de cloroformo por cada 1mL de Trizol® inicial, agitando vigorosamente, manteniendo 15 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar, la fase acuosa fue colocada en un nuevo tubo Eppendorf junto con 500µL de isopropanol por cada mililitro de Trizol®, dejando precipitar a -20°C toda la noche.

Se centrifugo y decanto, el botón obtenido fue lavado con 1 mL de etanol al 75% por cada 1mL de Trizol® inicial, después de centrifugar, el botón se resuspendió en 20µL de agua DEPC para la sangre y en 30µL para el tejido congelado, se les dio un tratamiento con DNasa siguiendo el mismo protocolo para el tejido en parafina.

7.5.3 Amplificación de los genes involucrados en las translocaciones por RT-PCR.

Cada muestra de RNA proveniente de tejido fijado en formol-parafina y/o tejido congelado fue estudiada usando la técnica de RT-PCR, ensayando 6 diferentes pares de oligonucleótidos: PGK fwd./PGK rev. usados para amplificar secuencias de un gen de mantenimiento doméstico (fosfoglicerilcinasa), con la amplificación de este gen se aseguro la presencia de RNA adecuado en la muestra y se procedió con el ensayo del panel completo de las 5 translocaciones usando los siguientes 5 pares de oligonucleótidos: EWS/FLI, EWS/ERG, SYT/SSX, PAX3-7/FKHR y EWS/WT1. Para las muestras de RNA de sangre se ensayo el par de oligos identificados en el tumor primario después de ensayar el par PGK fwd/PGK rev; en algunos casos fue necesario probar todos los pares de oligos. Las condiciones del ensayo han sido estandarizadas para todas las fusiones usando el Sistema One- Step RT-PCR (Roche) que incluye la combinación de enzimas AMV-RT y Taq y Pwo DNA polimerasa, el procedimiento se describe a continuación.

Se prepararon por separado dos mezclas de reacción. Una de ellas combina 3µL de RNA extraído con una mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (dNTP's) 0.2mM, ditioneitol (DTT) 5mM, 0.6pmol de cada primer y 0.16U/µL de inhibidor de RNasas. La otra mezcla contiene cloruro de magnesio 0.5mM y 0.5µL de enzima RT-PCR en Buffer RT 1X. Al juntar las mezclas se obtuvo un volumen final de 50µL. La Retrotranscripción se llevo acabo a 50°C por 30 minutos, seguido de la desnaturalización a 94°C por 2 minutos. Los parámetros de amplificación incluyeron 40 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturalización), 60°C por 1 minuto (alineación), 68°C por 45 segundos (elongación) y a 68°C por 7 minutos al final de los 40 ciclos para la extensión final.

Con cada lote de reacciones, se incluyeron las líneas celulares HTB 166 y CRL 2061 como controles positivos de las fusiones EWS/FLI y PAX3-7/FKHR respectivamente, así como controles negativos provenientes de RNA de otros tipos de tumores.

Oligonucleótido	Secuencia	Producto amplificado
PGK fwd PGK rev	5' CAG TTT GGA GCT CCT GGA AG 3' 5' TGC AAA TCC AGG GTG CAG TG 3'	247pb
EWS22.2 FLI1 ERG	5' CTG GAT CCT ACA GCC AAG CTC AAG 3' 5' GTT GAG GCC AGA ATT CAT GTTA 3' 5' GG TTG AGC AGC TTT CGA CTG 3'	125pb (EWS- FLI1ex 6) 191pb (EWS-FLI1ex5) 137pb
SSX SYT	5' TCC TCT GCT GGC TTC TTG 3' 5'AGA CCA ACA CAG CCT GGA CCA C 3'	87pb
PAX3/PAX7 FKHR:	5' CCG ACA GCA GCT CTG CCT AC 3' 5' TGA ACT TGC TGT GTA GGG ACA G 3'	170pb
EWSEx7 WT1EX8	5' TCC TAC AGC CAA GCT CCA AG TC 3' 5' ACC TTC GTT CAC AGT CCT TG 3'	103pb

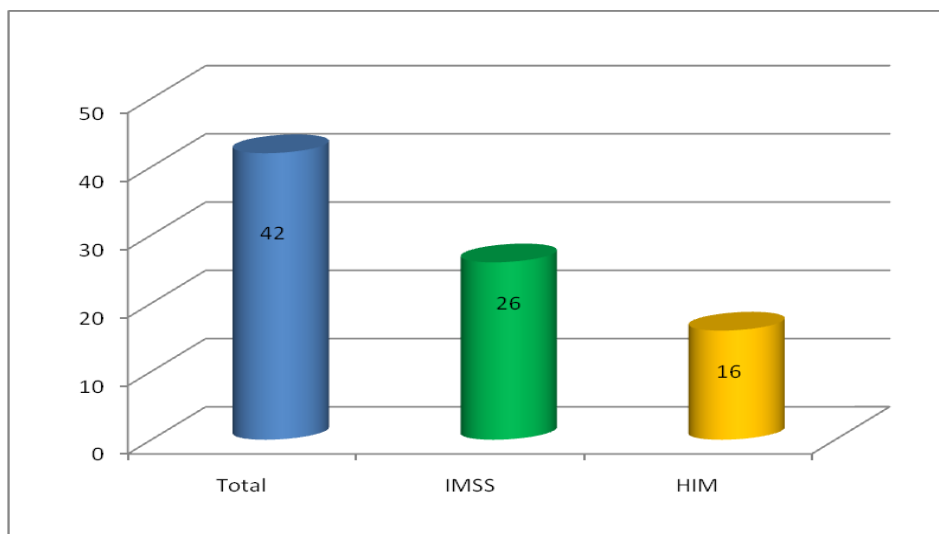
Tabla3. Oligonucleótidos utilizados en la retrotranscripción y amplificación de los productos derivados de las translocaciones (21, 22).

Se realizo una electroforesis sobre gel de agarosa al 2% en buffer tris acetato (TAE 1x), de los productos obtenidos, visualizando los productos amplificados tiñéndolos con bromuro de etidio y empleando transiluminación con luz ultravioleta y un sistema de fotodocumentación.

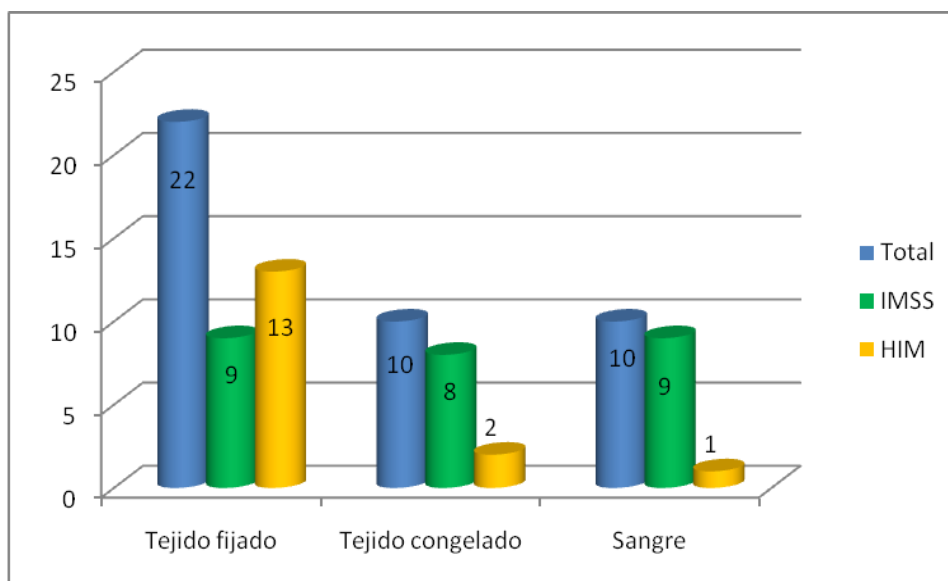
8. RESULTADOS.

8.1 Casos incorporados.

Fueron incorporados al estudio los tejidos de 42 pacientes de los cuales 26 fueron atendidos en el Hospital de Pediatría del CMN SXXI del IMSS y 16 del Hospital Infantil de México Dr. Federico Gómez de la SSA) (Gráfica 1). Los análisis moleculares del panel completo de oligonucleótidos fueron ensayados en 22 tejidos fijados en formol y embebidos en parafina, en 10 tejidos congelados y cuando no fue posible contar con tejido tumoral primario se ensayaron también en 10 muestras de sangre periférica (Gráfica 2) .

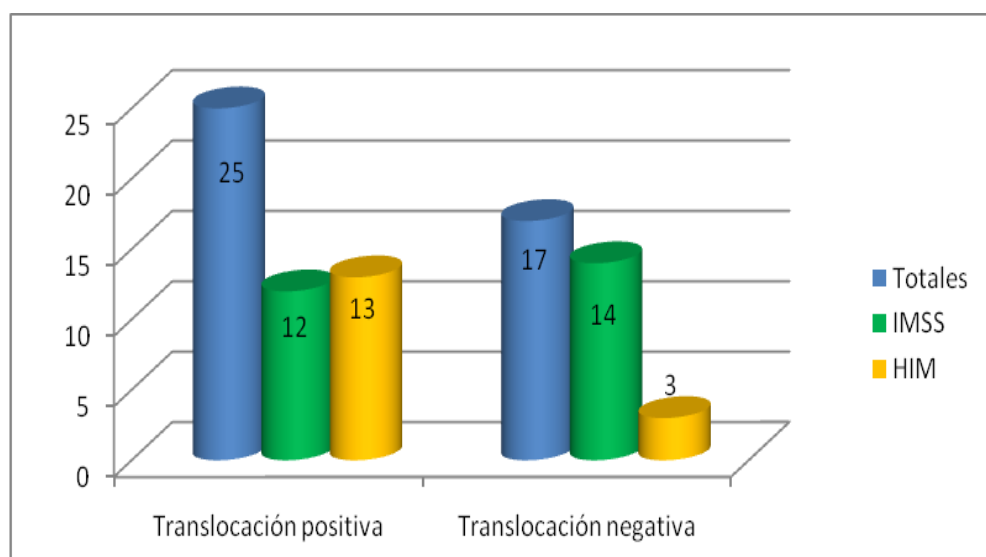


Gráfica 1. Número de casos incorporados para el ensayo de translocaciones específicas aplicando RT-PCR.



Gráfica 2. Tipo y número de muestras analizadas por RT-PCR para la correlación entre las categorías histopatológicas y los hallazgos moleculares.

Se obtuvieron translocaciones positivas en 25 muestras (Gráfica 3), correspondiente a un 60% de los casos. Solamente en 1 muestra no se obtuvo RNA adecuado para el análisis molecular.



Gráfica 3. Número de muestras con translocaciones positivas y negativas detectadas por RT-PCR.

8.2 Clasificación por categorías histopatológicas.

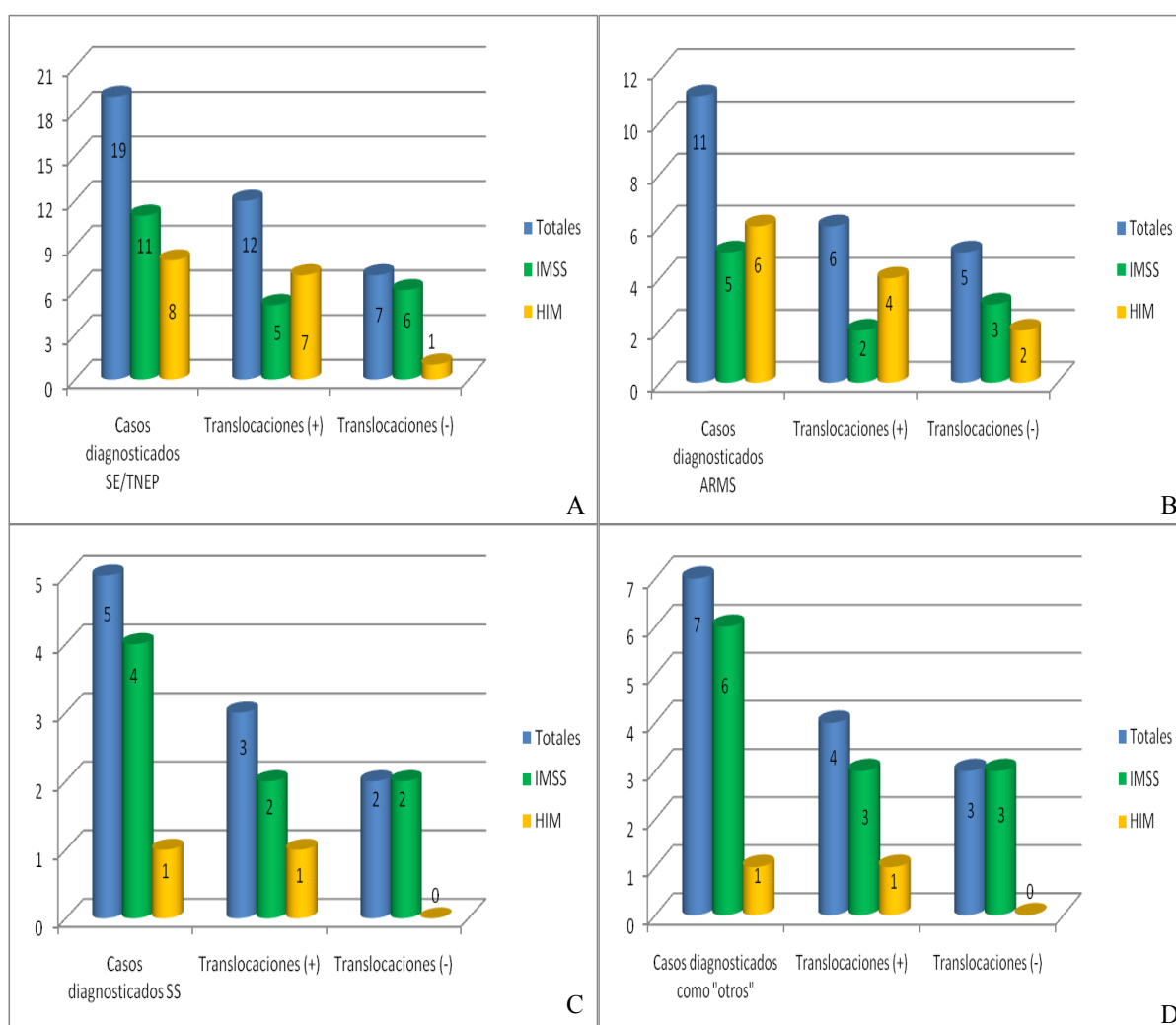
La estratificación de los diagnósticos histopatológicos de los pacientes incorporados consistió en: 19 tumores diagnosticados como SE/TNEP, 11 tumores como rhabdomyosarcoma alveolar y 5 como sarcoma sinovial. Además se incorporaron al estudio 7 tumores que fueron clasificados como “otros”, entre los que se incluyen: rhabdomyosarcoma embrionario ERMS (del inglés Embryonal rhabdomyosarcoma), meduloblastoma, neuroblastoma, osteosarcoma, linfomas, schwannoma rabdoide. Estos tumores fueron incluidos en el estudio debido a las dudas diagnósticas que presentaron para los patólogos, por lo cual se nos solicitó ensayar el panel de fusiones para apoyar el diagnóstico.

8.3 Comparación entre el diagnóstico histopatológico y los hallazgos moleculares.

De los diagnosticados como SE/TNEP se encontraron translocaciones positivas para alguno de los sarcomas estudiados en 12 casos, para rhabdomyosarcoma alveolar se obtuvieron 6 resultados positivos, 3 para sarcoma sinovial, y en el caso de los clasificados como “otros” se determinaron 4 tumores con translocación positiva.

8.3.1 Sarcoma de Ewing o Tumor neuroectodérmico primitivo: t(11;22) EWS-FL1, t(21,22) EWS-ERG.

Se diagnosticaron 19 pacientes con SE/TNEP y se identificó la translocación en 12 casos lo que constituye el 63% de las muestras analizadas como se muestra en la gráfica 4A. De los 12 SE/TNEP en los cuales se encontró alguna translocación: en 6 de ellos se detectó la fusión t(11; 22) EWS-FLI, y en 6 más encontró la fusión variante (t21; 22) EWS-ERG. Un ejemplo de los productos de amplificación se muestra en las figuras 4, 5 y 6. La concordancia entre el diagnóstico histopatológico y los hallazgos moleculares fue del 100% para esta categoría diagnóstica.



Gráfica 4. Comparación entre el número de casos diagnosticados por histopatología y el número de casos con translocación positiva detectada por RT-PCR. A) Diagnóstico de SE/TNEP; B) Rabdomiosarcoma alveolar; C) Sarcoma Sinovial; D) Otros diagnósticos.

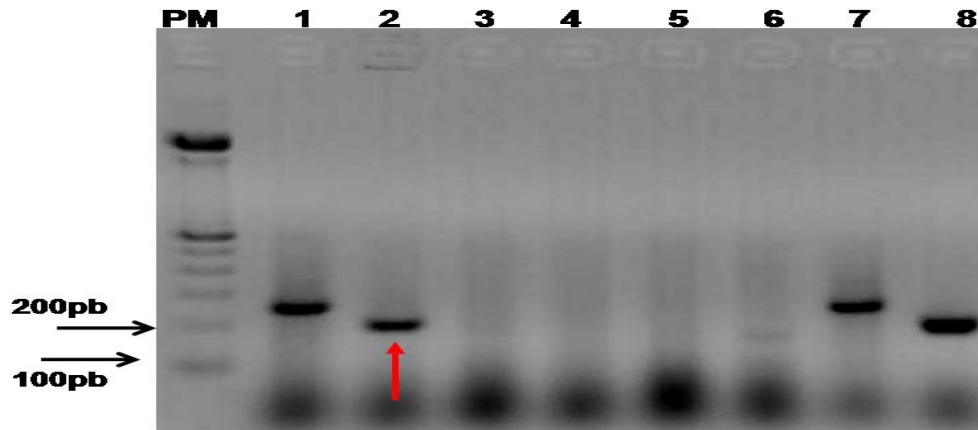


Fig.4. Electroforesis de la amplificación de la fusión EWS- FLI de 191pb y PGK 247pb del FS24 IMSS. PM= marcador peso molecular 100pb; 1) PGK; 2)EWS-FLI; 3) EWS2-ERG,4) EWSex7-WT1; 5) SYT-SSX; 6)PAX3/7-FKHR; 7) Control positivo para PGK; 8) Línea celular HTB166 positivo para EWS-FLIIC

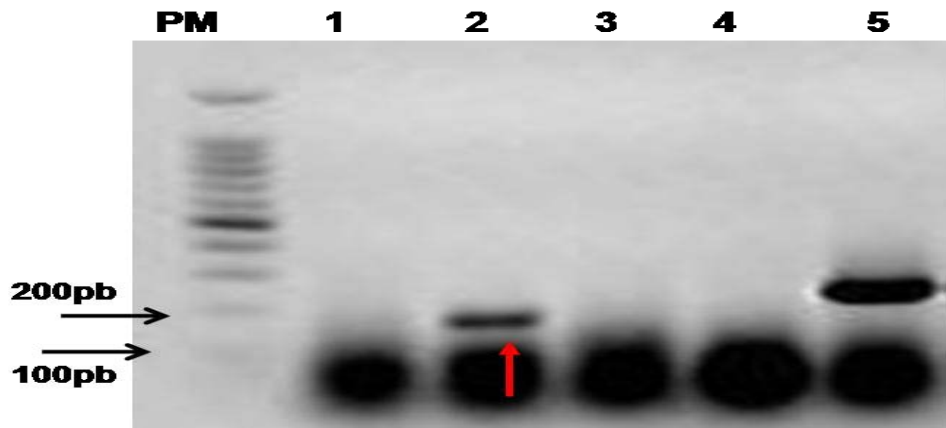


Fig.5. Electroforesis de la amplificación de las fusiones específicas para los sarcomas estudiados. PM= marcador peso molecular 100pb; 1,) EWS-FLI; 2) EWS-ERG,3) EWSex7-WT1; 4) PAX3/7-FKHR; 5) PGK. Se observa en el carril 5 la banda de 247pb para el gen control PGK y en el carril 2 la banda del producto amplificado de la fusión variante EWS-ERG para el SE/TNEP.

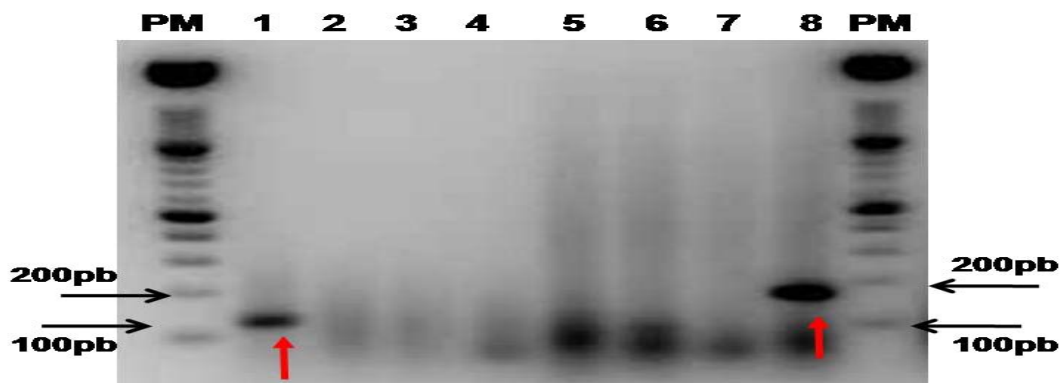


Fig.6. Electroforesis de la amplificación de las fusiones específicas para los sarcomas estudiados. PM= marcador peso molecular 100pb; 1,5) EWS.-FLI; 2,6) SYT-SSX; 3,7) EWSex7-WT1; 4,8) PAX3/7-FKHR. En el carril 1 se observa una banda de 125pb característica de SE/TNEP, muestra del caso FS3HIM. En, muestra del FS4 HIM el carril 8se observa una banda de 170pb correspondiente a la fusión específica de ARMS.

8.3.2 Rbdomiosarcoma alveolar t (2; 13) y t (1; 13) PAX3/7- FKHR.

Se diagnosticaron histopatológicamente 11 pacientes con rbdomiosarcoma alveolar, identificando translocación positiva en 6 de ellos, correspondiente al 55% de las muestras analizadas como se muestra en la gráfica 4B.

De 6 de pacientes con translocación positiva, se encontró en 4 casos la t (2; 13) o la t (1; 13) que conduce a la fusión PAX3/7-FKHR. Un ejemplo del producto de amplificación se muestra en la figura 6. En los 2 casos restantes se detectaron translocaciones distintas a las reportadas para este tumor, es decir que se trata de hallazgos discordantes. Por lo que la concordancia entre el diagnostico histopatológico y los hallazgos moleculares fue del 67%.

8.3.3 Sarcoma Sinovial t (x; 18) SYT-SSX.

Se diagnosticaron histopatológicamente 5 pacientes con sarcoma sinovial, identificando translocación positiva en 3 de ellos, corresponde al 60% de las muestras analizadas. De los 3 pacientes con translocación positiva, se encontró la t(x; 18) que conduce a la fusión SYT-SSX, como se muestra en la gráfica 4C. Un ejemplo del producto de amplificación se muestra en la figura 7. La concordancia entre el diagnostico histopatológico de esta categoría y los hallazgos moleculares fue del 100%.

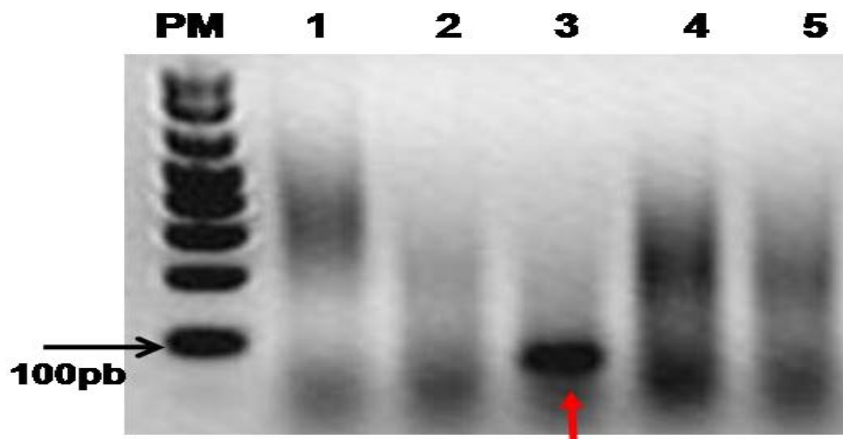
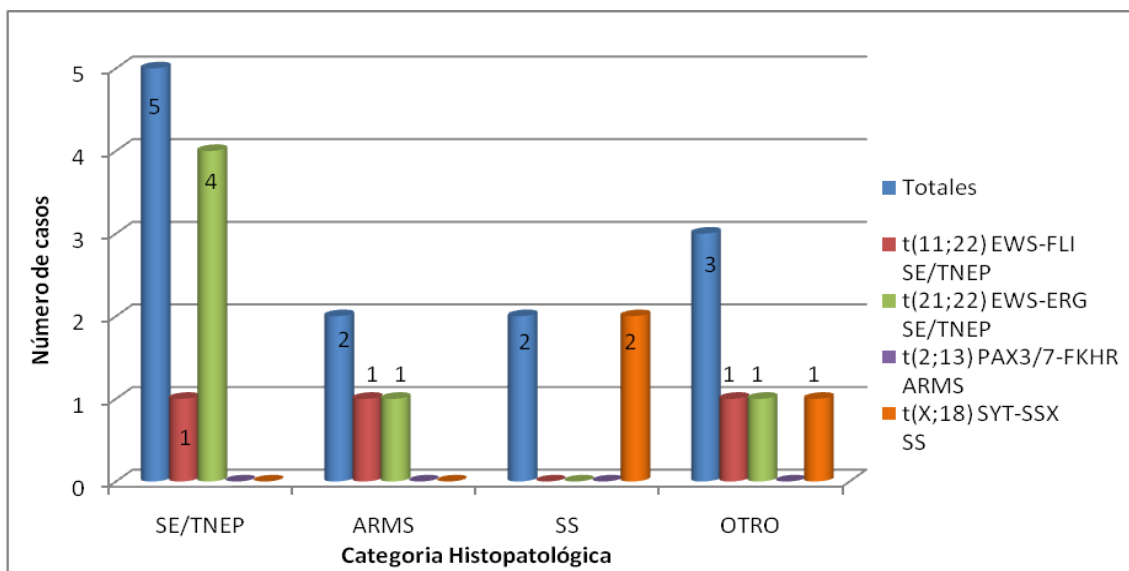


Fig. 7. Electroforesis de la amplificación de la fusión específica para SS del caso FS24 IMSS, se observa la banda característica de 87pb en el carril 3. PM= marcador peso molecular 100pb; 1,) EWS-FLI; 2) EWS-ERG,3) SYT-SSX; 4) EWSex7-WT1; 5) PAX3/7-FKHR.

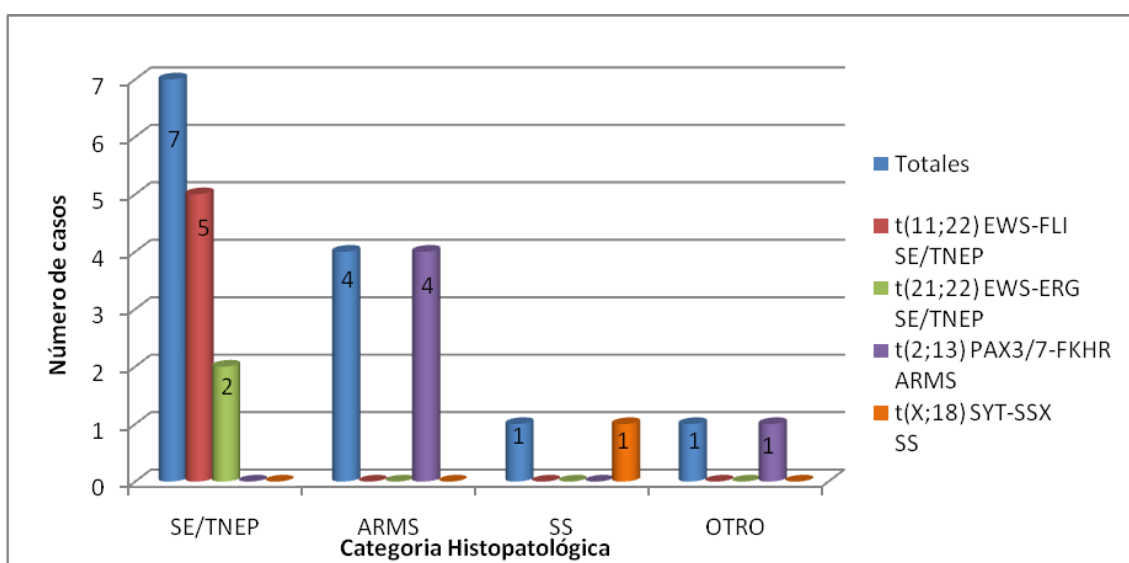
8.4 Análisis de Discordancia.

De 2 casos inicialmente diagnosticados en el Hospital de Pediatría del CMN SXXI del IMSS como ARMS, en 1 se presentó la t (11; 22) y en el otro la t (21; 22) las cuales conducen respectivamente a las fusiones EWS-FLI y EWS-ERG correspondientes a SE/TNEP (Gráfica 5).



Gráfica 5. Análisis de discordancia entre Diagnóstico histopatológico y hallazgo molecular de los casos del Hospital de Pediatría del CMN SXXI IMSS. *SE indica sarcoma de Ewing; TNEP, tumor neuroectodermico primitivo; SS, sarcoma sinovial; ARMS, rdbomiosarcoma alveolar.

En el HIM solo se encontró discordancia en 1 caso diagnosticado inicialmente como rdbomiosarcoma embrionario que presentó la fusión PAX3/7- FKHR específica de un rdbomiosarcoma alveolar como se ilustra en la gráfica 6.



Gráfica 6. Análisis de discordancia entre Diagnóstico histopatológico y hallazgo molecular de los casos del HIM Dr. Federico Gómez de la SSA. *SE indica sarcoma de Ewing; TNEP, tumor neuroectodermico primitivo; SS, sarcoma sinovial; ARMS, rdbomiosarcoma alveolar

Hallazgo molecular		Diagnostico Histopatológico							Total
		SE/TNEP	ARMS	SS	Osteosarcoma	Linfoma	ERMS	Schwannoma rabdoide	
t(11;22) EWS-FLI	SE/TNEP	6	1	0	0	1	0	0	8
t(21;22)EWS-ERG		6	1	0	0	0	1	0	8
t(2;13)PAX3/7-FKHR	ARMS	0	4	0	0	0	1	0	5
t(X;18)SSA-SSX	SS	0	0	3	1	0	0	0	4
Negativo		7	5	2	0	1	1	1	17
Total		19	11	5	1	2	3	1	42

Tabla 4. Tabla de discordancia entre hallazgos moleculares por RT-PCR y diagnóstico histopatológico. *SE indica sarcoma de Ewing; TNEP, tumor neuroectodermico primitivo; SS, sarcoma sinovial; ARMS, rdbomiosarcoma alveolar; ERMS, rdbomiosarcoma embrionario.

8.4.1. Otras categorías histopatológicas con hallazgos moleculares.

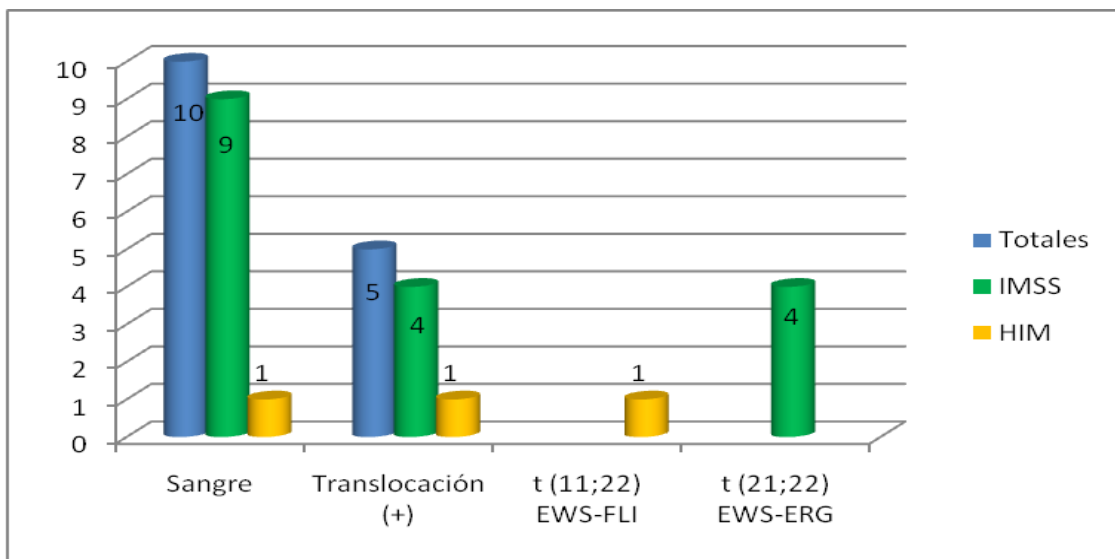
Dentro de las discordancias entre la categoría histopatológica y los hallazgos moleculares se incluyen los 7 tumores clasificados como “otros”, donde identificamos por RT-PCR alguna translocación en 4 de ellos (Gráfica 4D). En 1 caso el diagnóstico inicial fue de osteosarcoma e identificamos la t(x; 18) que conduce a la fusión SYT-SSX correspondiente a un sarcoma sinovial. Un segundo caso fue inicialmente diagnosticado como linfoma, e identificamos la t (11; 22) expresando la fusión EWS- FLI especifica de un SE/TNEP. En 2 casos más cuyo diagnóstico inicial fue rdbomiosarcoma embrionario, en 1 de ellos identificamos la t (21; 22) que conduce a la fusión variante EWS-ERG para SE/TNEP y el otro caso expreso la t (1; 13) o t (2; 13) especificas para rdbomiosarcoma alveolar. Los tres tumores restantes en los que no se identificó ninguna translocación correspondieron a diagnósticos iniciales de la categoría “otros” a: schwannoma rabdoide, linfoma y rdbomiosarcoma embrionario.

Diagnóstico Histopatológico	Hallazgo molecular	Diagnostico correspondiente
Linfoma	Ninguna	Linfoma
Linfoma	t(11;22) EWS-FLI	SE/TNEP
ERMS	t(21;22) EWS-ERG	SE/TNEP
ERMS	t(2;13) PAX3/7-FKHR	ARMS
ERMS	Ninguna	ERMS
Osteosarcoma	t(x;18) SYT-SSX	SS
Schwannoma rabdoide	Ninguna	Shwannoma rabdoide

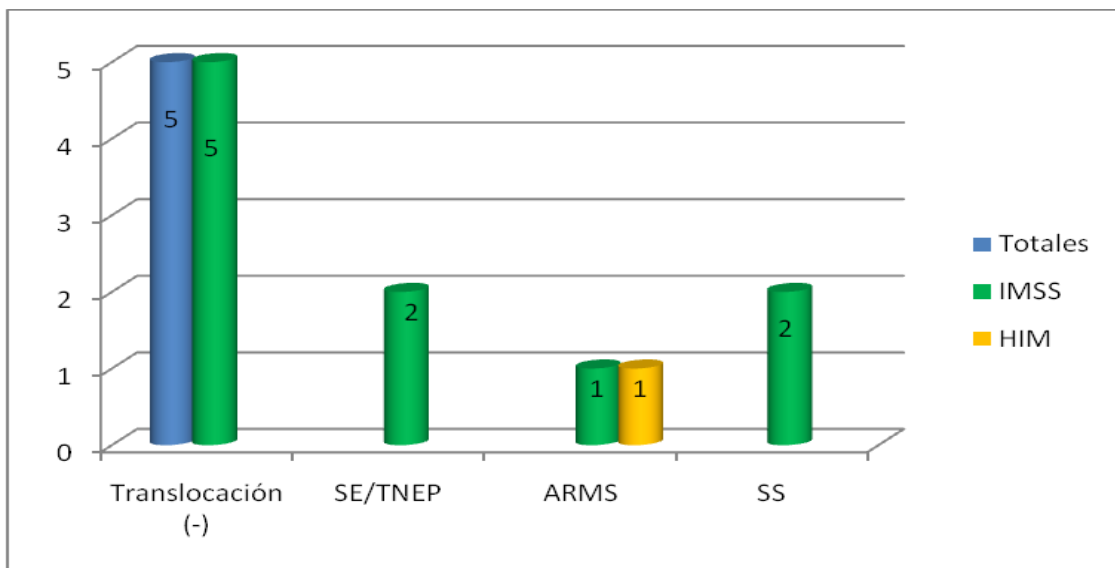
Tabla 5. Discordancias moleculares-histopatológicas encontradas en otras categorías histopatológicas analizadas.

8.5 Ensayo del panel completo en muestras de sangre.

En 10 pacientes se realizaron en las muestras de sangre el ensayo del panel completo de translocaciones, debido a que no fue posible contar con suficiente tejido del tumor primario para realizar los análisis moleculares. Se encontraron translocaciones positivas en 5 muestras de estos 10 pacientes, y todas son concordantes con el diagnóstico histopatológico es decir SE/TNEP. De estas 5 translocaciones identificadas, 4 expresaron la t (21; 22) y 1 la t (11; 22) conduciendo a las fusiones EWS-ERG y EWS-FLI respectivamente como se muestra en la gráfica 7A. Los diagnósticos correspondientes de las 5 muestras sin translocación detectada correspondieron a: 2 casos de ARMS, 2 SE/TNEP y 1 SS (Gráfica 7B).



Gráfica 7A. Muestras de sangre con translocación positiva analizadas por RT-PCR cuando no se obtuvo tumor primario. Las 5 muestras corresponden a los diagnósticos e instituciones mostrados.



Gráfica 7B. Muestras de sangre con translocación negativa analizadas por RT-PCR cuando no se obtuvo tumor primario. Las 5 muestras corresponden a los diagnósticos e instituciones mostrados.

8.6 Resultados del análisis molecular en las muestras de sangre tomadas periódicamente.

Para poder valorar como marcador de células tumorales las translocaciones bajo estudio, idealmente es necesario contar con la determinación de este análisis en sangre periférica antes que los pacientes inicien el tratamiento con quimioterapia como se ilustra en la Figura 8. Esta muestra de sangre se denominó T0 (Toma cero) y el resultado del análisis molecular en esta muestra permitirá prospectivamente establecer relaciones entre la presencia/ausencia de la translocación con datos y eventos clínicos como: estadificación, respuesta al tratamiento, remisión, recaídas. Estas asociaciones permitirán atribuirle o no el valor de marcador molecular con valor pronóstico a la determinación de estas translocaciones. Sin embargo no siempre es posible contar con esta muestra.

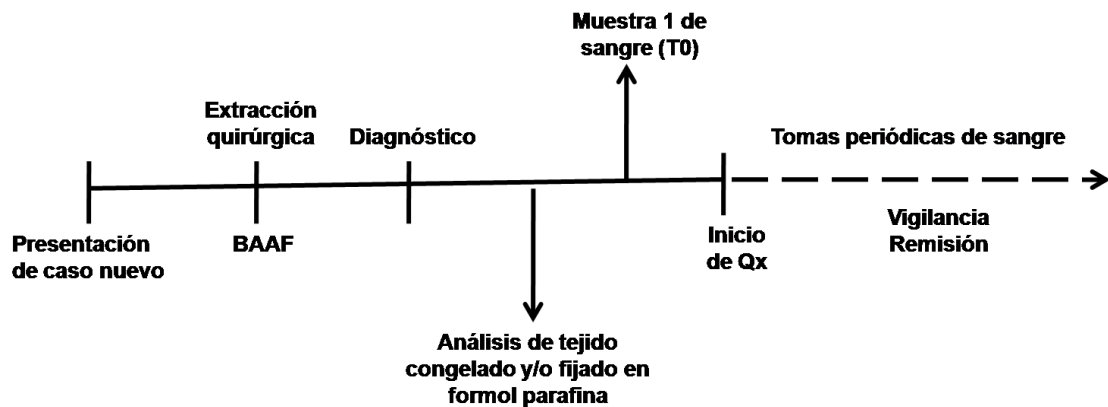


Fig.8. Procedimiento ideal para el manejo y del paciente que ingresa al estudio, desde el momento de la presentación de un caso nuevo hasta la vigilancia/remisión. BAAF = Biopsia por Aspiración con Aguja Fina

Se analizaron 83 muestras de sangre periférica tomadas periódicamente cada 4 meses, provenientes de 24 pacientes en los cuales previamente se identificó alguna translocación específica de los sarcomas arriba mencionados como se ilustra en la figura 9. De estos 24 pacientes en 14 fue posible conseguir la muestra T0, es decir antes de iniciar la quimioterapia.

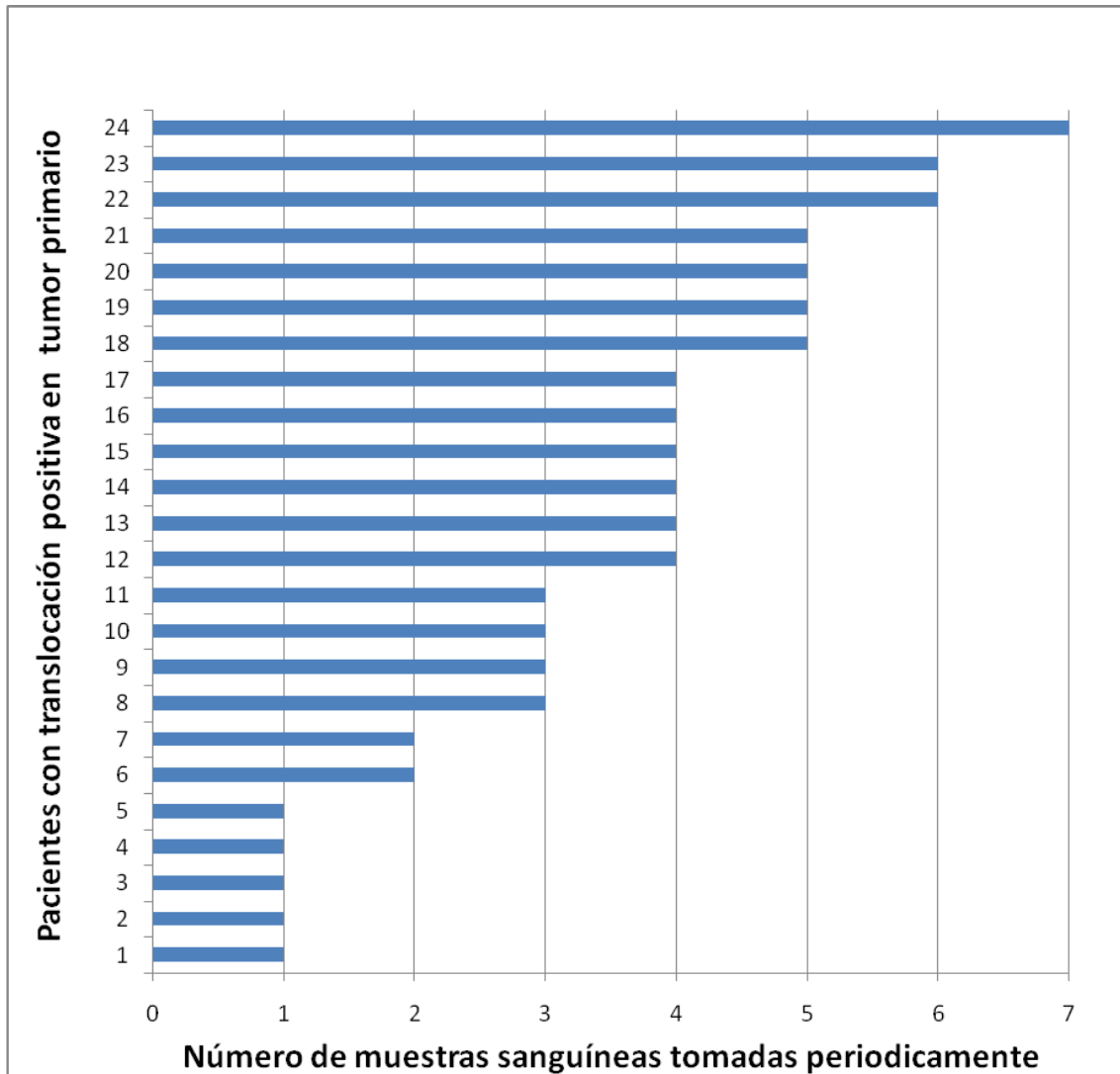


Fig.9. Número de muestras sanguíneas por paciente tomadas periódicamente.

8.6.1 Sarcoma de Ewing o Tumor neuroectodérmico primitivo: t (11; 22) EWS-FL1, t (21,22) EWS-ERG.

De un total de 16 casos diagnosticados como SE/TNEP fue posible obtener 10 muestras T0 (antes de iniciar la quimioterapia). En 5 de ellas se detectaron translocaciones en circulación, y 5 fueron negativas. En 6 pacientes fue posible obtener la primera muestra (M1) después de haber iniciado la quimioterapia. En 3 de estas muestras se detectaron translocaciones positivas y 3 fueron negativas, como se muestra en la tabla 6.

Identificamos 2 casos, FS7 HIM y FS14 IMSS inicialmente positivos, que en muestras posteriores el resultado fue negativo. Identificamos 4 casos, FS4, 5 y 7 del IMSS y FS11 HIM inicialmente negativos que posteriormente alguna muestra fue positiva. Identificamos 3 pacientes, FS1, 12 y 14 del HIM que siempre han sido positivos. Identificamos 2 casos FS1 y 6 del IMSS que siempre han sido negativos.

En esta categoría diagnóstica 3 pacientes fallecieron durante el estudio FS3 y 15 del HIM y el FS3 IMSS.

Los casos FS25 y FS23 del IMSS son de reciente incorporación por lo que solamente contamos con una muestra de cada uno.

	M1							
	(T 0)	Con Qx	M2	M3	M4	M5	M6	M7
FS1 HIM		●	●	●	●			
FS3 HIM	† ●							
FS7 HIM	●		O	O	O	●		
FS11 HIM	O		O	O	●	O		
FS12 HIM	●		●	●	●	●		
FS14 HIM	●		●	●				
FS15 HIM		† ●						
FS1 IMSS	O		O	O	O	O	O	O
FS3 IMSS	O		O†					
FS4 IMSS	O		●	●	O			
FS5 IMSS		O	O	●	O			
FS6 IMSS		O	O	O	O			
FS7 IMSS	O		●	NI	O			
FS14 IMSS	●		●	O				
FS23 IMSS		O						
FS25 IMSS		●						

Tabla 6. Resultado de la presencia/ausencia de translocaciones en las muestras periódicas de sangre periférica de pacientes diagnosticados con SE/TNEP. M= muestra, T0= muestra antes de quimioterapia, O= translocación negativa, ●= translocación positiva, †= Paciente fallecido, Qx= quimioterapia; NI= no informativo.

8.6.2 Rbdomiosarcoma alveolar t (2; 13), t (1; 13) PAX3/7- FKHR.

De un total de 5 casos diagnosticados como rbdomiosarcoma alveolar fue posible obtener 4 muestras T0. En 2 de ellas se detectaron translocaciones, y 2 fueron negativas. Solo en 1 paciente se obtuvo la primera muestra (M1) después de haber iniciado la quimioterapia y fue negativa para la translocación. Identificamos 2 casos: FS4 y 6 del HIM inicialmente positivos que en muestras posteriores el resultado fue negativo. Identificamos 3 casos: FS2, 10 y 16 del HIM que siempre han sido negativos como se muestra en la tabla 7.

En esta categoría diagnóstica 2 pacientes: FS4 y 10 del HIM fallecieron durante el estudio.

	M1		M2	M3	M4	M5	M6
	(T 0)	Con Qx					
FS2 HIM	O		O	O	O	O	O
FS4HIM	●		O	O	O †		
FS6HIM	●		O	O	O	O	O
FS10 HIM	O		O	O	O	NI †	
FS16 HIM		O	O				

Tabla 7. Resultado de la presencia/ausencia de translocaciones en las muestras periódicas de sangre periférica de pacientes diagnosticados con rbdomiosarcoma alveolar .

M= muestra, T0= muestra antes de quimioterapia, O= translocación negativa, ●= translocación positiva, †= Paciente fallecido, Qx= quimioterapia; NI= no informativo.

8.6.3 Sarcoma Sinovial t (x; 18) SYT-SSX.

De un total de 4 casos diagnosticados como Sarcoma sinovial solo fue posible obtener 1 muestra T0. En 3 pacientes fue posible obtener la primera muestra (M1) después de haber iniciado la quimioterapia, en 1 caso no fue posible obtener muestra debido a las condiciones clínicas del paciente. En ningún caso se detectaron células circulantes con translocación como se muestra en la tabla 8.

En esta categoría diagnóstica el paciente FS11 IMSS falleció durante el estudio.

	M1		M2	M3
	(T 0)	Con Qx		
FS5 HIM		O	O	NI
FS11 IMSS	NI †			
FS12 IMSS		O	O	O
FS24 IMSS	----	---	----	----

Tabla 8. Resultado de la presencia/ausencia de translocaciones en las muestras periódicas de sangre periférica diagnosticados con Sarcoma sinovial.

M= muestra, T0= muestra antes de quimioterapia, O= translocación negativa, ●= translocación positiva, †= Paciente fallecido, Qx= quimioterapia; NI= no informativo.

9. DISCUSIÓN.

9.1 Concordancia-discordancia entre categorías histopatológicas y hallazgos moleculares.

Para correlacionar el diagnóstico histopatológico y los hallazgos moleculares se analizaron 42 muestras de tejidos, encontrando translocación positiva en 25 pacientes, correspondiente a un 60% del total de casos analizados. Se encontró una discordancia general del 24 % correspondiente a 6 casos en los que se identificó alguna translocación específica discordante con el diagnóstico histopatológico inicial.

Para el SE/TNEP y para el Sarcoma sinovial la concordancia fue del 100%. Para los casos de rhabdomyosarcoma alveolar la discordancia fue de 33%, correspondientes a 2 casos. La discordancia más significativa se encontró en 4 casos de otras entidades diagnósticas de tumores de células pequeñas, redondas y azules, en las cuales fue posible identificar alguna de las translocaciones en estudio.

En el periodo de estudio los Servicios de Patología no reportaron ningún caso de tumor desmoplásico de células redondas y pequeñas, y en ningún caso se determinó por RT-PCR la translocación correspondiente es decir la t(11; 22) que conduce a la fusión EWS_{ex7}-WT1 específica para este tipo de tumor.

9.2 Translocaciones variantes en el SE/TNEP.

Para las translocaciones t(11;22) y t(21;22) que conducen a las fusiones EWS-FLI y EWS- ERG, en la literatura se reporta una prevalencia estimada del 85 y 15% de los pacientes diagnosticados con SE/TNEP respectivamente (6), en nuestro estudio encontramos 16 casos con translocación positiva para SE/TNEP, 8 de los cuales corresponden a la t(11;22) y 8 a la t(21;22) equivalentes al 50% de cada variante.

9.3 Muestras tumorales con translocaciones negativas.

En 1 caso de tejido tumoral y 4 de sangre periférica no se obtuvo RNA adecuado para realizar el ensayo por lo que la muestra se considera no informativa para el estudio. De los 17 casos con diagnóstico prequirúrgico sugestivo de alguna de las categorías diagnósticas en estudio, en los cuales no se detectó fusión, solo 8 de ellos correspondieron el diagnóstico de algún tumor de células redondas azules y pequeñas (6 SE/TNEP y 2 rhabdomyosarcoma alveolar). En los 9 casos restantes el diagnóstico final emitido por los Servicios de Patología correspondieron a: hemangiendoteloma, linfomas, schwannoma rabdoide, sarcoma miofibroblástico inflamatorio y rhabdomyosarcoma embrionario.

Los resultados negativos no siempre implican ausencia de la translocación en el ensayo por RT-PCR, puede deberse a que existen variantes de las fusiones de los tumores por la diversidad del sitio donde las rupturas cromosómicas pueden ocurrir y por lo tanto no ser detectables con los oligonucleótidos empleados en este estudio; por ejemplo Giovannini y col. reportan hasta 9 posibles fusiones en distintas regiones exónicas de los genes EWS-FLI1 y EWS-ERG para SE/ TNEP (21, 23) . Además se han reportado fusiones involucrando otros genes de la familia de factores de transcripción ETS (6, 7). Estos fenómenos descritos para el SE/TNEP demuestran que existe una heterogeneidad biológica y probablemente expliquen también, los casos de otros tumores de este estudio en los que no ha sido posible encontrar las translocaciones específicas. En este sentido en la literatura del rhabdomyosarcoma alveolar se reporta que no es posible identificar ninguna de las dos translocaciones más comunes que conducen a la fusión PAX3/7- FKHR en el 15 al 55% de casos reportados (12). También el uso de tejido derivado de biopsias muy pequeñas para la extracción de RNA y ensayo por RT-PCR se puede asociar a resultados falsos negativos. Aunque hay reportes de indican que esta técnica puede detectar productos de fusión a partir de 10 a 200 células en tejido congelado y/o bloques de parafina, teniendo una sensibilidad de 10 a 50 veces mayor en tejido congelado que en bloques de parafina (24), hay que tener en cuenta que en ocasiones el tejido puede presentar diferentes niveles de necrosis. Además a pesar de que el RNA haya sido extraído adecuadamente, los mensajeros derivados de las células tumorales pueden estar silenciados.

9.4 Translocaciones en sangre periférica.

El principal factor pronóstico para la supervivencia de un paciente con cáncer es la determinación de la presencia de enfermedad diseminada al momento del diagnóstico (18, 25). Nosotros detectamos células con translocación positiva en sangre periférica en la (T0) de 5 pacientes y en la (M1) de 3 pacientes diagnosticados con SE/TNEP.

En contraste a lo publicado por Kelly, KM y col. donde solo reportan presencia de translocación positiva en medula ósea pero no en sangre periférica de pacientes diagnosticados con rhabdomyosarcoma alveolar (20), nosotros si encontramos translocación positiva en la toma cero de 2 pacientes de un total de 5 con este diagnóstico.

9.5 Presencia continua de translocaciones en sangre

En este estudio solamente en 4 casos diagnosticados con SE/TNEP se ha encontrado la translocación positivas en todas las muestras obtenidas, el significado de esto podrá analizarse a fondo cuando estos hallazgos moleculares se correlacionen con la respuesta al tratamiento. Es importante hacer notar que la incorporación y seguimiento de casos es asíncrona y que el análisis y conclusiones derivados podrán realizarse hasta acabar el período de colección de casos y datos.

9.6 Ausencia continúa de translocaciones en sangre

En este estudio solamente en 8 pacientes (3 con SE/TNEP, 3 con rhabdomyosarcoma alveolar y 2 con sarcoma sinovial) se identificó alguna translocación en el tejido primario pero no se detectaron células positivas en ninguna muestra de sangre, de estos 8 pacientes 2 fallecieron durante el estudio. La correlación con datos de extensión clínica al momento de la presentación ayudarán a establecer si la diseminación de las células a otros tejidos se podría estar dando por vía linfática o adyacente. Es relevante comentar que Barr, FG y col. proponen una modificación al procedimiento de la RT-PCR, gracias al cual ha sido posible identificar células tumorales en pacientes con rhabdomyosarcoma alveolar, que habían sido negativas utilizando la RT-PCR común (26), alternativa a considerar en los pacientes con estas translocaciones. A pesar de que 3 pacientes con translocación positiva para Sarcoma sinovial en tejido primario identificados en este estudio fueron sometidos a cirugía para extraer el tumor, no se identificó translocación positiva en sangre periférica en ninguno de ellos, en contraste con un reporte mencionando que en pacientes con Sarcoma sinovial se ha observado la presencia de metástasis después de la cirugía. Esto sugiere que la diseminación de las células tumorales podría ocurrir antes o durante la cirugía para remover el tumor primario (27), sin embargo, Hashimoto, N y col. reportaron por primera vez la identificación de esta translocación en una paciente antes de observar metástasis a pulmón demostrable clínicamente (28).

9.7 Ausencia- Presencia de translocaciones en sangre

De manera sobresaliente durante el período de este estudio en 4 pacientes (FS11 HIM, FS4, 5 y 7 del IMSS) se detectaron translocaciones positivas después de que la muestra anterior era negativa; el significado de este fenómeno podría corresponder efectivamente a la detección temprana de la diseminación de células tumorales en el torrente sanguíneo, sin embargo será la correlación con el comportamiento clínico lo que confirmará esto. Es importante mencionar que en estos casos los médicos tratantes son avisados sobre estos hallazgos de inmediato. Estos

hallazgos no implican un cambio radical en el tratamiento médico de estos pacientes, sin embargo pueden constituir piezas de información que alerten a los médicos y contribuyan a un manejo más adecuado en la vigilancia de estos pacientes.

9.8 Presencia-Ausencia de translocaciones en sangre

Durante el período de este estudio en 4 pacientes (FS7, 4,6 HIM y FS14 IMSS) registramos presencia de la translocación en sangre en la primera muestra y negativas las muestras subsecuentes; el significado de este fenómeno podría corresponder a una respuesta al tratamiento sin embargo será la correlación con el comportamiento clínico lo que confirmará esto. En el caso del FS7 HIM se volvió a identificar la translocación en la M5, este caso y cualquier otro en los que hemos observado cambios en la presencia-ausencia, podrán ser interpretados con la correlación de datos clínicos relacionados al comportamiento, sin embargo puede especularse en este momento que también podrían deberse a la sensibilidad de la RT-PCR. Aunque esta técnica sea más sensible que otros métodos, tal vez no detecte un número significativo de células, las cuales más tarde alcanzarían horizontes detectables (25, 29).

9.9 Pacientes fallecidos durante el estudio.

Durante el tiempo en que se realizó el presente estudio desafortunadamente fallecieron 3 pacientes diagnosticados con SE/TNEP, 2 con rhabdomyosarcoma alveolar y 1 con Sarcoma sinovial. El pronóstico para todos estos pacientes es muy reservado, y las tasas de supervivencia a 5 años están por arriba del 60% (30), aunque estas tasas han mejorado sustancialmente en los últimos lustros, en general dependen del grado de diseminación al momento del diagnóstico y del subtipo de tumor.

10. CONCLUSIONES.

1. Por la técnica de RT-PCR se detectaron translocaciones positivas en 25 de 42 pacientes incorporados al estudio lo cual corresponde al 60%.
2. La concordancia para el SE/TNEP y el sarcoma sinovial fue del 100%. Para el rabdomiosarcoma alveolar la concordancia fue del 67%.
3. Se han encontrado en total 6 discordancias entre las categorías histopatológicas y los hallazgos moleculares lo que constituye aproximadamente el 24%.
4. La t (11; 22) que conduce a la fusión EWS-FLI se expresó en el 50% de los casos de SE/TNEP, el otro 50% corresponde a la t (21; 22) conduciendo a la fusión EWS-ERG. Lo que contrasta con las frecuencias reportadas en la literatura que corresponden a 85 y 15% respectivamente.
5. De 17 tumores analizados que no expresaron translocaciones, solo 8 casos correspondieron a algún tumor de células pequeñas redondas azules (6 SE/TNEP y 2 rabdomiosarcoma alveolar).
6. Fue posible detectar translocaciones positivas en células circulantes en la toma cero de 7 pacientes, 5 SE/TNEP y 2 rabdomiosarcoma alveolar.
7. En 14 pacientes se detectaron translocaciones positivas en sangre periférica en al menos una muestra tomada periódicamente.
8. No fue posible identificar células con t(X; 18) positiva en ningún caso de sarcoma sinovial.

11. PROPUESTAS - RECOMENDACIONES.

Aunque la RT-PCR ofrece conceptualmente grandes ventajas, su interpretación y extrapolación a la práctica clínica es un proceso todavía en validación. La asociación de los hallazgos moleculares con los eventos clínicos que se establezcan prospectivamente aportará o no la validez necesaria para que esta herramienta sirva como biomarcador molecular de categorías diagnósticas, de respuesta al tratamiento, de enfermedad diseminada y de recaída temprana.

Se prevé incorporar más pacientes al estudio, y también incluir dentro del panel de translocaciones los pares de oligonucleótidos para las variantes de SE/TNEP.

Sería interesante y útil en el largo plazo realizar la detección con RT-PCR en tiempo real ya que permitiría cuantificar el número de células en la muestra tomada que contienen la translocación y con esto se podría refinar el análisis de la carga de células tumorales circulando. Parámetro que probablemente sería de utilidad en la toma de decisiones terapéuticas en estos pacientes.

12. GLOSARIO.

Célula germinativa. Cualquier célula precursora capaz de dar origen a gametos.

Célula somática. Son aquellas que forman el crecimiento de tejidos y órganos de un ser vivo, procedentes de células madre originadas durante el desarrollo embrionario y que sufren un proceso de proliferación celular y apoptosis.

Desmoplasia. Fenómeno de producción excesiva de tejido conectivo, pobre en células y rico en fibras de colágeno, que suele acompañar a algunos tumores malignos epiteliales por activación excesiva de los fibroblastos.

Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's). Bases nitrogenadas unidas a una molécula de desoxirribosa y tres moléculas de fosfato. Es la forma como la ADN polimerasa puede reconocer a los nucleótidos para formar nuevas cadenas de DNA en el proceso de replicación o en la técnica de PCR.

Diagnóstico. Proceso por medio del cual se establece el estado de salud, así como los factores que lo determinan; puede ser aplicado a un individuo, familia, grupo o comunidad.

Diagnóstico genético. Metodología que permite, mediante el uso de sondas o detectores de ácidos nucleicos específicos, la identificación de secuencias específicas de DNA entre millones de ellas.

DNA (Acido desoxirribonucleico). Largo polímero lineal compuesto por cuatro tipos de nucleótidos de desoxirribosa que contiene la información genética. Es una hélice doble compuesta por dos hebras antiparalelas unidas por enlaces de hidrogeno entre bases púricas y pirimídicas.

DNA complementario (cDNA). Molécula de DNA sintetizada a partir de RNA, para la cual se requieren enzimas como reverso transcriptasa y DNA polimerasa I. Carece de los intrones presentes en el DNA genómico.

Electroforesis. Técnica que se emplea para separar moléculas cargadas eléctricamente con base en su velocidad de migración al someterse a un campo eléctrico. La velocidad a la cual se separan las moléculas es proporcional al tamaño de ellas.

Especificidad. Capacidad de una prueba diagnóstica de identificar en forma correcta la ausencia de una característica o enfermedad. Probabilidad que tienen los sanos o los no enfermos de salir negativos a la prueba que se estudia.

Estándar ideal. Criterio estándar, estándar de oro o de referencia. Método, procedimiento o medición que es ampliamente aceptado como el mejor disponible. Algo que sirve como base de comparación; una especificación técnica o reporte escrito efectuado por expertos y avalado por resultados científicos sólidos y/o por su experiencia.

Estudio descriptivo. Estudio diseñado únicamente para describir la distribución existente de variables sin considerar relaciones causales u otras hipótesis, habitualmente está basado en un solo grupo de estudio.

Estudio prospectivo. Característica de un diseño de investigación interesado en explorar a futuro las consecuencias de una determinada exposición o característica particular en los sujetos de estudio.

Exón. Secuencias de DNA que son transcritas y traducidas en una cadena polipeptídica.

Factor pronóstico. Condición, presente en personas ya enfermas, que se asocia con un determinado desenlace de dicha enfermedad.

Gen. Unidad física y funcional de la transmisión hereditaria. Es la secuencia de DNA necesaria para la síntesis de un polipéptido funcional o una molécula de RNA. Ocupa un sitio determinado en los cromosomas llamado *locus*.

Intrón. Porciones de DNA situadas entre regiones codificantes, las cuales se remueven durante una fase de procesamiento del transcrito primario; es decir, la información codificada por un intrón no aparece en el RNAm maduro ni en el polipéptido funcional.

Marcador molecular. Anormalidades genéticas específicas en algunos tumores.

Nucleótido. Molécula compuesta por una purina o pirimidina unidas a una pentosa y a uno o más grupos fosfatos unidos por un enlace fosfodiéster a una azúcar.

Oligonucleótido. Corta secuencia de ácido nucleico que contiene un grupo hidroxilo en el extremo 3', que forma pares de bases con una hebra patrón complementaria y actúa como un punto de inicio para la adición de nucleótidos, con la finalidad de copiar la hebra patrón.

Prevalencia. Proporción de individuos con una determinada enfermedad, identificados en un punto concreto en el tiempo.

Pronóstico. Predicción del curso futuro de una enfermedad basada en el conocimiento de su historia natural.

Proporción. Fracción que expresa la relación existente entre el número de observaciones de una clase con el número de observaciones hechas.

Recaída. Situación en la que un paciente se ve afectado, durante el periodo de convalecencia de una enfermedad, nuevamente por los síntomas de la misma.

Recidiva. Reparición del tumor maligno tras un periodo más o menos largo de ausencia de enfermedad.

Remisión. Período de tiempo en el que el cáncer está bajo control. A veces, se la describe como "parcial", lo que significa que el cáncer responde bien al tratamiento y está controlado. En ocasiones, la remisión es "completa", lo que quiere decir que el cáncer ya no puede detectarse mediante pruebas médicas.

RNA. Polímero de ribonucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, se forma por la transcripción del DNA o en algunos virus por la copia de una molécula de RNA molde.

RNA mensajero (RNAm). RNA que codifica el orden de los aminoácidos de una proteína. Se produce por la transcripción de DNA por la RNA polimerasa y en algunos virus a partir de RNA.

Sensibilidad. Capacidad de una prueba diagnóstica para detectar a los sujetos verdaderamente enfermos. Probabilidad que tienen los enfermos de salir positivos a la prueba en estudio comparado con la prueba que se utiliza.

Tasa de Incidencia. Número de casos nuevos de una enfermedad dado en una población durante un periodo de tiempo. La incidencia muestra la probabilidad de que una persona en esa población sea afectada por la enfermedad.

Tasa de Mortalidad. Estimación del número de muertes que ocurren en una población durante un periodo determinado.

Transcriptasa inversa. Enzima que transcribe la información de un virus tipo RNA a un genoma de DNA.

Transición epidemiológica. Cambios en el largo plazo en los patrones de mortalidad, enfermedad e invalidez que caracterizan a una población específica y que por lo general se presentan junto con transformaciones demográficas, sociales y económicas.

13. REFERENCIAS.

1. Alberts B. *Biología Molecular de la Célula*. 3ª ed.. España: Ed. Omega; 2004.
2. Fajardo Gutierrez A. *Epidemiología Descriptiva del Cáncer en el Niño*. Guadalajara: Ediciones Cuellar, S.A. de C.V; 2002.
3. Dos Santos Silva I. *Cancer Epidemiology: Principles and Methods*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1999.
4. Lessnick SL, Dei Tos AP, Sorensen PH, Dileo P, Baker LH, Ferrari S, et al. Small round cell sarcomas. *Semin Oncol*. 2009;36(4):338-46.
5. Rajwansi AS. Malignant small round cell tumors. *J Cytol*. 2009;26(1):1-10.
6. Debra GB. *Diagnostic Molecular Pathology*. Philadelphia, PA: Saunders; 2003.
7. Álava Ed. *Patología Molecular de los sarcomas*. *Oncología*. 2005;28:22-38.
8. Nambiar M, Kari V, Raghavan SC. Chromosomal translocations in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1786(2):139-52.
9. Davis RJ, D'Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA, Barr FG. Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*. 1994;54(11):2869-72.
10. Nussenzweig A, Nussenzweig MC. Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer. *Cell*. 2010;141(1):27-38.
11. Llorca Sales A. *Caracterización de los sarcomas de partes blandas. Detección de la enfermedad residual mínima*. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2006.
12. Pfeifer JD, Hill DA, O'Sullivan MJ, Dehner LP. Diagnostic gold standard for soft tissue tumours: morphology or molecular genetics? *Histopathology*. 2000;37(6):485-500.
13. Limon J, Dal Cin P, Sandberg AA. Translocations involving the X chromosome in solid tumors: presentation of two sarcomas with t(X;18)(q13;p11). *Cancer Genet Cytogenet*. 1986;23(1):87-91.
14. Clark J, Rocques PJ, Crew AJ, Gill S, Shipley J, Chan AM, et al. Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat Genet*. 1994;7(4):502-8.
15. Crew AJ, Clark J, Fisher C, Gill S, Grimer R, Chand A, et al. Fusion of SYT to two genes, SSX1 and SSX2, encoding proteins with homology to the Kruppel-associated box in human synovial sarcoma. *Embo J*. 1995;14(10):2333-40.
16. Kawai A, Woodruff J, Healey JH, Brennan MF, Antonescu CR, Ladanyi M. SYT-SSX gene fusion as a determinant of morphology and prognosis in synovial sarcoma. *N Engl J Med*. 1998;338(3):153-60.
17. Ladanyi M, Gerald W. Fusion of the EWS and WT1 genes in the desmoplastic small round cell tumor. *Cancer Res*. 1994;54(11):2837-40.
18. López Almaraz R, Raya Sánchez JM, Martínez Pineda B, Cabrera Rodríguez R, Rodríguez Luis J. Estudio de la enfermedad mínima residual en el cáncer infantil. *Oncología (Barcelona)*. 2004;27:17-26.
19. Messahel B, Hing S, Nash R, Jeffrey I, Pritchard-Jones K. Clinical features of molecular pathology of solid tumours in childhood. *Lancet Oncol*. 2005;6(6):421-30.
20. Kelly KM, Womer RB, Barr FG. Minimal disease detection in patients with alveolar rhabdomyosarcoma using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. *Cancer*. 1996;78(6):1320-7.
21. Giovannini M, Biegel JA, Serra M, Wang JY, Wei YH, Nycum L, et al. EWS-erg and EWS-Flil fusion transcripts in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors with variant translocations. *J Clin Invest*. 1994;94(2):489-96.
22. Fritsch MK, Bridge JA, Schuster AE, Perlman EJ, Argani P. Performance characteristics of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of tumor-specific fusion transcripts from archival tissue. *Pediatr Dev Pathol*. 2003;6(1):43-53.
23. Desmaziere C, Brizard F, Turc-Carel C, Melot T, Delattre O, Thomas G, et al. Multiple chromosomal mechanisms generate an EWS/FLI1 or an EWS/ERG fusion gene in Ewing tumors. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;97(1):12-9.

24. Jin L, Majerus J, Oliveira A, Inwards CY, Nascimento AG, Burgart LJ, et al. 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(4):224-30.
25. West DC, Grier HE, Swallow MM, Demetri GD, Granowetter L, Sklar J. Detection of circulating tumor cells in patients with Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. *J Clin Oncol*. 1997 ;15(2):583-8.
26. 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 Res*. 2002;62(16):4704-10.
27. Willeke F, Mechttersheimer G, Schwarzbach M, Weitz J, Zimmer D, Lehnert T, et al. Detection of SYT-SSX1/2 fusion transcripts by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) is a valuable diagnostic tool in synovial sarcoma. *Eur J Cancer*. 1998;34(13):2087-93.
28. Hashimoto N, Myoui A, Araki N, Asai T, Sonobe H, Hirota S, et al. Detection of SYT-SSX fusion gene in peripheral blood from a patient with synovial sarcoma. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(3):406-10.
29. Ghossein RA, Bhattacharya S, Rosai J. Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res*. 1999;5(8):1950-60.
30. Crist WM, Garnsey L, Beltangady MS, Gehan E, Ruymann F, Webber B, et al. Prognosis in children with rhabdomyosarcoma: a report of the intergroup rhabdomyosarcoma studies I and II. Intergroup Rhabdomyosarcoma Committee. *J Clin Oncol*. 1990;8(3):443-52.
31. Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, et al. Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *Embo J*. 1993;12(12):4481-7.
32. Vermeulen J, Ballet S, Oberlin O, Peter M, Pierron G, Longavanne E, et al. Incidence and prognostic value of tumour cells detected by RT-PCR in peripheral blood stem cell collections from patients with Ewing tumour. *Br J Cancer*. 2006;95(10):1326-33.
33. Shapiro DN, Sublett JE, Li B, Downing JR, Naeve CW. Fusion of PAX3 to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res*. 1993;53(21):5108-12.
34. Lewis TB, Coffin CM, Bernard PS. Differentiating Ewing's sarcoma from other round blue cell tumors using a RT-PCR translocation panel on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol*. 2007;20(3):397-404.
35. Kushner BH, LaQuaglia MP, Cheung NK, Kramer K, Hamelin AC, Gerald WL, et al. Clinically critical impact of molecular genetic studies in pediatric solid tumors. *Med Pediatr Oncol*. 1999;33(6):530-5.
36. Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ, 3rd, Emanuel BS, et al. Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet*. 1993;5(3):230-5.
37. Chomeczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.
38. Bennicelli JL, Edwards RH, Barr FG. Mechanism for transcriptional gain of function resulting from chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(11):5455-9.
39. Aplan PD. Causes of oncogenic chromosomal translocation. *Trends Genet*. 2006;22(1):46-55.
40. Anderson J, Renshaw J, McManus A, Carter R, Mitchell C, Adams S, et al. Amplification of the t(2; 13) and t(1; 13) translocations of alveolar rhabdomyosarcoma in small formalin-fixed biopsies using a modified reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Am J Pathol*. 1997;150(2):477-82.
41. Aman P. Fusion genes in solid tumors. *Semin Cancer Biol*. 1999;9(4):303-18.