



**CARACTERIZACIÓN DE LOS SARCOMAS
DE PARTES BLANDAS. DETECCIÓN DE LA
ENFERMEDAD RESIDUAL MÍNIMA**

TESIS DOCTORAL, 2006
Anna Llorç Sales

DIRECCIÓN:
Dra. Soledad Gallego Melcon

TUTORIA:
Dr. Josep Sánchez de Toledo Codina

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENT DE PEDIATRIA, OBSTETRICIA I GINECOLOGIA I MEDICINA PREVENTIVA

Dña. Soledad Gallego Melcon como directora y D. Josep Sánchez de Toledo Codina en calidad de tutor, doctores en Medicina y profesores asociados de Pedatría del Departament de Pediatria, Obstetricia y Ginecologia y Medicina Preventiva de la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICAN

Que Anna Llor Sales, licenciada en Medicina por la Universidad de Barcelona, ha realizado bajo nuestra dirección i tutoría el trabajo que lleva por título:

“Caracterización molecular de los sarcomas de partes blandas. Detección de la enfermedad residual mínima”

El cual consideramos satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Pediatria, Obstetricia y Ginecologia y Medicina Preventiva de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y para que así conste, expedimos el presente certificado en Barcelona a 12 de mayo de 2006.

Fdo: Soledad Gallego Melcón

Josep Sánchez de Toledo Codina

AGRAÏMENTS

Són molts els sentiments i les sensacions que sorgeixen en assolir una fita important. D'entrada, gràcies a tothom que ha col·laborat directa o indirectament en l'elaboració d'aquest treball.

A Soledad Gallego, directora d'aquest treball i cap clínic de la Unitat d'Oncologia Pediàtrica de l'Hospital Vall d'Hebron, per la teva ajuda generosa, per la teva inesgotable paciència i optimisme, però fonamentalment per la teva amistat. No se si cal dir-ho però ets un model a seguir, com exemple de persona polivalent que saps com treure el millor de la gent. Sincerament, has estat el cor d'aquest vaixell que tant a costat portar-lo a port.

Al Josep Sanchez de Toledo, Cap de Servei de la Unitat d'Oncohematologia pediàtrica, per haver confiat amb mi i deixar-me formar part d'un equip humà amb una tasca tan honorable. Gràcies per haver-me ofert una formació integral en Oncohematologia Pediàtrica, per haver acceptat la tutoria d'aquest treball i haver-me estimulat en aquells moments difícils.

A tots els companys de laboratori, que tantes hores hem compartit i gaudit, i que, malgrat tenir unes formacions tant dispars ens ha unit les ganes de fer les coses bé, amb rigor i d'assolir un objectiu comú, la tesi doctoral. Al Pep Roma, actualment investigador post-doc del nostre grup, per la teva ajuda en els aspectes tècnics del treball, al Tomàs i al Toni pel vostre interès i ajuda en aquelles llargues sessions de PCR. A la Marta Valeri per l'aportació en la seqüenciació. A la Patri Benedit, a l'Anna i al Víctor Díaz pels consells en els cultius cel·lulars. Al Mariano Hurtado per l'alegria (recuerdalo el pingüino nos unirá siempre). Al David per ser un exemple de tenacitat increïble, al Víctor per ser diferent. A l'Ester pels efectius consells. Al Jesús Planagumà, per a ser honest amb les teves qualitats i no abandonar-les pel camí. Gràcies a tots els investigadors dels laboratoris de la catorzena planta, sense excepció, ara traslladats a la nova àrea de la Fundació. Gràcies al Jaume Reventòs, responsable de la Unitat de Recerca Biomèdica, a la Francina i la Rossana.

A tots els companys pediatres del nostre Servei d'Oncohematologia Pediàtrica, a la Pilar companya propera de feina, per la teva comprensió, generositat diària i per la teva docència contínua en hematologia. Al Tino pels teus "sempre savis" consells i per la teva amistat. Al Luís Gros per estar sempre tan disposat a ajudar a tothom, ets increïble. A la Cristina per mostrar tan interès en l'evolució del treball des de l'inici. A la Tere per la teva docència en citologia. Al Jose Luís i a la Dominique, per la vostra amistat. A l'Antònia, a la Carme i a la resta d'infermeria per la seva ajuda en la recollida de mostres.

Al JJ Ortega, actualment emèrit del nostre Hospital, per ser el meu tutor en Hematologia i transmetrem la sàvia experiència acumulada arrel de molts anys de dedicació al coneixement fonamentalment de les leucèmies.

A la Unitat de Cirurgia pediàtrica, al Vicenç Martínez Ibáñez, al Josep Lloret i a la Claudia Maruhenda, per la seva col·laboració en la recollida de mostres tumorals a quiròfan i pel vostre interès.

A la Núria Toran, metge d'Anatomia Patològica, per la teva generosa col·laboració en la documentació gràfica de la histologia dels tumors i en l'aportació de mostres control. T'agraeixo molt sincerament la sensibilitat envers el treball. A la Dra Torrabadella, a Lluís Massuet i resta de l'equip del Banc de Sang per la col·laboració en el subministra de mostres de leucafèresi.

A la Paqui Gallego per la teva gran ajuda en el tram final del treball. Ets una gran persona.

Als protagonistes indirectes d'aquest treball, els nens i nenes malalts de la nostra Unitat d'Oncohematologia, molt especialment a la Núria, com exemple de coratge i lluita, allà on siguis, una part d'aquest treball va per a tu.

A tots els companys pediatres que hem compartit o compartim a diari les tasques assistencials per l'interès demostrat. Als meus companys de residència, especialment a Iñiqui Irastorza, Marta Domínguez, Isabel Abadia i al Francesc Fornaguera. A totes les promocions de residents pel seu estímul jove i agosarat, com ara en Quique, la Queralt, en Joan ST, l'Izaskun, l'Anina, en Ferran i en Marc entre d'altres. A l'Andreu Parareda pediatra i company de laboratori tots

aquests anys, el teu esforç previ m'ha estimulat molt durant tot el temps. Als meus amics Andrés, Bea, Luís, Idoia, Eva i Pino, senzillament pels moments compartits.

Als meus pares, Josep i Teresa, per ser un model d'austeritat i treball. Per l'esforç en la formació, meva i la dels meus germans. Per estar sempre al meu costat, recolzant-me i respectant-me. Als meus germans Josep y Montse per ser els meus amics més estimats.

A Santos i Begoña, que tan ens ajuden en la difícil tasca de conciliació de la vida laboral i familiar.

Gràcies, Jorge, per compartir amb mi aquesta aventura. Ja saps que sense el teu optimisme, estímul i ànim constants aquest treball no hagués arribat a port. Gràcies per estimar-me.

Finalment, unes gràcies molt especials als meus tres petits tresors, Guillem, Marta i Miquel, per haver-me permès "robar" el vostre temps, per acabar aquests "deures tant estranys". Un petó molt fort a tots tres.

Llegará una época, en la que la investigación diligente y prolongada sacará a la luz cosas que hoy están ocultas. La vida de una sola persona, aunque estuviera toda ella dedicada al cielo, sería insuficiente para investigar una materia tan vasta... Por lo tanto este conocimiento sólo se podrá desarrollar a lo largo de sucesivas edades. Nuestro universo sería muy limitado si no ofreciera a cada época, algo que investigar. La naturaleza no revela sus misterios de una vez para siempre.

***SÉNECA, Cuestiones Naturales.
Libro 7, Siglo Primero***

ÍNDICE

AGRAÏMENTS	5
INDICE	11
INTRODUCCIÓN	17
1- RABDOMIOSARCOMA	20
1.1- EMBRIOGÉNESIS MUSCULAR	20
1.2- LOCALIZACIÓN	22
1.3- CLASIFICACIÓN	22
1.4- ETIOLOGIA	23
1.5- INMUNOHISTOQUÍMICA	24
1.6- ALTERACIONES CROMOSÓMICAS	25
1.6.1- TRASLOCACIONES	25
1.6.1.1- t (2;13) PAX3/FKHR	25
1.6.1.2- t (1; 13) PAX7/FKHR	26
1.6.2- AMPLIFICACIONES GENÓMICAS	27
1.6.2- PÉRDIDA ALÉLICA EN 11p15	28
1.6.3- ALTERACIONES EN p53 y p16	30
1.6.4 –EXPRESIÓN WT1	30
1.7-GENES DE MULTIRRESISTENCIA A DROGAS Y RABDOMIOSARCOMA	31
1.8- RECEPTOR DE ACETILCOLINA	32
2- EL SARCOMA DE EWING	33
2.1- ALTERACIONES GENÉTICAS	34
2.1.1- TRANSLOCACIONES GÉNICAS	34
2.1.2- OTRAS ALTERACIONES GÉNICAS	37
3- ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL	38
3.1-EMR Y RABDOMIOSARCOMA	39
3.2- EMR Y SARCOMA DE EWING	40
HIPÓTESIS DE TRABAJO	43
OBJECTIVOS	47
1- OBJETIVO PRIMARIO	49
2- OBJETIVOS SECUNDARIOS	49

MATERIAL Y MÉTODOS	51
1- PACIENTES	53
2- MUESTRAS	54
2.1- MUESTRAS TUMORALES	54
2.2 - MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA	54
2.3 - MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA	55
3- APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA Y CONSENTIMIENTO INFORMADO	55
4- EXTRACCIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	55
4.1 – EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	55
4.2 – EXTRACCIÓN DE RNA MENSAJERO	56
4.3 – EXTRACCIÓN DE DNA	57
5- CULTIVOS CELULARES	57
6- ENSAYO DE EXPRESIÓN DE GENES DE FUSIÓN MEDIANTE PCR	59
6.1- RABDOMIOSARCOMA ALVEOLAR	59
6.2- SARCOMA DE EWING/PNET	62
7- ENSAYO DE SEMICUANTIFICACIÓN MEDIANTE DENSITOMETRÍA COMPARATIVA. MULTIPLEX PCR DEL RACH PARA LA EMR EN EL RMSe	66
8- PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL	67
8.1- PCR EN TIEMPO REAL EN RABDOMIOSARCOMA ALVEOLAR	69
8.2- PCR EN TIEMPO REAL EN SARCOMA DE EWING	73
8.3- PCR EN TIEMPO REAL EN RMS EMBRIONARIO	74
9- ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD	75
10- ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD	76

RESULTADOS	77
1- SENSIBILIDAD DE LOS ENSAYOS	79
2- ESPECIFICIDAD DE LOS ENSAYOS	88
3- SARCOMA DE EWING	92
3.1 - ANÁLISIS DE LOS TIPOS DE FUSIÓN SARCOMA DE EWING	92
3.2- MONITORIZACIÓN DE LA EMR EN EL SARCOMA DE EWING MEDIANTE PCR ANIDADA Y PCR EN TIEMPO REAL	94
3.2.1- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES	94
3.2.2- DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE FUSIÓN EWS-FLI-1 Y EWS-ERG EN SP/MO/LEUCAF	95
3.2.3- RESUMEN DE LA DETECCIÓN DE EMR MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL/PCR ANIDADA EN LOS PACIENTES AFECTOS DE SARCOMA DE EWING	109
4- RABDOMIOSARCOMA	111
4.1- ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ACETIL COLINA EN EL RABDOMIOSARCOMA	111
4.2- MONITORIZACIÓN DE LA EMR MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL EN RMS	114
4.2.1- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES	114
4.2.2- DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE FUSIÓN FUSIÓN PAX3-FKHR, PAX7-FKHR, RECEPTOR DE ACETIL COLINA (subunidades alfa y gamma) Y MYOD-1 EN SP/MO/LEUCAF	116
4.3- RESUMEN DE LA EMR EN LOS PACIENTES CON RMS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL	137
4.4- CORRELACIÓN ENTRE MARCADORES (PAX3/7-FKHR, MYOD-1, RCh)	138
4.5- ENFERMEDAD MICROMETASTÁSICA EN MO Y EVOLUCIÓN	139
4.6- ENFERMEDAD MICROCIRCULANTE Y EVOLUCIÓN	140
5- SARCOMA BIFENOTÍPICO	141
6- ANÁLISIS CONJUNTO DE TODOS LOS PACIENTES: RMS+SE	144

6.1- ANALISIS DE SUPERVIVENCIA.	146
6.1.1-ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD (SLE) SEGÚN SP AL DIAGNÓSTICO	148
6.1.2-ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA GLOBAL (SG) SEGÚN LA SP AL DIAGNÓSTICO	150
6.1.3- ANÁLISIS DE SLE SEGÚN LA MO AL DIAGNÓSTICO	152
6.1.4- ANÁLISIS DE SG SEGÚN LA MO AL DIAGNÓSTICO	154
6.1.5- ANÁLISIS DE SLE SEGÚN LA SP AL FINAL DEL TRATAMIENTO	156
6.1.6- ANÁLISIS DE SG SEGÚN LA SP AL FINAL DEL TRT	158
6.1.7- ANÁLISIS DE SLE SEGÚN LA SP DURANTE EL SEGUIMIENTO	160
6.1.8- ANÁLISIS DE SG SEGÚN LA SP DURANTE EL SEGUIMIENTO	162
DISCUSIÓN _____	163
CONCLUSIONES _____	173
BIBLIOGRAFIA _____	177

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El cáncer en la edad pediátrica representa una pequeña proporción de la incidencia de neoplasias en la población general. En los países industrializados la proporción de cáncer que aparecen en los primeros 15 años de la vida representa el 2% de todas las neoplasias, con una incidencia anual de aproximadamente 130 nuevos casos por millón de niños y año. A pesar de esta baja incidencia, es la enfermedad que tiene la tasa de mortalidad mayor, siendo responsable del 10% de las muertes durante esta época de la vida y sólo está superada por los accidentes.

Las particulares características clínicas, biológicas y genéticas, el cáncer pediátrico ha contribuido substancialmente a la comprensión de los acontecimientos genéticos asociados a la transformación maligna.

Los sarcomas de partes blandas son un grupo heterogéneo de neoplasias que derivan de las células mesenquimales primitivas distribuidas en todo el cuerpo. Representan el tercer tumor sólido más frecuente en los niños, aproximadamente un 7 % de todos los tumores sólidos infantiles¹. Este tipo de sarcomas y en especial los incluidos dentro del grupo de "*Tumores de célula pequeña y redonda*", (Sarcoma de Ewing, Rabdomiosarcoma, Neuroblastoma y Linfoma), tienen diferencias a veces sutiles, a nivel histológico, dificultando enormemente el diagnóstico. El desarrollo de las técnicas de citogenética y biología molecular, han permitido la identificación de translocaciones cromosómicas y productos de fusión característicos, como EWS-FLI1 y EWS-ERG en el caso del sarcoma de Ewing y PAX3-FKHR y PAX7-FKHR, en el Rabdomiosarcoma, representando una herramienta muy útil en el diagnóstico diferencial.

1- EL RABDOMIOSARCOMA

El Rabdomiosarcoma (RMS) es el tumor de partes blandas más frecuente en niños. Dos terceras partes de los RMS se desarrolla en niños menores de 10 años. Deriva de las células mesenquimales primitivas, aunque se desconoce la célula exacta de origen y podría originarse tanto de fibroblastos como de precursores miogénicos.

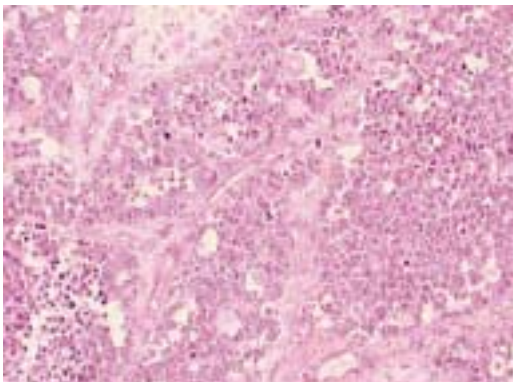


Fig1 RMS alveolar

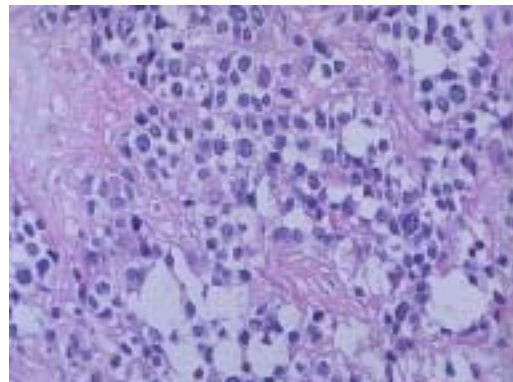


Fig2 RMS embrionario

1.1- EMBRIOGÉNESIS MUSCULAR

Es importante conocer la miogénesis para comprender mejor la tumorigénesis del Rabdomiosarcoma. El músculo esquelético deriva de las condensaciones de mesodermo, conocidas como somitas, en respuesta a señales moleculares de estructuras adyacentes, durante la tercera semana de la embriogénesis. Hay dos tipos de poblaciones celulares: una migratoria, llamada dermomiótomo lateral, que formará el músculo esquelético y la dermis de las extremidades y otra, no migratoria de la cual derivará la musculatura axial y del tronco. Hay una serie de factores de transcripción llamados Pax 3 y Pax 7 que actúan en el inicio de la cascada de factores de regulación miogénicos Myf5 y MYOD1. La proteína PAX 3 se expresa con niveles más altos en el dermomiótomo lateral mientras que la proteína Pax 7 se expresa a niveles más bajos a lo largo de todo el dermomiótomo. La ausencia de Pax 3 homocigoto, se traduce con alteraciones del tubo neural y ausencia de musculatura esquelética⁹. La ausencia completa de Pax 7 también se manifiesta con alteraciones del neuroeje pero en cambio no presenta alteraciones musculares¹⁰. Se sabe que la

alteración en el desarrollo de las extremidades se debe a una alteración en la migración de los precursores del dermomiótomo lateral¹¹ y que la proteína Pax3 juega un papel importante en el desarrollo muscular inicial, dirigiendo a los precursores miogénicos durante la migración muscular. Los factores de regulación miogénicos (Myf5, MYOD1, Myf4 y miogenina) tienen un papel crucial en la orquestación de la miogénesis. Todos ellos comparten un dominio básico de *helix-loop-helix*, pero difieren en el N y C terminal. Este hecho les confiere funciones distintas, así MYOD1 es importante para el iniciar la transcripción de genes normalmente silentes, es decir que posee propiedades de dominio específico. En cambio el dominio de la miogenina actúa como activador general, aumentando el nivel de expresión de los genes que ya se han expresado, es decir que posee una función de obertura de la estructura cromatínica.

El proceso de la miogénesis puede dividirse en una secuencia de sucesos temporales: proliferación de mioblastos mononucleados, fusión celular para formar miotúbulos multinucleados y maduración posterior de estos últimos en diferentes tipos de fibras. Durante todo este proceso se produce una expresión diferencial de dos familias de factores de transcripción: los factores reguladores musculares (FRMs)¹² y los factores de transcripción MAD-box de la familia de MEF2. La decisión de continuar la proliferación de los mioblastos o bien iniciar la diferenciación muscular depende del equilibrio entre reguladores de ciclo celular positivo y negativo. Así, es necesaria la expresión de inhibidores de la ciclin-quinasa para que los FRMs hagan su función y se inicie la fusión y maduración de los miotubos multinucleados. Este proceso está asociado a la expresión de factores de diferenciación tardíos como las cadenas ligeras y pesadas de la miogenina, la creatin-quinasa muscular y el receptor de acetilcolina, que en la cascada se encuentran situados entre los FRMs y los factores de la familia MEF2.

Se han estudiado mediante microarrays la expresión de miles de genes involucrados en la secuencia temporal de la miogénesis¹³.

1.2- LOCALIZACIÓN

Este tumor deriva de las células mesenquimales primitivas, por lo que puede aparecer en cualquier parte del cuerpo, incluido en zonas donde normalmente no se encuentra músculo estriado. Los lugares más frecuentes son: genitourinario (24%), parameningeo (16%), extremidades (19%), órbita (9%), otras zonas de cabeza y cuello (10%) y miscelánea (22%)²⁻³⁻⁴.

Es fundamental realizar un diagnóstico preciso con el fin de establecer un tratamiento adecuado. El diagnóstico se basa en la demostración de diferenciación a músculo esquelético neoplásico.

1.3- CLASIFICACIÓN

Históricamente el RMS se ha dividido en dos subtipos histológicos, con diferente aspecto y comportamiento clínico: el RMS alveolar (RMSa) y el RMS embrionario (RMSe)⁸, siendo la clasificación más ampliamente aceptada la de la organización mundial de la salud, que divide el rabdomiosarcoma en dos grandes tipos, el **RMS Alveolar** (50-60%) y el **RMS embrionario** (25-30%), incluyendo la variante botrioides. En otras clasificaciones (SIOP, NCI) se incluye otra variante: el RMS **Pleomórfico** (5%). Este último afecta fundamentalmente a adultos, localizándose generalmente en las extremidades, mientras que los dos anteriores, aparecen en la edad pediátrica (0-15 años) y se localizan en cabeza y cuello, tracto genitourinario vía biliar, tronco y extremidades.

Es muy importante diferenciar los subtipos, porque el RMSa tiene peor pronóstico con propensión a diseminación metastásica precoz, mala respuesta a la quimioterapia y recaídas precoces.

RMSe está formado por células mesenquimales en diferentes estadios de diferenciación muscular. Está formado por células mesenquimales que tienden a la diferenciación de músculo estriado. Es un tumor con una celularidad moderada y un estroma mixoide laxo, aunque puede haber zonas mucho más compactas. Tienen un núcleo más pequeño que el RMSa, una cromatina laxa y un nucleolo difícil de ver.

El subtipo botrioides del RMSe, se caracteriza por presentar un aspecto macroscópico en racimo. Es de gran valor diagnóstico la visualización del epitelio, que debe estar intacto.

El RMSa presenta un patrón de septos que remedan alvéolos, aunque puede no siempre existir (la variante sólida) y entonces resulta muy difícil el diagnóstico únicamente morfológico. La existencia, aunque sea mínima, de un patrón alveolar, es suficiente para catalogarlo de RMSa.

Los estudios comparativos entre ambos subtipos han mostrado a nivel citogenético unas anomalías cromosómicas únicas y características del RMSa: La traslocación t(2;13), que está presente en el 55% de los pacientes con el subtipo alveolar de RMS¹⁶. Las bases moleculares de dicha traslocación consisten en la creación de un producto quimérico de fusión que involucra al gen PAX 3 del cromosoma 2 y a un miembro de la familia forkhead (FKHR) del cromosoma 13, generando un factor de transcripción quimérico. Asimismo el 22% de los RMSa, presentan la traslocación variante t(1;13) caracterizada por un reordenamiento del gen PAX7 del cromosoma 1 que se fusiona con el FKHR del cromosoma 13.

Estas fusiones se detectan en alrededor de un 80% de RMSa, aunque no se detecta ninguna traslocación en el RMSa congénito. Existen ciertas diferencias en cuanto al pronóstico de estos dos tipos de fusiones, así en el RMSa **metastático** que expresa PAX3-FKHR tiene peor pronóstico.

La clasificación internacional del RMS también ha descrito otra variante dentro del RMSe, el **RMS anaplásico**⁸, que correspondería al equivalente pediátrico del RMS pleomórfico, y su comportamiento es más agresivo acercándose al RMSa²².

1.4- ETIOLOGIA

Determinadas alteraciones genéticas se han relacionado con un aumento de incidencia de determinados tumores y en especial el RMS. Li y Fraumeni¹⁴⁻¹⁵ en 1969 describieron una serie de familias todas ellas poseedoras de la mutación (ausencia) del gen p53. Este es un gen supresor de tumores y juega un papel crucial en el arresto celular o en la apoptosis cuando se produce una alteración en el DNA. Estas familias tienen una alta incidencia de cáncer de

mama, osteosarcomas, sarcomas de partes blandas, leucemias, gliomas y carcinomas adrenocorticales. También se han relacionado con anomalías congénitas genitourinarias y cerebrales, neurofibromatosis y el Síndrome alcohólico-fetal.

1.5- INMUNOHISTOQUÍMICA

Las proteínas de regulación muscular actúan como factores de transcripción e inducen la miogénesis. MYOD1, concretamente, induce la diferenciación, mediante la activación de genes músculo-específicos y es importante en el paso de la fase de proliferación muscular a la fase de diferenciación.

Clásicamente para detectar marcadores de diferenciación muscular se han utilizado la expresión de desmina, actina, o la mioglobina, aunque estos marcadores no son nada específicos de RMS y se encuentran en otros tumores (p.ej. T Wilms rhabdomiomas).

La utilización de anticuerpos anti-MYOD1 que reconoce un epítipo cercano al C-terminal de la proteína MYOD1 y la anti-miogenina que reconoce un epítipo en la región 138-158 de la molécula de miogenina, han demostrado tener una alta especificidad.⁷¹⁻⁷² Así todos los RMS presentan tinción positiva a nivel nuclear (la expresión citoplasmática no resulta específica) de miogenina y MYOD1, a diferencia de la mayoría de otros tumores pediátricos no-RMS. Además el patrón de expresión inmunohistoquímico permite en cierto modo diferenciar el RMSe del RMSa. El RMSa presenta un patrón de expresión nuclear mucho más uniforme (en un 75% de las células tumorales), en cambio el RMSe, el nivel de expresión es menor (25% de las células tumorales)²¹.

Se han establecido relaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y las alteraciones moleculares, sugiriendo que el RMSe se produce por un bloqueo más inicial en el proceso de la miogénesis, basándose que este tipo expresa tres veces menos miogenina que el RMSa. Es decir que el RMSa parece tener un mayor grado de diferenciación miogénica que el RMSe.

1.6- ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

Se han descrito múltiples alteraciones genéticas en casi todos los pasos de la proliferación celular y la diferenciación muscular y que en su conjunto darían como resultado el RMS.

1.6.1- TRASLOCACIONES

Son características exclusivas del RMSa. Se han descrito los siguientes dos tipos (Fig 3):

1.6.1.1- t(2;13) PAX3/FKHR

Está presente en el 70% de los RMSa. Las bases moleculares de dicha translocación consisten en la creación de un producto quimérico de fusión que involucra el gen Pax3 del cromosoma 2, y a un miembro de la familia forkhead (FKHR) del cromosoma 13, generando un factor de transcripción quimérico. . La región 5'PAX 3 codifica un dominio relacionado con la unión al DNA y esta translocación crea un factor quimérico de transcripción que altera la expresión de un grupo de genes diana. Estas alteraciones moleculares características están siendo utilizadas para la detección sensible y específica de enfermedad residual en esta neoplasia, aunque aún no ha podido demostrarse la significación pronóstica de la misma (Kelly K et al 1996, Naito N et al 2000, Merino M 2001, Gallego S et al 2001). La fusión une los exones 1 al 7 de Pax3 y los exones 2-3 de FKHR.

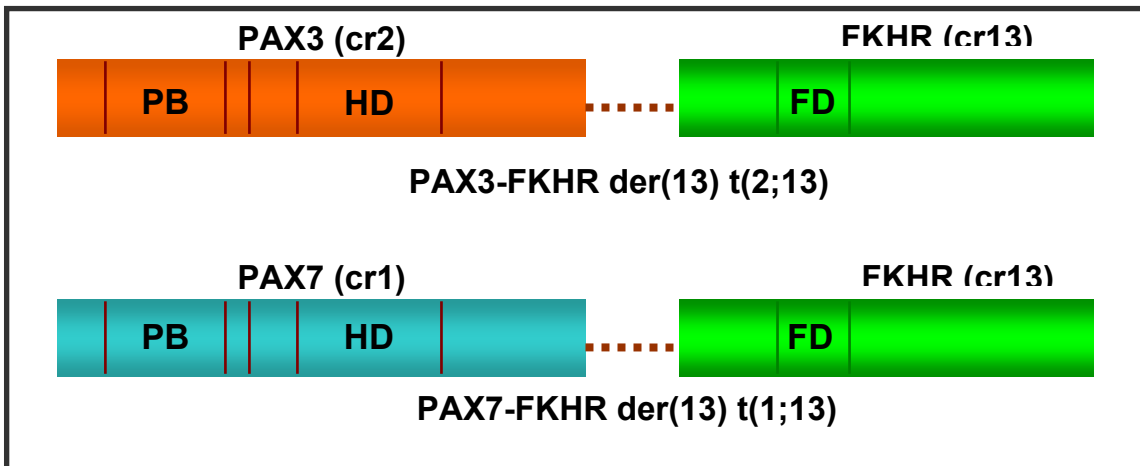


Fig 3 Esquema de la fusión PAX3/7-FKHR

1.6.1.2- t(1;13) PAX7/FKHR

Está presente en el 10% de los RMSa. La fusión de Pax7 tienen una estructura muy similar a la de Pax3-FKHR y de hecho la región 5'Pax7, que contiene el dominio de unión a DNA, se une a la secuencia 3'FKHR, exactamente en el mismo intrón de FKHR que para Pax3-FKHR.

A pesar de las similitudes hay diferencias notables. Pax7-FKHR, a diferencia de Pax3-FKHR, presenta amplificación del gen y normalmente se da en niños más pequeños. Frascella et al 2000 describieron por cebadora vez la presencia en una misma línea celular, la amplificación de forma de dobles minutos, del gen de fusión PAX7-FKHR y el NMYC.

Además Fitzgerald J et al, 2000,⁴⁰ sugieren que estas diferencias podrían significar mecanismos oncogénicos distintos. Pax3-FKHR tiene tendencia a presentar translocaciones recíprocas, a diferencia nuevamente de Pax7-FKHR. Una explicación para tales diferencias, estaría en la diferente orientación de Pax7, es decir que el extremo 5' de Pax 7 está más cerca del centrómero, siendo telomérica la dirección de la transcripción. La fusión Pax7-FKHR necesitaría 3 zonas de rotura en lugar de las dos de Pax3-FKHR. Estas estarían: una en el intrón 7 de Pax7, otra en el intrón 1 de FKHR y una adicional más allá de Pax7 o FKHR para invertir la orientación de uno de los dos genes.

⁴⁰ La fusión une los exones 1 al 7 de Pax 7 a los exones 2-3 de FKHR.

Las diferencias entre los dos tipos de fusiones, son fundamentales y determinan un pronóstico muy distinto. Así, mientras que en la enfermedad localizada no

hay diferencias, en la enfermedad metastásica las diferencias son enormes. Sorensen et al, 2002, en un análisis multivariable demostraron que los pacientes con enfermedad metastásica que expresaban Pax3-FKHR tenían un elevado índice de fracasos terapéuticos y éxitos, con una supervivencia libre de enfermedad (SLE) de un 8%, mientras que si expresaban Pax7-FKHR la SLE era del 75%. Atendiendo a la localización de las metástasis se evidenciaba que en el caso de Pax3-FKHR, eran mucho más frecuentes las localizadas en médula ósea.³⁹

1.6.2- AMPLIFICACIONES GENÓMICAS

Numerosos autores han descrito amplificación genómica analizando a nivel de DNA la presencia de anomalías cromosómicas en forma de dobles minutos o regiones teñidas homogéneamente. Kenet et al 1998, Kiullendorff et al 1998 describieron 11 amplificaciones de 70 RMSa, y a su vez Mitelman 1998 y Pulito 1999 describieron 3 amplificaciones de 30 RMSe.

También, mediante otras técnicas como la hibridación genómica comparada varios autores encontraron amplificación genómica, en alto porcentaje de los RMSa y en algunos de los RMSe.¹⁷⁻¹⁸

La amplificación del gen MYCN, en la región 2p24, se presenta en un 25-40% de los RMS. Esta amplificación se traduce en un aumento de la expresión del factor de transcripción MYCN, dando como resultado la aceleración de la progresión del ciclo celular y sensibilizaría las células hacia la apoptosis, con degradación del DNA y desestructuración nuclear previos a la desintegración de la membrana. Driman 1994 y Hachitanda 1998 entre otros, lo correlacionan con un peor pronóstico. En el caso del Neuroblastoma (tumor derivado de las células primitivas del sistema nervioso simpático), la amplificación del gen MYCN, podría ser un efecto iniciador tumoral¹⁹. Este hecho no se ha podido demostrar en el caso de la sobreexpresión del gen MYCN en el músculo, y podría tratarse de una alteración adquirida durante el proceso tumoral.

También se hallan frecuentemente amplificadas en el RMS la región 12q24 y en ellas se localizan genes CDK4, GLI, SAS, MDM2 (este último interactúa con el gen p53)²⁰. Recientemente, Ragazzini et al (2004), analizaron 9 RMSa y 13 RMSe (7 anaplásicos), mediante PCR cuantitativa, evidenciando una

amplificación o sobreexpresión de estos genes no solo en el RMSa sino también en el RMSe anaplásico. Los genes CDK4 y SAS fueron los más frecuentemente alterados (36% cada uno). El primero pertenece a la familia de kinasas ciclo-dependientes, y se postula que podría tener un papel crucial en la regulación del ciclo celular²³. El gen SAS es más desconocido y codifica para una proteína transmembrana (TM4SF), relacionada con traducción de la señal y proliferación celular.

El gen MDM2, alterado el 23%, juega un importante papel en la tumorigénesis, mediante la interacción con p53, aunque la baja frecuencia indicaría que no es un gen iniciador tumoral. Keleti et al, 1996, han propuesto que la sobreexpresión del MDM2 constituye un mecanismo alternativo a la inactivación de P53. Cuando se produce un acúmulo de proteína p53 y en ausencia de mutación de la misma, MDM2 estabiliza a esta mediante precipitación. Es decir que la sobreexpresión de MDM2 sería la consecuencia, y no la causa del acúmulo de p53.

Finalmente se encontró en un 14%, alteración en GLI. A pesar de estos datos, no se ha podido establecer una relación entre las alteraciones en esta región 12q13-15 y el comportamiento clínico patológico de los tumores.²⁴

1.6.3- PÉRDIDA ALÉLICA EN 11p15

El RMSe se caracteriza por presentar frecuentemente pérdidas de heterocigocidad (LOH) en 11p15 y estos estudios de LOH definirían un supuesto gen supresor distal al locus D11S988²⁵⁻²⁶ (Fig.4). Esta pérdida afecta a información genética materna, junto con duplicación de información genética paterna situada en ese locus (isodisomía parental)²⁷. Esta región tiene un interés especial por la localización del gen IGF-2, que codifica para un factor de crecimiento que se cree podría jugar un papel destacado en la patogénesis del RMS²⁸. Este gen está sobre expresado por un mecanismo, a nivel de DNA, de duplicación del alelo paterno, por pérdida del patrón normal de *imprinting* materno. También se ha postulado que la pérdida de heterocigocidad en 11p15, afecte a un gen supresor de tumor (se ha propuesto el gen H19, adyacente a IGF-2). Se cree que la suma de las dos situaciones, sobreexpresión de IGF-2 y ausencia de un gen supresor, afecten al desarrollo del RMSe.

La sobreexpresión de IGF-2 se produce tanto en el RMSa como en el RMSe, y de hecho hay experimentos que bloqueando con anticuerpos monoclonales IGF-2, consiguen inhibir la proliferación “in vitro” de las células tumorales. Esta expresión tan ubicua en el RMS implica una combinación de diversas alteraciones genéticas localizadas en esta región 11p15.5.

Prácticamente se ha completado el mapa de esta región crítica 11p15.5, revelando nuevos genes sometidos a *imprinting*, con una función supresora directa o indirecta. Un ejemplo sería el gen GOK, que se expresa en el músculo esquelético normal, y en cambio está ausente en el RMS. Si transfectamos este gen a células de rhabdomyosarcoma se induce apoptosis.²⁹

A pesar de todos estos avances, todavía no se ha identificado la verdadera importancia de IGF-2 y los genes supresores de esta región en el RMS.

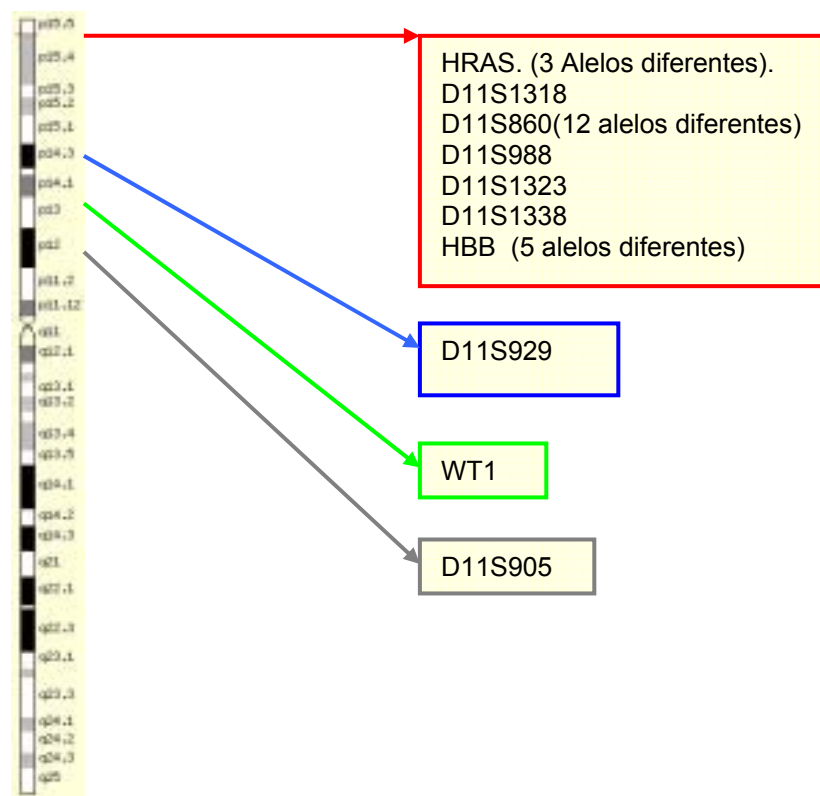


Fig 4. Cromosoma 11. Estudio de LOH en la región 11p15.

1.6.4- ALTERACIONES EN p53 y p16

La mutación constitucional de p53, afecta a las familias afectas del síndrome de Li-Fraumeni. Estas, tal como se ha comentado anteriormente, tienen una alta predisposición a desarrollar varios tumores y en especial RMS. La mutación p53 a nivel somático también se produce en muchos casos de RMS esporádico. Para dilucidar el papel que juega p53, debemos analizar las moléculas que la regulan. Los dos reguladores más importantes son MDM2 y p19^{ARF} 31. El primero regula negativamente a p53, y está amplificado en el RMS. p19^{ARF} regula a su vez negativamente a MDM2, y así su pérdida, equivaldría a la amplificación de MDM2 o la pérdida de p53.

Otra función atribuida a p53 es la inhibición de la función de diferenciación muscular desarrollada por el gen MYOD1.

1.6.5 –EXPRESIÓN WT1

El gen WT1 codifica para un factor de transcripción relacionado con el desarrollo normal y neoplásico. Es necesario para la proliferación y la diferenciación.

Se ha descrito la mutación de WT1 en síndromes como Denis-Drash y WARG, manifestándose entre otros como alteraciones genitourinarias, predisposición a tumor de Wilms y aumento de la incidencia de RMS.

En el desarrollo normal WT1 está implicado en la diferenciación de varios tejidos mesenquimales, sobre todo en el desarrollo del riñón y gónadas, pero también en el desarrollo de la pared muscular.

Inicialmente se consideró un gen supresor, aunque posteriormente y en determinadas mutaciones, también se le han atribuido funciones activadoras u oncogénicas. La expresión de WT1 se ha descrito en numerosos tipos de tumores como el cáncer de mama, los tumores genitourinarios (Wilms) y los incluidos en el grupo de tumores de célula pequeña y redonda (SRBCTs).

Recientemente, Carpentieri et al, 2002, describió por primera vez la utilidad del anticuerpo anti-WT1, en los tumores SRBCTs. El RMS presentaba una localización de WT1 exclusivamente citoplasmática, a diferencia del tumor de Wilms (WT), que era nuclear, y del sarcoma de Ewing, que no presentaba

ninguna localización. Este hecho a su vez podría establecer una cierta conexión entre el tumor de Wilms la diferenciación miogénica y el RMS.³¹

La proteína WT1 podría ser determinante en la inhibición de la diferenciación muscular y la pérdida de su función comportaría la diferenciación miogénica, aunque hay en este punto cierta controversia.

Tiffin et al, 2003, demuestra que la expresión de WT1 en mioblastos murinos, inhibe la diferenciación miogénica del RMS.

1.7- GENES DE MULTIRRESISTENCIA A DROGAS Y RABDOMIOSARCOMA

La multirresistencia a múltiples agentes quimioterápicos, es una de las causas más frecuentes de fracaso terapéutico en los pacientes afectos de tumores como el RMS.

La multirresistencia a drogas, (Multidrug resistance, MDR), se caracteriza por una reducción en el acúmulo de droga intracelular. Es debido a una sobreexpresión de varios genes de la misma familia, entre ellos MDR-1 que codifica para la P-glicoproteína, y la proteína MRP1. Todas ellas son proteínas de membrana, que funcionan a modo de bombas dependientes de energía (ATP) y evitan el acúmulo de fármacos quimioterápicos, expulsándolos antes que estos actúen.

La P-glicoproteína afecta a drogas lipofílicas, como los alcaloides de la vinca, antraciclinas y epipodofilotoxinas, que atraviesan pasivamente la membrana.³²

La P-glicoproteína se ha detectado en el osteosarcoma y en varios tumores de partes blandas, entre ellos el RMS, el sarcoma sinovial y el sarcoma de Ewing.

Múltiples estudios han relacionado la expresión de MDR1 con un pronóstico desfavorable. Hasta la fecha los estudios mas extensos de multirresistencia a drogas, corresponden a sarcomas de partes blandas no-RMS en adultos. En ellos la expresión de MRP se encontraba en los mismos tumores que expresaban MDR-1, manteniendo una correlación positiva entre ambos.³³

La proteína MRP-1, actuaría como una bomba de flujo de los elementos glutatio-conjugados, expulsando de forma conjugada drogas como la ciclofosfamida y el cisplatino, susceptibles de conjugación, adquiriendo por tanto resistencia al tratamiento.

En un estudio reciente, Gallego et al ³⁴, analizamos los patrones de expresión de MDR-1 y MRP, mediante RT-PCR en 23 RMS. La expresión de MDR-1 se encuentra en ambos tipos de rhabdomyosarcoma, alveolar y embrionario. En cambio MRP es más frecuente en el RMSa, sugiriendo que la expresión de MRP comportaría un peor pronóstico.

Los mecanismos que conducen a la sobre-expresión de estos dos genes incluyen la amplificación génica, aumento de estabilidad de la proteína y aumento de expresión sin amplificación. Además hay evidencias de que la pérdida de la función de p53, contribuye a un aumento de MRP. ³⁵

Hayashi et al, 1990, postula que la oncoproteína n-myc podría ejercer una función reguladora de los genes de multiresistencia a drogas. La amplificación del gen MYCN en el RMS se ha correlacionado con un aumento de la capacidad invasiva. En nuestro estudio descrito anteriormente, hallamos 3 tumores con amplificación de N-MYC y expresión de MDR-1 y MRP, corroborando dicha acción reguladora.

1.8- RECEPTOR DE ACETILCOLINA

El receptor nicotínico de la Acetil colina (RACH) del músculo esquelético, es un canal iónico pentamérico, compuesto por 4 subunidades. ³⁶ (Fig.5)

Durante el desarrollo de la unión neuromuscular se produce un cambio del receptor tipo fetal ($\alpha_2\beta\gamma\delta$) al tipo adulto ($\alpha_2\beta\epsilon\delta$), mediante el cambio de la subunidad γ por la ϵ . Así, después del nacimiento, el receptor fetal sólo se localiza en las células mixoides del timo, algunas fibras extraoculares, y se re-expresa en el músculo esquelético normal que ha sido denervado.

Teniendo en cuenta que el RMS consiste en un conjunto de mioblastos denervados y tumorales, Gattenlöhner, et al, en 1997, describieron por primera vez que la subunidad γ del receptor fetal de ACh, era un marcador específico del RMS, permitiendo distinguir entre músculo normal, RMS y otros tumores infantiles. Otros marcadores musculares ya descritos como la miogenina o el MYOD1, presentan expresión en otros tumores no RMS.

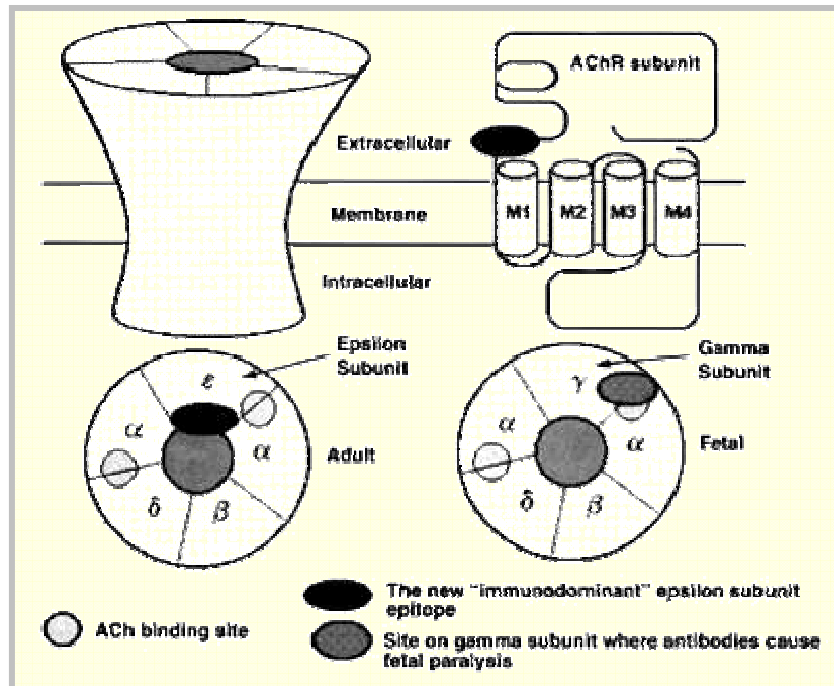


Fig 5. Esquema del receptor de Acetil colina.

2- EL SARCOMA DE EWING

El Sarcoma de Ewing es el segundo tumor maligno óseo de la infancia en frecuencia. Puede afectar a cualquier hueso, aunque es más frecuente en la extremidad inferior (45%), seguido de la pelvis (20%), extremidad superior, esqueleto axial y costillas. No está implicado en síndromes familiares.

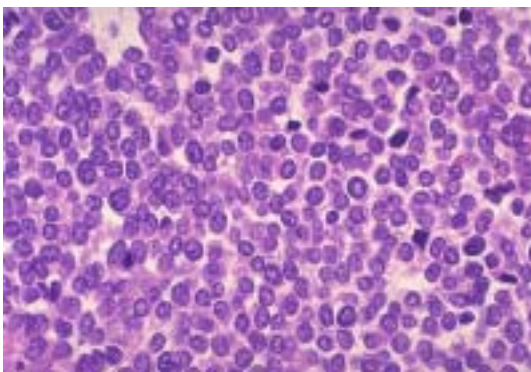


Fig 5. SE Hematoxilina-Eosina

El desarrollo de técnicas de citogenética, inmunohistoquímica y RT-PCR ha permitido conocer que estos tumores derivan de la célula primitiva pluripotencial de la cresta neural por su capacidad de expresar marcadores con diferenciación parasimpática. Sintetizan Acetilcolin-transferasa y expresan antígenos neuroectodérmicos (GD-2, N-CAM, HNK-1). Actualmente se considera una misma entidad biológica el Sarcoma de Ewing óseo, el Sarcoma de Ewing de partes blandas y el tumor neuroectodérmico primitivo periférico (pPNET), y se denominan familia de los

sarcoma de Ewing (EFT, Ewing family tumors) (Nagao K et al 1997, David M et al,1999).

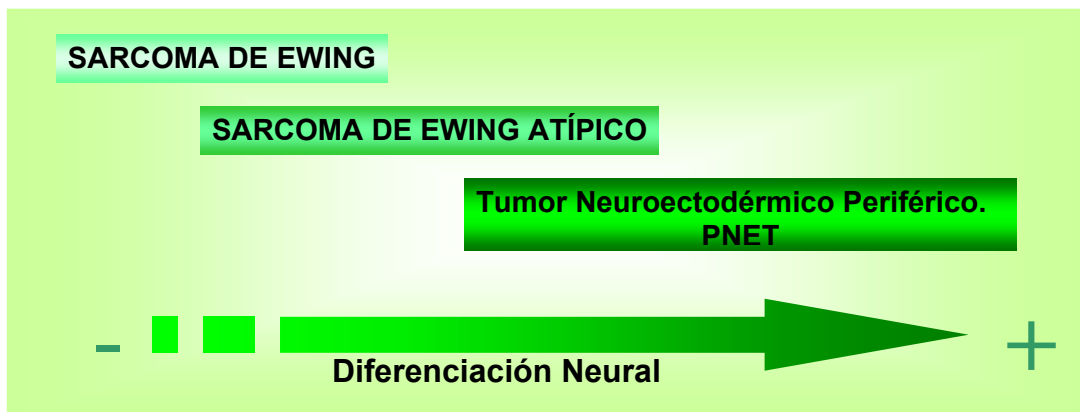


Fig 6. Esquema de la diferenciación neural de los distintos miembros de la familia de Sarcoma de Ewing.

2.1- ALTERACIONES GENÉTICAS

2.1.1- TRANSLOCACIONES GÉNICAS

Los estudios citogenéticos identifican translocaciones específicas en la familia del S. Ewing. La translocación $t(11;22)(q24;q12)$ es la más frecuente (88-95%). El estudio molecular de esta translocación, muestra que se produce un reordenamiento de la región EWSR1 del gen *EWS* en el cromosoma 22 y la región ETS2 del gen *Fli1* del cromosoma 11, produciéndose un producto de transcripción quimérico^{58,61}. (Fig 7) El gen *EWS* codifica para una proteína similar a la Polimerasa II, que interacciona con la doble cadena de DNA. El gen *Fli1* actúa como activador de la transcripción. La fusión quimérica resultante *EWS-Fli* altera la activación normal de la transcripción. Dentro de esta translocación se han descrito hasta diez formas alternativas, dependiendo de la zona de rotura. Así, la más frecuente (60%), llamada EWS-Fli1 tipo I, se establece entre los 7 primeros exones de EWS y los exones 6 al 9 de Fli1, seguido (25%) de EWS-Fli tipo II, que es similar pero incluye el exón 5 del gen Fli.

Se ha propuesto que algunas de las secuencias que flanquean el punto de fusión, tienen un papel importante en la translocación cromosómica de la neoplasia. Las secuencias consenso, encontradas en la zona colindante del punto de fusión, sirven como lugar de reconocimiento específico de las

proteínas de unión al DNA (“*binding proteins*”), en la maquinaria de recombinación o como lugar de unión de los dos fragmentos del gen, después de la separación de la doble cadena, facilitando así la unión “ilegítima”⁸².

Peter et al, 1995, describió que los tipos de fusión detectados periféricamente, eran idénticos al tumor primario, indicando que no existía *splicing* alternativo.⁴⁷

Sin embargo, diferentes autores^{54,67,81}, han descrito que puede haber diferentes transcritos, coexpresados en el sarcoma primario o en las células derivadas de éste, detectándose así mediante RT-PCR.

Zoubek et al, 1999 y de Alava et al 1998, sugieren que el tipo de fusión tiene importancia pronóstica, siendo el EWS-FlI tipo I el de mejor pronóstico. Este hecho se explicaría, porque la proteína quimérica es menos activa y posee un menor índice proliferativo.^{54,55}

La segunda translocación en frecuencia (10%) es la t(21;22)(q22;q12); en la cual el gen *EWS* del cromosoma 22 se fusiona con otro miembro de la superfamilia de los oncogenes ETS (*ERG*).^{59,60}

Se han descrito asimismo otras fusiones mucho menos frecuentes entre el gen *EWS* y diferentes genes de la familia ETS, como EWS-ETV1⁴⁵, el EWS-E1AF⁴⁶ y el EWS-FEV⁴⁷, resultando posiblemente un mismo fenotipo tumoral.

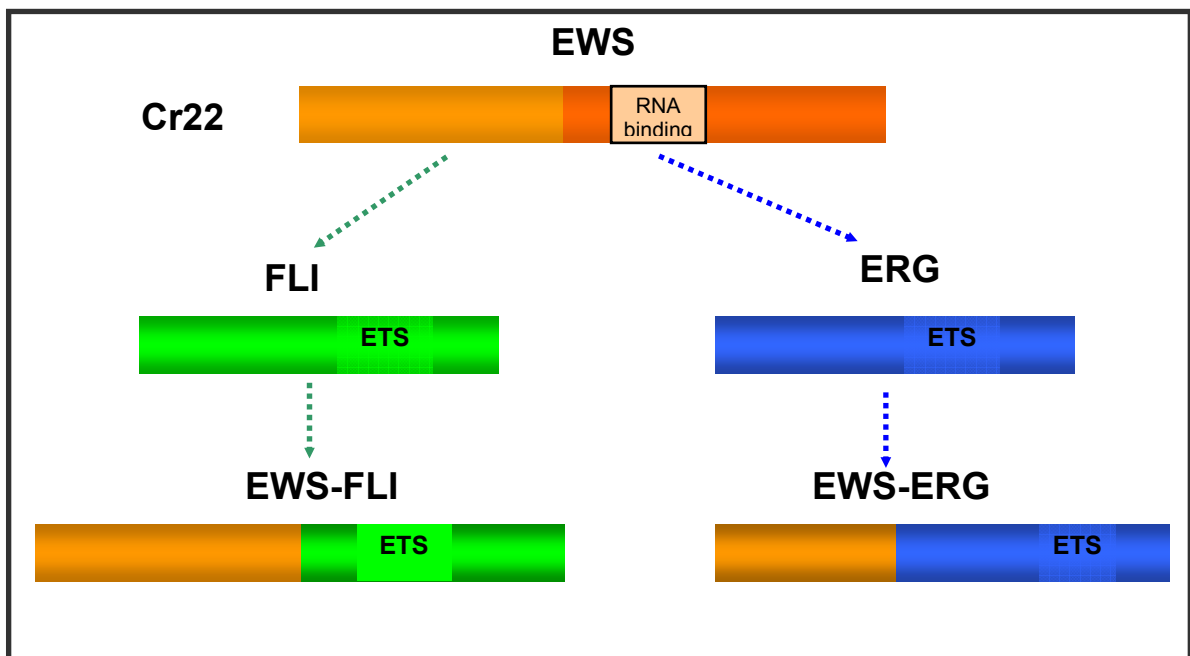


Fig 7. Esquema del gen de fusión EWS-FlI y EWS-ERG.

Se han descrito más de diez estructuras quiméricas distintas de transcritos de fusión, según donde se produzca el punto de rotura del gen situado en el cromosoma 22.^{59,67}

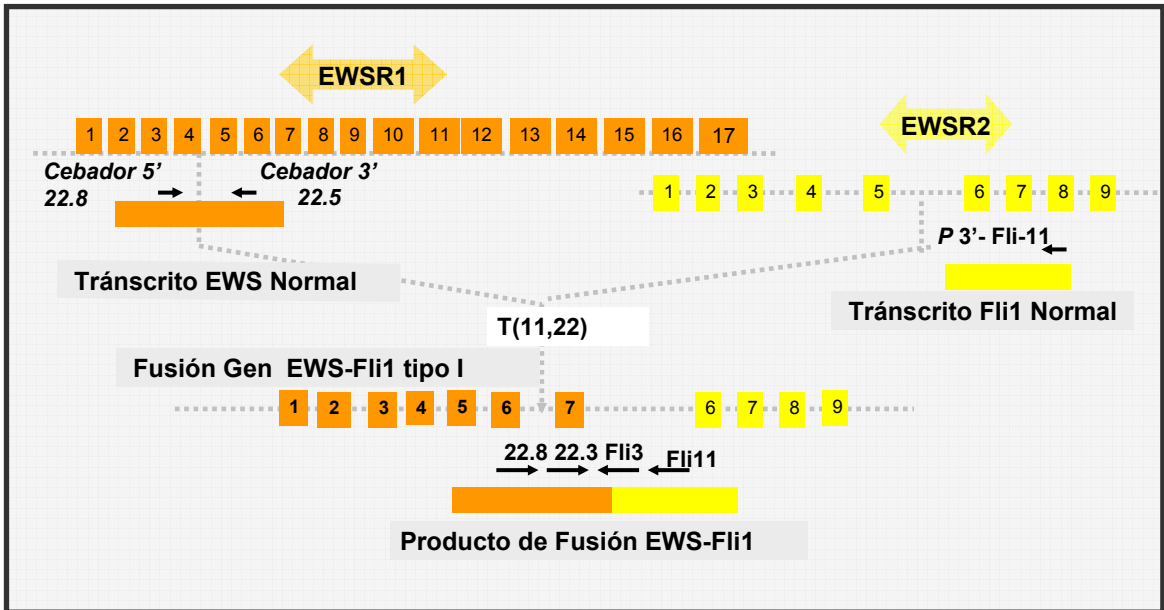


Fig 8. Esquema de la fusión de EWS-Fli1. Las zonas EWSR1 y EWSR2 que abarcan varios exones son susceptibles de rupturas diferentes generando así diferentes transcritos. En la figura se esquematiza el más frecuente (TIPO 1). May 1993, Zucman 1993.

A pesar de que las translocaciones EWS-ETS son altamente específicas, hay diversos trabajos que describen este tipo de fusión en Sarcomas bifenotípicos (diferenciación muscular y neural) ^{41, 42} y aunque en casos excepcionales, también se han encontrado en rhabdomiosarcomas y en neuroblastomas. ^{43, 44}

Anteriormente los sarcomas bifenotípicos eran considerados como RMS primitivos atendiendo a la morfología y la inmunohistoquímica, aunque posteriormente los estudios moleculares lo consideraron una forma de Ectomesenquimoma maligno. Su frecuencia se estima del 10% de los RMS considerados primitivos.

Los sarcomas bifenotípicos, expresan con mayor frecuencia el gen de fusión EWS-Fli1 y diversos marcadores de diferenciación miogénica (MYF5 y Miogenina). Curiosamente ninguno de estos tumores con la t(11;22) expresan, según Sorensen et al, MYOD1 (gen inductor de la diferenciación miogénica), postulando que podría estar inhibido por EWS-Fli. ⁴¹ Tan y Burchill, 2001, en cambio presentan un caso de sarcoma bifenotípico con la t(21;22) EWS-ERG, junto con marcadores miogénicos, incluyendo también el gen MYOD1. De Alava et al 1998, presentan el único caso de Sarcoma bifenotípico con expresión conjunta de EWS-Fli1 y PAX3-FKHR.

Amann et al, 1999, sugieren que EFT lo constituyen una gamma de tumores con diferentes grados de diferenciación neural. El mínimo común denominador

de todos ellos sería la translocación EWS-ETS y el marcador neuroglial Mic2/CD99. También se ha establecido una relación entre el tipo de fusión y la presencia de más marcadores neurogliales y así, los tumores sin fusión EWS-Fli1 tipo 1 expresan más marcadores neurales.

Los tumores de la familia Ewing, presentan una expresión neural limitada, con formación de rosetas ocasional, inmunorreactividad variable para la Enolasa neuroespecífica, la sinaptofisina y la S100 (todos ellos más específicos del Neuroblastoma).

En la literatura se ha descrito hasta hoy, sólo 3 casos de diferenciación neural inducidas por el tratamiento^{49,50,51}. Knezevich S, et al 1998, presentan un caso de diferenciación neural quimioinducida de un Sarcoma de Ewing, con pérdida del producto de fusión, sugiriendo que la expresión de EWS-Fli1 podría inhibir la diferenciación de las células tumorales.⁴⁹ Esta hipótesis fue discutida por Collini P et al , 2003, que presentan otro caso muy similar de diferenciación neural quimioinducida, pero en este caso, el producto de fusión se encuentra tanto en el tumor inicial como el post-tratamiento (con morfología similar al Neuroblastoma).⁵¹

El papel de EWS-Fli1 y otras oncoproteínas relacionadas, en la transformación maligna podría estar restringido al mantenimiento de las células en estado proliferativo, dentro del ciclo celular, inhibiendo así el paso a la diferenciación celular.⁴⁹

Recientemente Rorie C, et al 2004, han atribuido a EWS-Fli1 la capacidad de cambiar el programa de diferenciación de Neuroblastomas a Sarcoma de Ewing, proponiendo que la fusión EWS-Fli1 contribuye activamente a la etiología de EFT, alterando el programa de diferenciación neural a un estado menos diferenciado y más proliferativo.⁵⁰

2.1.2- OTRAS ALTERACIONES GÉNICAS

Aunque con menor frecuencia que las translocaciones específicas, se han descrito una serie de alteraciones cromosómicas adicionales: ganancias en los cromosomas 8 y 12, t(1;16) y deleciones del cromosoma 1. Este último se asocia con mal pronóstico en pacientes con enfermedad localizada.⁴⁸

La pérdida de p21 es la alteración más frecuente en el S Ewing, pero no se correlaciona con la clínica. Es un gen supresor activado por la proteína p53 no mutada, por lo tanto la pérdida de p21 sugeriría la inactivación de p53.

La mutación de p53 se encuentra en un 50% de las líneas celulares de S Ewing, aunque no se considera un evento primario y confiere un mal pronóstico. A diferencia del RMS, raramente se encuentra amplificación de MDM2, que es un gen inactivador de P53.

3- ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL.

Se define como la detección de enfermedad que no es posible apreciar por metodología convencional y que por tanto requiere de técnicas de biología molecular.

La diseminación metastásica a médula ósea es una de las más frecuentes y de mayor importancia pronóstica en neoplasias humanas. El examen inmunohistológico de las biopsias de médula ósea puede infravalorar la presencia de enfermedad microscópica por lo que en los últimos años se utilizan métodos más sensibles de detección como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la monitorización de la enfermedad micrometastásica en numerosas neoplasias, como neoplasias hematológicas, carcinoma de mama, colon, pulmón y neuroblastoma.

Además se ha podido demostrar que en sangre periférica son detectables células tumorales circulantes como lugar de paso antes de la diseminación a distancia.

Por regla general se considera que mediante PCR se logra un \log_{10} de aumento en la sensibilidad de la detección de células ocultas con respecto a los métodos inmunocitológicos. En un intento de aumentar la sensibilidad de detección se utiliza frecuentemente una segunda ronda de amplificación (PCR anidada). Este aumento de sensibilidad en muchas ocasiones demuestra la presencia de niveles mínimos de expresión en sangre periférica y médula ósea de donantes sanos (expresión ilegítima) lo que disminuye la especificidad de la detección. La emergencia de la tecnología de la PCR en tiempo real facilita la evaluación cuantitativa de la enfermedad residual y está siendo usada con éxito en algunas

neoplasias. Además, esta técnica aporta ventajas a la nested-PCR en cuanto a sensibilidad, linealidad y reproducibilidad (Wattjes M et al, 2000).

3.1-EMR Y RABDOMIOSARCOMA

Las peculiaridades del RMSa, permiten la utilización de métodos como RT-PCR para la detección de los productos de fusión PAX3-FKHR o PAX7-FKHR, no solo en las células tumorales del tumor primario, sino también en las que se encuentran circulando en sangre periférica (enfermedad microcirculante), y en médula ósea (enfermedad micrometastásica). Normalmente el diagnóstico de infiltración de la mo por células de RMS, se realiza mediante análisis morfológicos, de muestras obtenidos mediante aspirados o biopsias de mo. Este método no es útil para detectar niveles de infiltración menores de un 5%.⁷³ Varios autores han descrito el método de RT-PCR para la detección de la enfermedad residual mínima, pero aún no ha podido demostrarse la implicación pronóstica de la misma.⁷⁸⁻⁷⁹⁻⁸⁰

En los RMSe no se han descrito translocaciones características que permitan la detección de la enfermedad mínima residual. Se ha propuesto que la detección mediante RT-PCR, de la expresión de las proteínas MYOD1 y miogenina, pueden ser una herramienta útil, si bien algunos estudios muestran que puede haber cierto grado de expresión en tumores no-RMS^{38,74}. Además, los mismos trabajos muestran una baja sensibilidad en la detección de la ERM utilizando MYOD1. En cambio, Sartori y Rosolen, (2006)⁷⁵ en un trabajo muy reciente, defienden en cambio la utilización de ambos marcadores (MYOD1 y miogenina), para la detección de la enfermedad micrometastásica, mediante RT-PCR en tiempo real, obteniendo una alta sensibilidad y especificidad. Gattenloehner et al, 1999,³⁸ comunicaron un aumento de la expresión fetal del receptor de Acetil colina (RACH) en todos los tipos de RMS. Dado que el RMS está formado por mioblastos neoplásicos, no es sorprendente que la detección del receptor fetal de Ach (RACH) resulte ser un marcador tumor-específico. El mismo equipo analizó la expresión de las subunidades γ y α , calculando la ratio α/γ . En el RMS, músculo denervado la ratio fue siempre < 1 , mientras que en otros tumores no RMS era claramente > 1 . Este resultado permite utilizar este marcador, aparentemente específico de RMS para el seguimiento de la EMR.

Teniendo en cuenta que los RMSe no poseen ningún marcador claramente específico, a diferencia de los RMSa, el RACH, representa un marcador muy prometedor para el seguimiento de la enfermedad micrometastásica.³⁷

3.2- EMR Y SARCOMA DE EWING

A pesar de terapias multimodales muy agresivas, aproximadamente un tercio de los pacientes afectos de este tipo de tumor tendrán una recaída, incluso 5 años después del diagnóstico. Este hecho se produce, probablemente, porque no se consiguió erradicar todas las células en esos pacientes y que por lo tanto tienen un cierto grado de enfermedad oculta o niveles submicroscópicos de enfermedad residual, que no se puede detectar mediante técnicas convencionales.

Los dos factores con más valor predictivo pronóstico, son la respuesta a la quimioterapia y la presencia o ausencia de metástasis clínicamente detectables. Un 30% de los SE tienen metástasis al diagnóstico, siendo los lugares más frecuentes el pulmón, el hueso y la médula ósea.

Atendiendo a las características moleculares del SE, pueden detectarse mediante retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), las translocaciones específicas del gen EWS con los diferentes genes ETS. Es una manera rápida y sensible de realizar el diagnóstico. Si mediante este método analizamos la sangre periférica (SP) y la médula ósea (MO), además, es un excelente método para monitorizar la respuesta al tratamiento, detectar la enfermedad mínima residual (EMR) y diagnosticar precozmente recaídas. La sensibilidad de la técnica se establece en la detección de una célula tumoral por cada millón de células mononucleadas.

Mediante la técnica de RT-PCR se pueden detectar células tumorales con la translocación t(11,22) o la t(21,22) en la médula ósea y en sangre periférica, a través de la detección de los productos de fusión *EWS/Fli-1* o *EWS/ERG*. La sensibilidad de la técnica de detección de enfermedad residual es básica para establecer el estadio correcto así como para establecer el pronóstico de los pacientes (Montanaro L et al 1999).

Diversos estudios se han centrado sobre el valor pronóstico de la monitorización de la EMR. Fagnou et al, 1998, analizaron exclusivamente la MO

(n=42), estableciendo que la presencia del producto de fusión en la MO al diagnóstico, era un criterio de mal pronóstico después de 12 meses de seguimiento, no siéndolo la presencia del producto de fusión en SP.^{52,59}

Scheiermacher et al, 2003, llegaron a los mismos resultados, esta vez analizando conjuntamente la MO y la SP al diagnóstico.^{52,53} Ambos grupos sugerían de todos modos, la necesidad de realizar un seguimiento a más largo plazo, teniendo en cuenta las recaídas tardías. Siguiendo en esta línea, Avigad S, et al, 2004, realizaron un seguimiento mucho más largo (media de 60 meses) y no encontraron diferencias pronósticas significativas entre los MO/SP positivos o negativos del SE localizado. Detectaron transcritos en un 58% de los pacientes (n=26) y hallaron, en las muestras MO/SP, una alta correlación entre ellos y la supervivencia libre de progresión durante el seguimiento. En un 91% de los casos detectaron las recurrencias moleculares antes de las recurrencias clínicas.^{57, 70}

A pesar de la asociación entre la presencia de EMR y la recaída, no se ha establecido aún el tiempo crítico de aparición de la recaída, ni tampoco en que grado la presencia de EMR determina una recaída (hay pacientes que persisten con EMR y no recaen).

Para solventar estas dudas resulta de gran ayuda la utilización de PCR cuantitativa, porque permite cuantificar la cantidad de células tumorales circulantes, y establecer unos valores pronósticos predictivos.

El primer trabajo en este sentido lo realizaron Merino M, et al 2001, cuantificando la cantidad de células tumorales contaminantes en los productos de leucaféresis.⁶²

Se ha propuesto asimismo la utilización de PCR cuantitativa en tiempo real para la detección y estimación adecuada de la carga tumoral circulante en esta enfermedad (Margret et al 2001, Peter et al 2001).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

HIPÓTESIS DE TRABAJO

En la enfermedad metastásica, el tratamiento multimodal con quimio-radioterapia, cirugía y consolidación con quimioterapia a altas dosis con trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos permite cifras de supervivencia no superiores al 10% en los sarcomas de Ewing o los rhabdomyosarcomas. En consecuencia, se requieren métodos diagnósticos más refinados que identifiquen a los pacientes de mayor riesgo de recidiva, con el fin de individualizar al máximo cada tratamiento. Uno de estos métodos, que ha sido demostrado útil en neoplasias hematológicas, es el estudio de la enfermedad mínima residual.

Nuestra hipótesis establece que el análisis cuantitativo de la enfermedad mínima residual se correlaciona con la evolución de la enfermedad y puede ser un parámetro pronóstico adicional en estas neoplasias. Esto permitirá redefinir los criterios de remisión de la enfermedad e intensificar la terapia en los pacientes con enfermedad residual y mayor riesgo de recidiva.

OBJETIVOS

OBJECTIVOS

1- OBJETIVO PRIMARIO

Determinar y cuantificar la presencia de enfermedad residual mínima, en médula ósea (enfermedad micrometastásica) y en sangre periférica (enfermedad microcirculante) de los pacientes pediátricos afectados de sarcomas de partes blandas, mediante PCR en tiempo real y RT-PCR anidada.

2- OBJETIVOS SECUNDARIOS

2.1- Correlacionar la detección de enfermedad mínima con los parámetros pronósticos conocidos de cada neoplasia.

2.2- Determinar el impacto pronóstico de la detección de enfermedad residual mínima.

2.3- Estudiar la correlación entre los distintos marcadores, para el seguimiento de la enfermedad mínima residual.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1 - PACIENTES

Se realiza un estudio retrospectivo de una cohorte de pacientes, de edad inferior a 18 años afectados de Rabdomiosarcoma y Sarcoma de Ewing, en todos los estadios, diagnosticados y tratados en el Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona desde el año 1996 hasta el 2005.

Todos estos pacientes han sido tratados según los protocolos terapéuticos vigentes en la Unidad de Oncología pediátrica del Hospital Universitari Vall d'Hebron, y corresponden a su vez a protocolos de la SEOP (Sociedad Española de Oncología Pediátrica) y de la SIOP (Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica).

En el RMS, el protocolo terapéutico para el tumor localizado era el MMT95 y para el metastático el MMT98. A modo de resumen, los pacientes con RMS localizados se trataban con 9 ciclos de IVA (Ifosfamida, Vincristina, Actinomicina D) o con ciclos alternantes de IVA/CEV (Carboplatino, Epirrubicina, Vincristina) / IVE (Ifosfamida, Vincristina, Etopósido) y tratamiento local diferido (cirugía y/o radioterapia), dependiendo de la histología y la localización. Los pacientes con RMS metastásica (IRS IV) recibieron 3 ciclos iniciales de IVA/CEV/IVE seguido de altas dosis de Ciclofosfamida/ Carboplatino/ Etopósido con trasplante de progenitores hematopoyéticos y el tratamiento local de cirugía y/o radioterapia, más adecuado.

En el SE, el protocolo terapéutico utilizado fue el SIOP 2001. Los pacientes con tumores avanzados (estadios 3-4), recibían 6 ciclos de inducción (Vincristina, Ifosfamida, Doxorubicina y Etopósido), seguido de tratamiento local (cirugía, si era posible), una fase de consolidación con VAC (Vincristina, Actinomicina D, Ciclofosfamida) y trasplante de progenitores hematopoyéticos (TASPE) y finalmente radioterapia.

2 - MUESTRAS

Hemos seguido un esquema general para la recogida de las diferentes muestras.

	Diagnóstico	Cirugía	Cada 3 ciclos	TMO	Fin tratamiento	Seguimiento	Recaída
Tumor	↓	↓					↓
Médula ósea	↓	↓			↓		↓
Sangre perif	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Leucaféresis				↓			

2.1- Muestras tumorales

La primera muestra se obtiene en quirófano o bien en la sala de radiología (punción guiada por TAC). Las muestras son recogidas en fresco e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido (-80°C), hasta el análisis. Después de recibir tratamiento con un cierto número de ciclos de quimioterapia, se realiza siempre que sea posible, una exéresis quirúrgica del tumor. El Servicio de Anatomía Patológica recoge una segunda muestra que es analizada microscópicamente se reserva una pieza adecuada que se conserva a -80°C. Siempre que un paciente requiera cirugía posterior, se procede de igual modo.

2.2 - Muestras de Sangre Periférica

Las muestras de sangre periférica se obtienen en el momento del diagnóstico, durante el tratamiento y al finalizarlo, en periodos lo mas regulares posibles, dentro de los controles analíticos a que son sometidos los pacientes durante el seguimiento de la enfermedad.

Las muestras se recogen en tubos con EDTA potásico de 3ml. Inmediatamente se desechan los hematíes realizando una lisis de hematíes y se conserva a -80°C hasta la extracción completa de los ácidos nucleicos.

La solución de lisis de hematíes está compuesta por: CINH_4 0.14 M, NaHCO_3 1 mM. Se mezcla 1 volumen de SP/MO en tres volúmenes de lisis, incubándolo 15 minutos, finalmente se centrifuga 10 minutos a 1200rpm y se recoge el sobrenadante, que se conserva a -80°C hasta la extracción completa de RNA. De igual modo, las muestras de sangre periférica control se obtienen de pacientes pediátricos no oncológicos que se realizan analíticas preoperatorias.

2.3 - Muestras de médula ósea

Las muestras de médula ósea se recogen en el momento del diagnóstico y siempre que desde el punto de vista clínico lo exija. Este procedimiento se realiza bien bajo sedación en planta o bien en quirófano bajo anestesia general si coincide con el momento de la extracción tumoral o la colocación / retirada de un catéter venoso central.

Como muestras control se obtienen de igual forma en pacientes con otras patologías.

Se realizan dos punciones en dos sitios distintos, generalmente en ambas crestas ilíacas postero-superiores o antero-superiores.

De igual forma se realiza una lisis de hematíes y se procede a la congelación a -80°C hasta la extracción de ácidos nucleicos.

3- APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se ha obtenido la autorización del Comité de Ética de la *Fundación per a la Recerca y Docencia* de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, y a nivel individual se recoge un consentimiento individual de los padres y / o tutores.

4 - EXTRACCIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

4.1 – Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se realiza basándose en una variante de la técnica descrita por Chomczynski y Sacchi en 1987⁶³ y adaptado al sistema de columnas comercializado por Quiagen (RNeasy mini/midi kit, N° Cat. 74104).

Las muestras tumorales son congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente de su extracción en el mismo quirófano.

Se procede a la homogeneización de la pieza, empleando el Polytron, sumergiendo el tejido congelado en un tubo Falcon con TRIZOL™ (Invitrogen, N° Cat. 15596-018) en una proporción de 1 ml por cada 100 mg de tejido. Seguidamente se centrifuga el lisado a >2000 g durante 2 minutos.

En el caso de médula ósea y sangre periférica, se una vez realizada la lisis de hematíes (apartado 2.2), se añade el TRIZOL™. Se recoge el sobrenadante y se añade cloroformo, vorteadando y dejándolo incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente se centrifuga a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se recoge el sobrenadante añadiendo 1 volumen de etanol 70% gota a gota para que no precipite. Se aplica la solución en una columna y se centrifuga 30 seg. a 120000 rpm para que el RNA se fije a la membrana. Se repite el proceso. A continuación se realizan los lavados primero con buffer RW1 y posteriormente con buffer RPE. Finalmente se recoge el RNA añadiendo a la columna agua RNase-free e incubándolo 1 min a temperatura ambiente. Se congela a – 80°C. La concentración de RNA se mide por espectrofotometría o mas recientemente mediante el Bioanalyzer (Agilent Technologies 2100) Total-RNA-Nano, que permite además, analizar la calidad del RNA. (Fig.9)

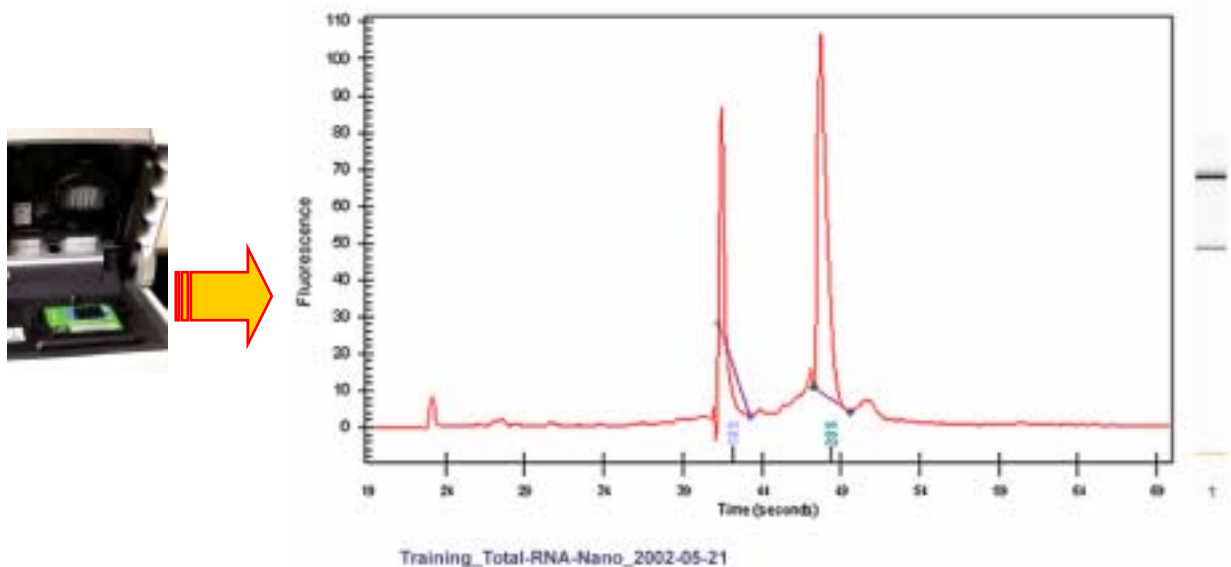


Fig 9. Ejemplo de cuantificación RNA mediante Bioanalyzer

4.2 – Extracción de RNA mensajero

La extracción de RNA mensajero (mRNA) se realiza según el protocolo Quick-Prep micro mRNA purification kit comercializado por Amersham Pharmacia Biotech.

Este kit está diseñado para la extracción de pequeñas cantidades de mRNA de células eucariotas o de tejido sin tener que pasar por el paso intermedio de la obtención de RNA total.

Se realiza una homogeneización del tejido y se aísla el mRNA mediante diversas etapas que incluyen primero la fijación a una membrana de oligo-dT celulosa, se lava varias veces y finalmente se eluye en agua RNase-free, y se cuantifica mediante espectrofotometría.

4.3 – Extracción de DNA

La extracción de DNA de los tejidos tumorales y de la sangre total, se realiza según la técnica de fenol-cloroformo-isoamílico y el kit Quiagen DNA extraction.

5 – CULTIVOS CELULARES

Se han cultivado las siguientes líneas celulares procedentes de los diferentes tipos de tumores:

- Rbdomiosarcoma alveolar y fusión PAX3-FKHR: RH30 (ATCC Catalog No: CRL-2061).
- Rbdomiosarcoma alveolar y fusión PAX7-FKHR: CW 9019 (ATCC Catalog No CW9019).
- Rbdomiosarcoma embrionario: HTB-82 (ATCC Cat No: HTB-82).
- Sarcoma de Ewing y fusión EWS-Fli: HTB-166 (ATCC Cat No HTB 166).
- Sarcoma de Ewing y fusión EWS-ERG: HTB-466 (ATCC Cat No HTB 466).

Se descongelan desde una temperatura de conservación de – 120°C. Los medios utilizados son específicos para cada tipo celular:

- RH30: RPMI 1640 + 2mM L-glutamina (*dutch modification*).
- CW 9019: RPMI 1640 + 2mM L-glutamina (*dutch modification*).
- HTB-82: McCoy's
- HTB-166: RPMI 1640 + 2mM L-glutamina sin fenol rojo +15% suero fetal bovino + 10mM HEPES.
- HTB-466: RPMI 1640 + 2mM L-glutamina (*dutch modification*).

Todos los medios se enriquecen además con 10% suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 0.1 mg de estreptomicina, 0.1mM de aminoácidos no esenciales y 100mM de Piruvato Sódico.

El Suero fetal bovino es inactivado previamente a 65°C durante 30 minutos.

El medio es renovado cada 48 horas aproximadamente y en caso necesario se subcultiva tripsinizando las células y finalmente se congelan de nuevo progresivamente hasta -120°C añadiendo como conservante un 5% de DMSO.

6 – ENSAYO DE EXPRESIÓN DE GENES DE FUSIÓN MEDIANTE RT-PCR.

Se cuantifica 1 µgr de RNA extraído según el método descrito en el apartado 4.1 y se introduce a un tubo de 0.5 ml para sintetizar DNA complementario (cDNA).

Se realiza la Transcripción Reversa utilizando SuperScript® II RNAase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen, Cat.Nº 18064-014). Ésta contiene el enzima de transcriptasa reversa altamente purificada, (Moloney Murine Leucemia Virus), el buffer 5x (250mM Tris-HCl pH 8.3, 375mM KCl y 15 mM MgCl₂) y 0.1 M DTT. Además se añade a la reacción, el inhibidor de la ribonucleasa recombinante (RNAsin, Invitrogen, Cat.Nº 10777-019), dNTPs 10 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y oligo dT o Random hexamers.

Al microgramo de RNA se le añade el cebador oligo dT (1µ) junto con los dNTPs y agua destilada hasta un volumen de 12.5 µL. Se deja incubar de la mezcla 5 minutos a 65°C y se centrifuga brevemente. Seguidamente se añade el buffer 5x, el DTT y el RNAsin, dejándolo incubar esta vez a 25°C 10 minutos y a 42°C 50 minutos. Finalmente se inactiva la reacción calentando el producto 15 minutos a 70°C.

El cDNA obtenido puede ser almacenado a -20°C hasta el momento del ensayo o bien continuar inmediatamente con la PCR.

Tres µL de cDNA se diluyen en un volumen final de 25 µL de una mezcla compuesta por 2.5µL de Buffer 10X (100mM Tris-HCl, pH 8.3, KCl 500mM), 2mM Cl₂Mg, 200µM de cada dNTPs, 5 pmol de cada *cebador* o cebador, 1 Unidad del enzima Ampli Taq-Gold polimerasa (5U/µL, Applied Biosystems, Nº Cat.4322806).

Se introduce en el termociclador Perkin-Elmer/MJ realizando una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°. Las siguientes condiciones de la reacción difieren según los cebadores específicos utilizados de cada tipo de fusión.

6.1- RABDOMIOSARCOMA ALVEOLAR

Se han diseñado diferentes cebadores para los distintos tipos de fusiones:

- **Cebadores Consenso (Pax 3/7-FKHR):** discriminan RMS alveolares de otros tumores no RMSa, pero no distinguen los dos tipos de fusiones.

Secuencia Pax3/7: 5'-CCGACAGCAGCTCTGCCTAC-3'

Secuencia FKHR: 5'-AACTGTGATCCAGGGCTGTC-3'

Tamaño del amplicón de la fusión Pax3-FKHR: 376 pb y de la fusión Pax7/FKHR: 367 pb.

Condiciones PCR: 5 minutos a 94°, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C 30 segundos, *annealing* durante 30 segundos a 62°C y extensión durante 30 segundos a 72°C, finalizando la reacción con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

- **Cebadores fusión Pax 7-FKHR (Exones 1-7 de pax3 + Exones 2-3 de FKHR):**

Secuencia Pax7: 5'-TTTGAGAGGACCCACTACCC-3' (Exón 6).

Secuencia FKHR: 5'-AACTGTGATCCAGGGCTGTC-3'.(Exón 2).

Tamaño del amplicón: 695 pb.

Las condiciones de la PCR son las mismas que los cebadores consenso.

- **Cebadores fusión Pax 3-FKHR:**

Secuencia Pax3: 5'-GCACTGTACACCAAAGCACG-3' (Exón 7).

Secuencia FKHR: 5'-AACTGTGATCCAGGGCTGTC-3' (Exón 2).

Tamaño del amplicón: 409 pb.

Condiciones PCR: 5 minutos a 94°, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C 30 segundos, *annealing* durante 30 segundos a 60°C y extensión durante 30 segundos a 72°C, finalizando la reacción con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

En cada experimento se introducen muestras control RT negativas (RNA sin retrotranscripción), para descartar la contaminación por otros amplicones. Además en cada reacción se utiliza como control el mismo FKHR_{upper} junto con FKHR_{lower}. El tamaño de este amplicón es de 320 pb.

Además se introduce como control positivo la línea celular específica y como negativo muestras sin cDNA. Así, para que un resultado sea positivo es necesario que los controles PAX3/7-FKHR y FKHR resulten claramente positivos indicando que la reacción de PCR ha funcionado bien, que las muestras RTneg, sean negativas y que los controles negativos (sin cDNA) lo sean, descartando así la contaminación.

Los productos de PCR se resuelven mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se visualizan mediante tinción con Bromuro de Etidio.

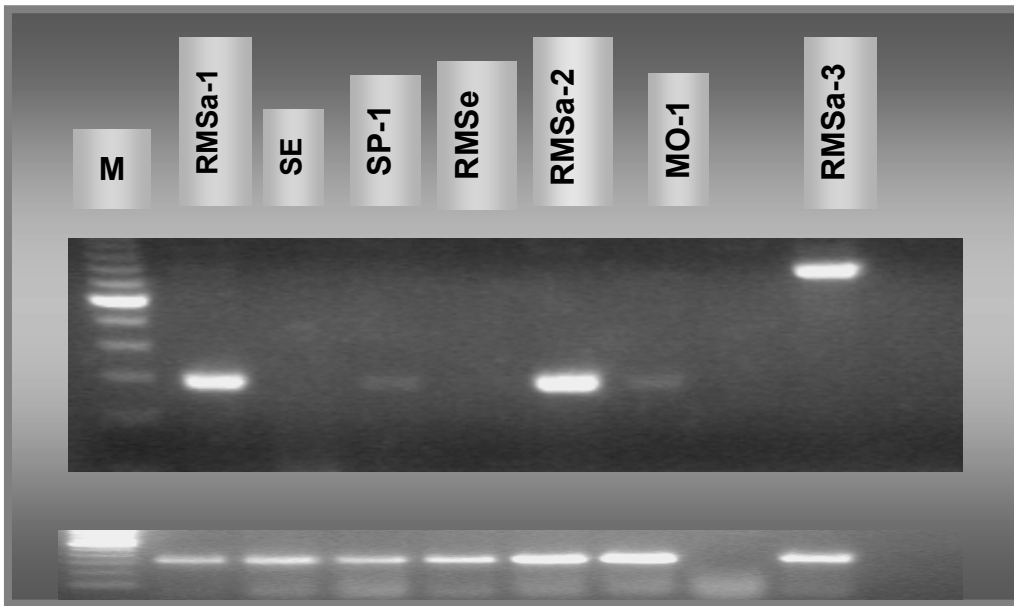


Fig. 10. Imagen de un gel de agarosa con diferentes muestras. Muestras positivas para Pax 3-FKHR en tumor, SP y MO. Muestras negativas RMSe y Sarcoma de Ewing La última muestra de tumor expresa el producto de fusión PAX7-FKHR.

PCR anidada

En las muestras de sangre periférica y médula ósea se ha utilizado una PCR anidada con el fin de aumentar la sensibilidad de la reacción. Para ello se utilizan unos *cebadores* internos a los descritos anteriormente y se parte de 3 μ L del producto de la primera reacción de PCR. (Fig 11). Se repite el procedimiento de PCR descrito para el primer paso o primer *round*.

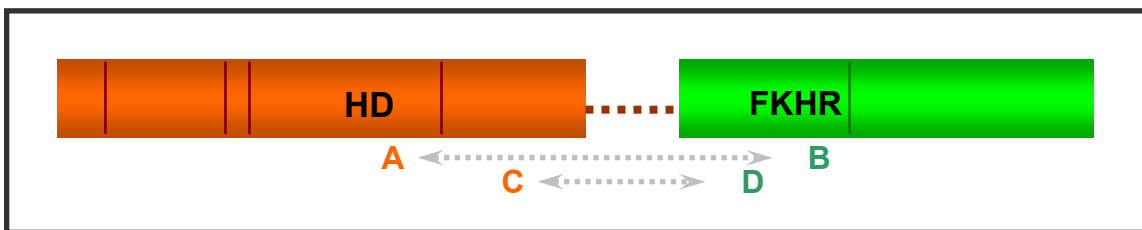


Fig.11. Esquema de la localización de los cebadores en la fusión PAX3/7-FKHR

- **Cebadores Pax 7n-FKHRn:**

Secuencia Pax7n: 5'-TTTGAGAGGACCCACTACCC-3'

Secuencia FKHRn:5'- AACTGTGATCCAGGGCTGTC-3'

Tamaño del amplicón 338 pb.

Condiciones PCR: 5 minutos a 94°, 40 ciclos de desnaturalización a

94°C 30 segundos, *annealing* durante 30 segundos a 60°C y extensión

durante 45 segundos a 72°C, finalizando la reacción con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

- **Cebadores Pax 3n-FKHRn:**

Secuencia Pax3n: 5'-GCTCTGCCTACTGCCTCCCC -3'

Secuencia FKHRn:5'- GATTTCCCGCTCTTGCCACC-3'

Tamaño del amplicón: 238 pb.

Condiciones PCR: 5 minutos a 94°, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C 30 segundos, *annealing* durante 30 segundos a 57.5°C y extensión durante 45 segundos a 72°C, finalizando la reacción con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

6.2- SARCOMA DE EWING/PNET

Después de la extracción de RNA, realizamos una retrotranscripción según el método descrito anteriormente en el apartado 6.1.

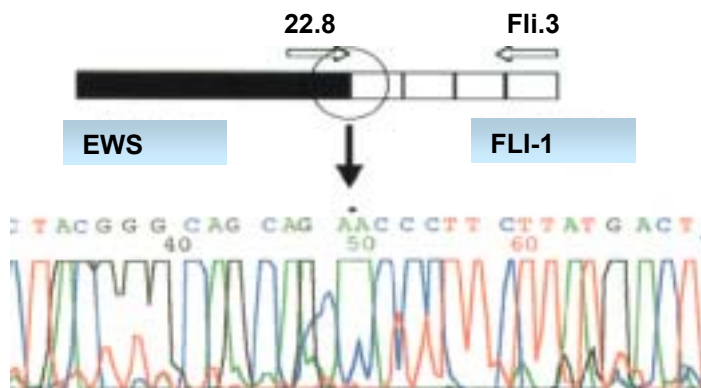


Fig.12. Esquema de la secuencia del punto de fusión, junto con los cebadores utilizados en la PCR.

Tres μL de cDNA se diluyen en un volumen final de 25 μL de una mezcla compuesta por 2.5 μL de Buffer 10X (100mM Tris-HCl, pH 8.3, KCl 500mM), 2mM Cl_2Mg , 200 μM de cada dNTPs, 5 pmol de cada *cebador* o cebador, 1 Unidad del enzima Amplitaq-Gold (5U/ μL , Applied Biosystems, N° Cat.4322806).

Los *cebadores* utilizados son:

- **Cebadores Fusión EWS-FLI-1:**

Secuencia Fli-11: 5'-AGGGTTGGCTAGGCGACTGCT-3' (Exón 8)

Secuencia 22.8: 5'-CCCACTAGTTACCCACCCCAA-3' (Exón 7)

Tamaño del amplicón: en este caso variará según el tipo de *splicing* del sarcoma de Ewing en cuestión, (ver Fig. 13). El tipo 1 tendrá un tamaño de 258 pb, Tipo2: 324 pb, tipo 3: 411 pb, tipo4: 752 pb, tipo 5: 383 pb, tipo 6: 509 pb, tipo 7: 575 pb y tipo 8:131 pb.

Condiciones PCR: 5 minutos a 94°, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C 30 segundos, *annealing* durante 1 min. a 57°C y extensión durante 1 min. a 72°C, finalizando la reacción con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

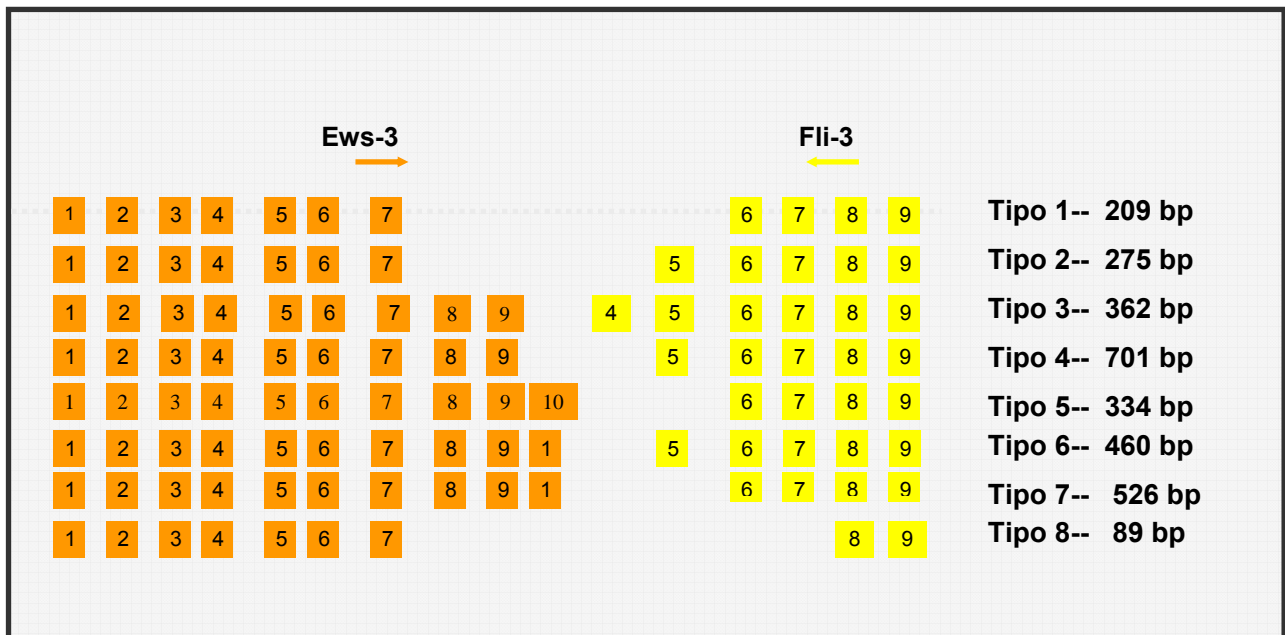


Fig 13. Fusión EWS-Fli-1. Esquema de los diferentes tamaños de amplicones como resultado de la PCR con los cebadores 22.3 (exón 7 de EWS) y Fli-3 (exón 8 de Fli-1).

- **Cebadores Fusión EWS-ERG:**

Secuencia Erg.11: 5'-TGTTGGGTTTGCTCTTCCGCTC-3' (Exón 9)

Secuencia 22.8: 5'-CCCAGTAGTTACCCACCCCAA-3' (Exón7)

Tamaño del amplicón será variable según el tipo de *splicing*. Se han descrito 4: Tipo 1: 245 pb, tipo 2: 293 pb, tipo 3: 418 pb, tipo 4: 675 pb.

Condiciones PCR: 5 minutos a 94°, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C 30 segundos, *annealing* durante 1 min. a 58°C y extensión durante 1 min. a 72°C, finalizando la reacción con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Como gen control de ambas PCRs se utiliza el mismo EWS_{upper} junto con EWS_{lower}. El tamaño de este amplicón es de 450 pb.

PCR anidada

Al igual que con la detección de la EMR en RMAa, realizamos una nueva PCR utilizando tres µL del producto de la primera reacción. Así se consigue aumentar la sensibilidad de la reacción, imprescindible para la detección células circulantes en sangre periférica o médula ósea.

El volumen y la composición de la mezcla es el mismo que el utilizado en el primer paso, a excepción claro está de los *cebadores*:

- **Cebadores Fusión EWS-Fli-1:**

Secuencia Fli-3: 5'-GTCGGGCCCAGGATCTGATAC-3' (Exón 8)

Secuencia 22.3: 5'-TCCTACAGCCAAGTCCCAAGTC-3' (Exón 7)

Tamaño del amplicón, está esquematizado en la figura previa.

Condiciones PCR: 5 minutos a 94°, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C 30 segundos, *annealing* durante 1 min. a 57°C y extensión durante 1 min. a 72°C, finalizando la reacción con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

- **Cebadores Fusión EWS-ERG:**

Secuencia Erg 3: 5'-ACTCCCCGTTGGTGCCTTCC-3'. (Exón 9)

Secuencia 22.3: 5'-TCCTACAGCCAAGTCCCAAGTC-3' (Exón 7)

Tamaño del amplicón será variable según el tipo de *splicing*. Se han descrito 4: Tipo 1: 154 pb, tipo 2: 203 pb, tipo 3: 329 pb, tipo 4: 408 pb.

Condiciones PCR: 5 minutos a 94°, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C 30 segundos, *annealing* durante 1 min. a 58°C y extensión durante 1 min. a 72°C, finalizando la reacción con una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Los productos de PCR se resuelven mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se visualizan mediante tinción con Bromuro de Etidio. (Fig 14)

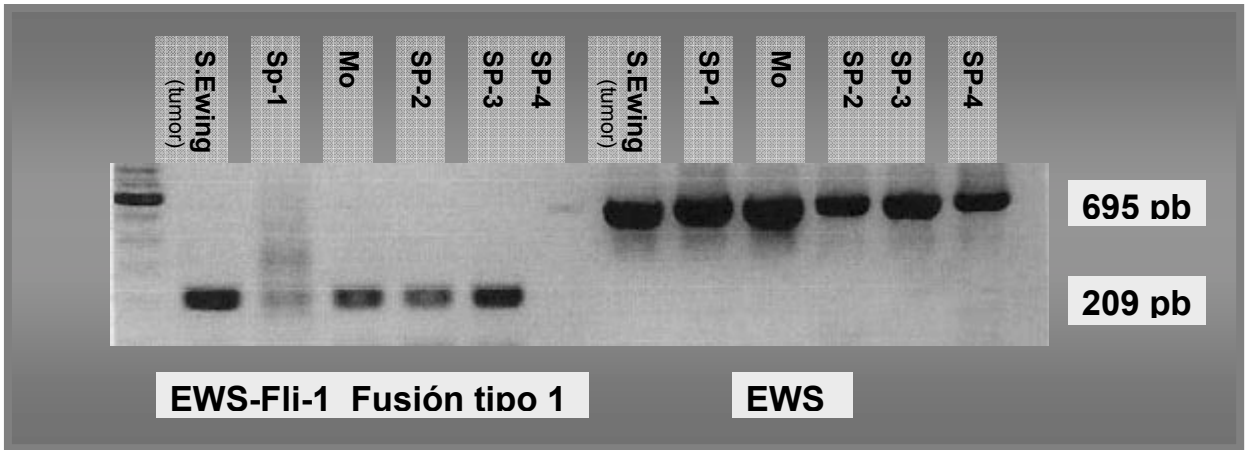


Fig 14. Gel de agarosa con un ejemplo de seguimiento de paciente afecto de SE metastásico. Fusión EWS-Fli.1 (Tipo 1), mediante PCR anidada.

7 – ENSAYO DE SEMICUANTIFICACIÓN MEDIANTE DENSITOMETRÍA COMPARATIVA. MULTIPLEX PCR DEL RECEPTOR DE ACETIL COLINA PARA LA EMR EN EL RMS_e.

Después de realizar una extracción de RNA y una RT, mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente, utilizamos dos μL de de cDNA que se diluyen en 25 μL de la mezcla de Buffer 10X (100mM Tris-HCl, pH 8.3, KCl 500mM), 2mM Cl_2Mg , 200 μM de cada dNTP, 2,5 pmol de cada un de los 4 cebadores (α_3 , α_5 , γ_3 , γ_5) y 2 Unidades del enzima Amplitaq-Gold polimerasa (5U/ μL , Applied Biosystems, N° Cat.4322806).

Los Cebadores utilizados son:

- **Receptor ACh- α_3 :** 5'- AAGCTACTGTGAGATCATCGTCAC-3'.
- **Receptor ACh- α_5 :** 5'- TGACGAAGTGGTAGGTGATGTCCA-3'

Tamaño del amplicón 244 pb.

- **Receptor ACh- γ_3 :** 5' - CCTCAGTCACCTACTTCCCCT-3'.
- **Receptor ACh- γ_5 :** 5' - TACTTGCTGATGAGTGGCACC-3'

Tamaño del amplicón 469 pb.

Como control endógeno se ha utilizado el gen ribosomal **L19**:

- **L19_{upper}:** 5'-CAATGCCAACTCCCGTCAGC-3'
- **L19_{lower}:** 5'-CTTGGTCTCTTCCTCCTTGG-3'

Condiciones de la PCR: 5 minutos a 94°, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C 15 segundos, *annealing* durante 30 seg. a 62.5°C y extensión durante 30 seg. a 72°C, finalizando la reacción con una extensión final de 5 minutos a 72°C.

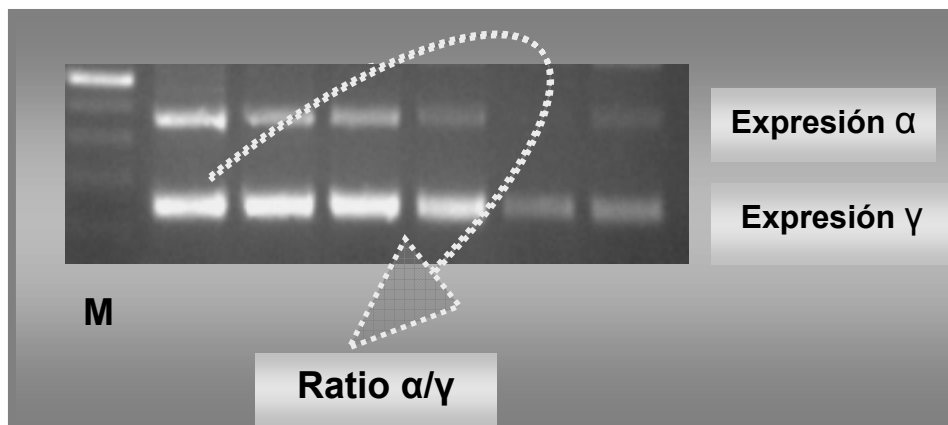


Fig. 15. Ejemplo de un gel de agarosa de un ensayo de semicuantificación de una multiplex PCR mediante densitometría comparativa.

Los productos de PCR se resuelven mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, se visualizan mediante tinción con Bromuro de Etidio y se cuantifican mediante un transiluminador que permite realizar una densitometría comparativa (Fig 15). Se consideran 2 volúmenes para cada muestra analizada, una para la expresión α y otra para el γ . Además, para descartar posibles diferencias de densidad en diferentes zonas del gel, se analizan 2 volúmenes más para establecer la zona neutra de α y γ .

Una vez captadas las imágenes de las muestras, los resultados de cada volumen se expresan en porcentajes. A cada valor se le resta el valor de su “blanco” respectivo ($B\alpha$ y $B\gamma$). Finalmente se realiza el cociente α/γ .

Si esta Ratio es > 1 se considera positivo para RMS.

En cada reacción se han añadido controles “positivos” (línea celular RMS RH30 y/o músculo fetal), y controles “negativos” (músculo adulto).

8 – PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL.

Un μg RNA se diluye en un volumen final de $100\mu\text{L}$ de una mezcla que incluye Buffer RT (10x), ClMg_2 (25mM), dNTP 10 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Random hexamers (5nM), RNAsin ($20\text{U}/\mu\text{L}$) y el enzima MultiScribe enzyme ($50\text{U}/\mu\text{L}$) (Taqman® reagents-Applied Biosystems). Se utiliza el programa de RT-Universal: 10min a 25°C de incubación, 30 min. a 48°C e inactivación 5 min. a 95°C . El siguiente paso es coger $2\mu\text{L}$ de cDNA para la reacción de PCR *real time*.

La cuantificación de los genes de fusión (EWS-Fli-1, EWS-ERG, PAX-3/FKHR, PAX7/FKHR) y de MYOD1 y RACH se realiza mediante el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7000 (Applied Biosystems).

La técnica de “real time” PCR cuantifica de manera más específica, sensible y reproducible que las otras PCR que detectan el producto sólo al final de la reacción⁶⁸. Se basa en la detección y cuantificación de una sonda marcada con fluorescencia. La sonda es específica para cada secuencia y la señal que genera aumenta de manera directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR generado. Es posible registrar el valor en cada ciclo de la reacción y de esta manera se puede detectar el momento en que se produce un

aumento significativo de producto de PCR que se correlaciona a su vez, con un aumento de fluorescencia. Así, estas reacciones se caracterizan por el momento del ciclo en se detecta una cantidad de producto de PCR (o fluorescencia de la sonda). El inicio de la amplificación se detecta de manera precoz a través de la señal fluorescente. Mediante esta tecnología se define el número de ciclo umbral, (*threshold cycle number*, Ct), que significa el número de ciclo en que la señal sobrepasa un umbral preseleccionado (Fig 16).

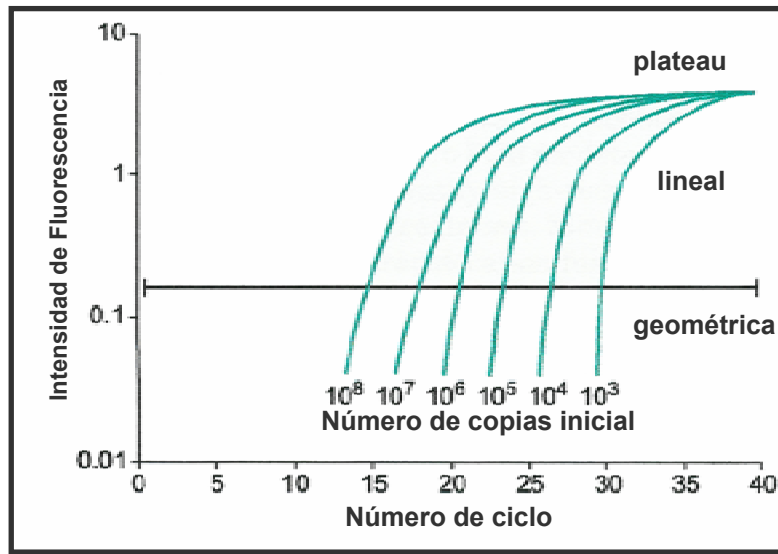


Fig. 16. Gráfica de resultados de PCR real time

Hemos utilizado el sistema TaqMan®, que utiliza una sonda unida a dos marcadores fluorescentes, uno en el extremo 5' (*reporter dye*) y otro en el extremo 3' (*quencher dye*). Cuando la Taq polimerasa replica una secuencia donde se encuentra la sonda, su actividad 5' exonucleasa rompe dicha sonda emitiendo fluorescencia (Fig. 17).

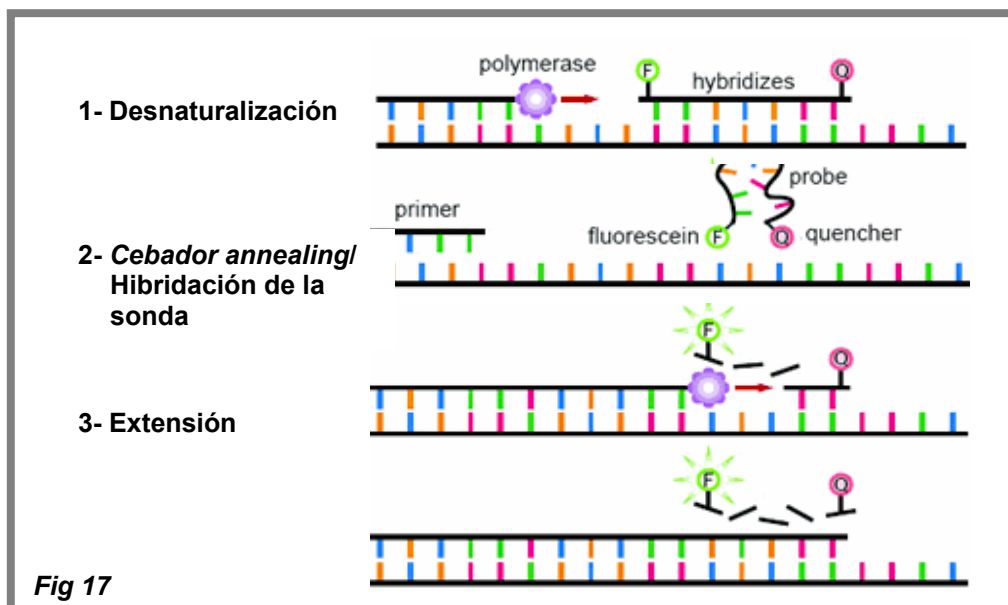


Fig 17

El gen endógeno, utilizado para todas las PCR en tiempo real, fue el TBP. Se seleccionó después de testar una batería de cuatro genes entre ellos el gen humano GAPDH, el de β -actina y el gen ribosomal 18S. El TBP mostró la expresión más constante y reproducible de los cuatro.

- *Cebador* TBP F: 5'-GAACATCATGGATCAGAACAACAG-3'
- *Cebador* TBP R: 5'- ATTGGTGAATAGGCTGTG-3'
- Sonda TBP: CTGCCACCTTACGCTCAGGGCTTGG

Esta sonda está marcada con TAMRA como *quencher* y con VIC como *reporter*. (Applied Biosystems, N° Cat Hs00172424).

8.1- PCR EN TIEMPO REAL EN RABDOMIOSARCOMA ALVEOLAR.

Los *cebadores* y la sonda para la detección de los productos de fusión Pax3-FKHR y Pax7-FKHR, fueron diseñados (Assay “by design” ABI) específicamente para que la sonda se situara justo en el punto de fusión y los cebadores siempre entre dos exones, con el fin de evitar la contaminación de los resultados por DNA genómico.

Fusión PAX 3-FKHR (Assay by desing 1397147A 04/ FKHR 215):

- *Cebador* Pax3-FKHR F: TGAACCCCACCATTGGCAAT
- *Cebador* Pax3-FKHR R: CTGTGTAGGGACAGATTATGACGAA
- *Sonda* FAM: TCTCACCTCAGAATTC

```

1141 AGCTATACAG ACAGCTTTGT GCCTCCGTCG GGGCCCTCCA ACCCCA TGAACCCCACCATT
                                     Cebador F
1201 GGCAATGGCC TCTCACCTCA||GAATTCAA TTCGTCATAATC TGTCCCTACA CAGCAAGTTC
                                     SONDA                                     Cebador R

```

Fusión PAX 7-FKHR (Assay by desing 1397147A 04/ FKHR 202):

- *Cebador* Pax7-FKHR F: ACATGAACCCGGTCAGCAA
- *Cebador* Pax7-FKHR R: CTGTGTAGGGACAGATTATGACGAA
- *Sonda* FAM: CTGTCTCCTCAGAATTC

```

1681 ACTCTGACAG CTTCATGAAT CCGGCGGCGC CCTCCAACCA CATGAACCCGGTCAGCAACG
                                     Cebador F
1741 GCCTGTCTCC||TCAGGAATTC AA TTCGTCAT AATCTGTCCC TACACAGCAA GTTC
                                     SONDA                                     Cebador R

```

Se añaden 2 μL de cDNA, a un tubo óptico de 2 μL MicroAmp (ABI). A continuación se realiza una mezcla con un volumen total de 20 μL , que incluye Master Mix Taqman® Universal (2X) compuesta por 5mM de MgCl_2 , 200 μM de dATP, dCTP, dUTP, dTTP, 0.05U/ μL de AmpliTaq® Gold DNA polimerasa y 0.01 U/ μL de AmpErase® UNG (Amp Erase uracil-glycosylase). Este último se añade a la reacción para evitar una reamplificación de los productos sobrantes de la PCR y actúa eliminando cualquier Uracil incorporado en los amplicones. Es inactiva a temperaturas superiores a los 55°C. También se le añade a la mezcla el marcador de referencia ROX, que funciona como marcaje normalizador, compensando así las posibles diferencias de fluorescencia entre pocillos y también los errores de pipeteo. Se añaden los cebadores 900nM de cada uno y 250 nM de la sonda PAX3/7-FKHR (FAM).

Todos los tubos quedan cubiertos por un tapón óptico MicroAmp. En cada placa se realiza un diseño similar (96 pocillos):

- Análisis del Gen problema Pax3/FKHR:
 - Cuatro muestras control (todas ellas por triplicado), que son el resultado de cantidades logarítmicas decrecientes de células tumorales diluidas en 1ml de sangre control ($7,5 \times 10^9$ células), son los llamados *spiking experiments*.
 - Muestras problema por triplicado para valorar la variabilidad entre los diferentes experimentos.
 - Muestras de sangre periférica (negativas para el gen problema).
- Análisis del Gen endógeno TBP
 - Se repite de nuevo la misma distribución de las muestras.

Se ha utilizado el ABI Prism 7000 Sequence Detector, con las siguientes condiciones de amplificación: 2 minutos a 50°C para activar UNG, 10 min. 95°C para la activación de la Taq Gold Polimerasa, 50 ciclos de 15 seg. a 95°C y 1 min. de extensión a 60°C.

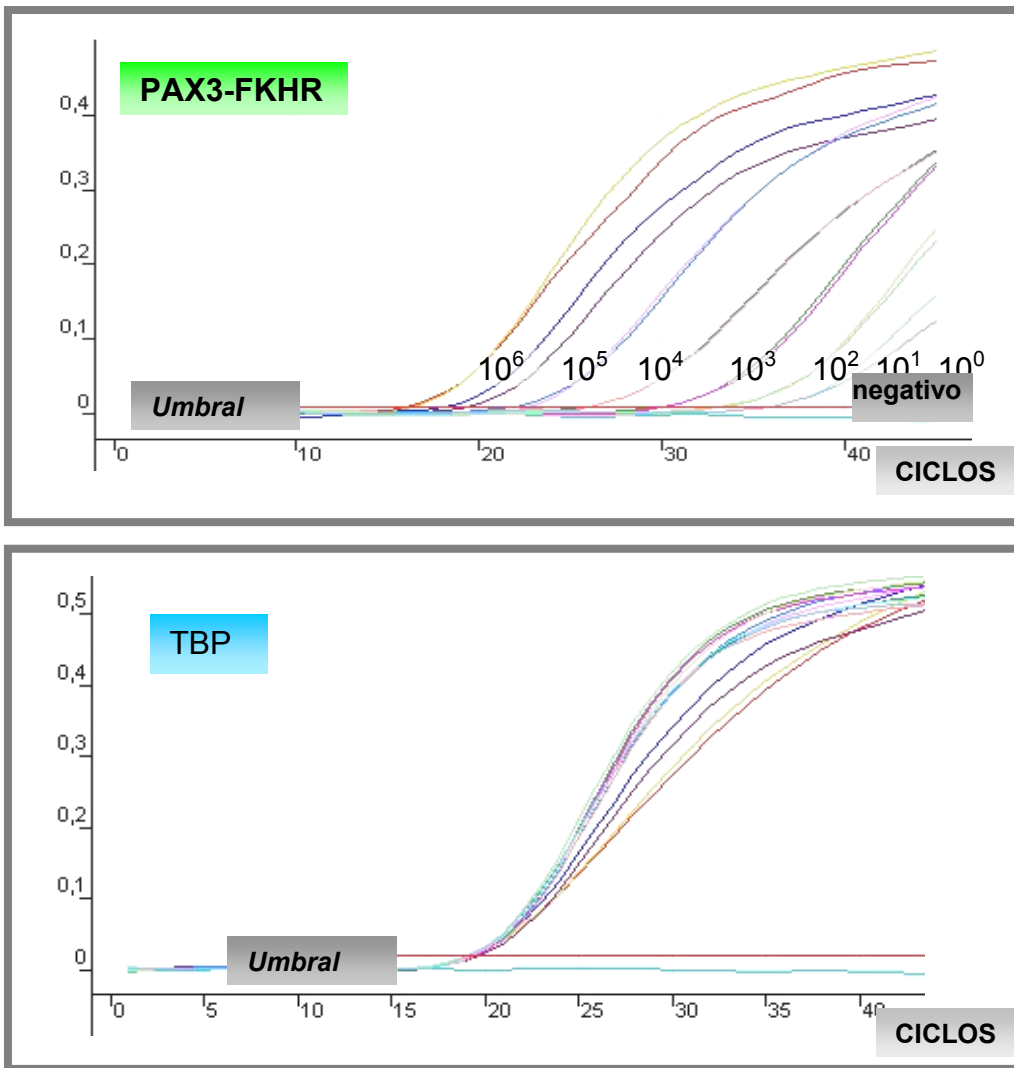


Fig 18. Esquema de PCR real time de Pax3-FKHR y TBP utilizando las muestras "Spikings".

Cuantificación relativa de la expresión de los genes problema

Para calcular los resultados de expresión de cada muestra testada se utiliza el valor **Ct** (la media del triplicado) correspondientes a la curva estándar, al gen problema (en éste caso Pax3-FKHR) y al gen constitucional (TBP). Se exportan todos estos valores a una hoja Excel.

Inicialmente hemos realizado una PCR real time con las muestras llamadas *spikings*, para crear una curva estándar. Cada una de estas muestras, representa una cantidad decreciente de células tumorales en 1 ml de sangre normal (7.5×10^9 cel./L), que van desde la más concentrada (S-7) que contiene 1 millón cel.tumorales/ 10 millones cel. normales, hasta la mas diluida que hay una célula tumoral/10 millones de cel. normales. (S-1).

El siguiente paso es calcular el valor nCt (Ct normalizado) para cada uno de los puntos de la curva estándar y de las muestras problema.

El siguiente paso es calcular el ΔCt , (Ct normalizado), para cada uno de los puntos de la curva estándar y las muestras problema. Es decir la diferencia entre los Ct_{Pax3} y Ct_{TBP} , de una misma muestra. Este valor corresponde al nivel de expresión de una muestra si se resta el valor Ct obtenido con el gen endógeno. La Fórmula es la siguiente:

$$\Delta Ct = Ct \text{ media PAX3-FKHR muestra X} - Ct \text{ media TBP muestra X}$$

Placa	Gen Problema FAM	Type	Ct PAX3	Endógeno VIC	Ct end	ΔCt
Pax3-7	PAX3	Calibr	24,18	TBP	27,21	-317
Pax3-7	PAX3	Calibr	24,08	TBP	27,3	
Pax3-7	PAX3	Calibr	24,14	TBP	27,4	
Pax3-6	PAX3	TEST	24,25	TBP	27,03	-301
Pax3-6	PAX3	TEST	24,21	TBP	27,01	
Pax3-6	PAX3	TEST	23,84	TBP	27,3	
Pax3-5	PAX3	TEST	25,39	TBP	27,6	-206
Pax3-5	PAX3	TEST	25,18	TBP	27,4	
Pax3-5	PAX3	TEST	25,27	TBP	27,03	
Pax3-4	PAX3	TEST	28,21	TBP	27,01	1.11
Pax3-4	PAX3	TEST	28,64	TBP	27,3	
Pax3-4	PAX3	TEST	28,21	TBP	27,4	
Pax3-3	PAX3	TEST	31,53	TBP	27,4	4.38
Pax3-3	PAX3	TEST	31,51	TBP	27,03	
Pax3-3	PAX3	TEST	31,55	TBP	27,01	
Pax3-2	PAX3	TEST	34,11	TBP	27,1	7.24
Pax3-2	PAX3	TEST	34,43	TBP	27,3	
Pax3-2	PAX3	TEST	34,68	TBP	27,1	
PB	PAX3	TEST	49,44	TBP	27,4	25.7
PB	PAX3	TEST	UNDET	TBP	27,38	
PB	PAX3	TEST	UNDET	TBP	27,37	

Fig. 19. Hoja Excel mostrando los resultados de las muestras Spiking

Utilizando el ΔCt de cada una de las muestras *spikings*, se construye la curva estándar y se calcula su pendiente. Esto sirve para interpolar los valores de las muestras problema a dicha curva y calcular así la carga tumoral estimada para la muestra en cuestión. Para dicho cálculo se utiliza el \log_{10} de cada una de las concentraciones tumorales de las muestras *spiking* mediante la herramienta "Tendencia", que nos devolverá el \log_{10} del número de equivalentes de células tumorales (en este caso RH30) presentes en la muestra problema. Finalmente calculamos el número de cel. tumorales mediante la herramienta "Potencia". En

cada placa se introducen además muestras negativas (pool de sangre periférica de niños sanos).

8.2- PCR EN TIEMPO REAL EN SARCOMA DE EWING.

El procedimiento de extracción RNA total y Retrotranscripción para obtener cDNA, es idéntico al descrito en el apartado anterior. La diferencia se encuentra en los *cebadores* y la sonda. Esta vez se han diseñado a través de *Primer 3 output*. Debido a que la secuencia del punto de fusión varía según el tipo de fusión (hasta 8 diferentes para EWS-FLI1 y 4 para EWS-ERG), la sonda se localiza en EWS y no a caballo de los dos genes como sucedía en el RMSa.

Fusión EWS-FLI1

- *Cebador* EWS-FLI-1 F: 5'-ACAGCCAAGCTCCAAGTCAATATA-3' (Exón7 de EWS).
- *Cebador* EWS-FLI-1 R: 5'-CATGTTATTGCCCAAGCTC-3'(Exón 6 de Fli)
- Sonda EWS: FAM- 5'- CAGAGCAGCAGCTAC-3' (Exón 7 de EWS).

La sonda está marcada con MGB como *Quencher* y con FAM como *Reporter*.

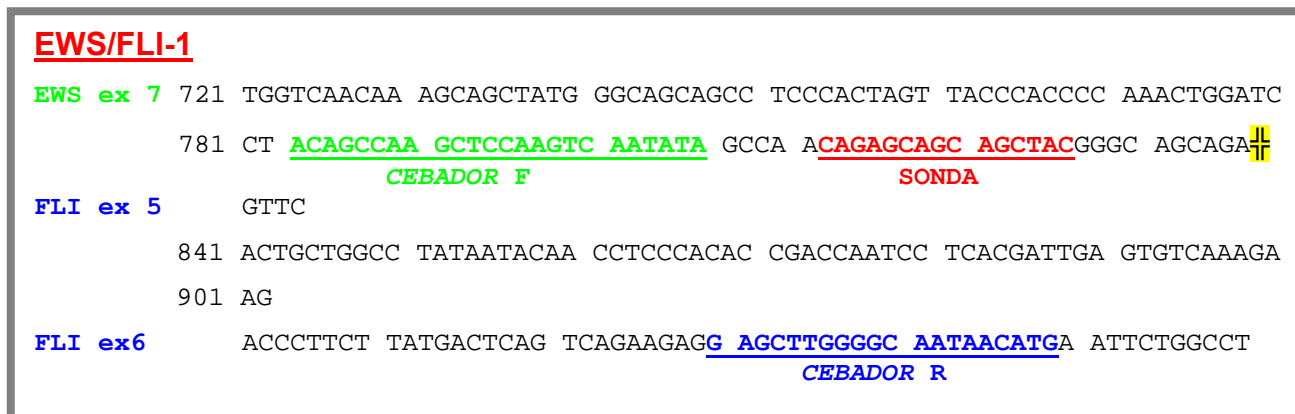


Fig. 19. secuencia del producto de fusión EWS-Fli1, con los cebadores utilizados.

Fusión EWS-ERG

- *Cebador* EWS-ERG F: 5'-ACAGCCAAGCTCCAAGTCAATATA-3'(Exón 7 de EWS)
- *Cebador* EWS-ERG R: 5'-TCTGGCCACTGCCTGGAT-3' (Exón 7 de ERG)
- Sonda EWS: FAM- 5'- CAGAGCAGCAGCTAC-3' (Exón 7 de EWS).

EWS/ERG

EWS ex 7 721 TGGTCAACAA AGCAGCTATG GGCAGCAGCC TCCCACTAGT TACCCACCCC AAACCTGGATC
781 CT ACAGCCAA GCTCCAAGTC AATATA GCCA ACAGAGCAGC AGCTACGGGC AGCAGA $\|$
CEBADOR F **SONDA**

ERG ex 6 ATTT
841 ACCATATGAG CCCCCAGGA GATCAGCCTG GACCGGTAC GGCCACCCCA CGCCCCAGTC

ERG ex 7 901 GAAAGCTGCT CAACCATCTC CTTCCACAGT GCCCAA~~AACT~~ GAAGACCAGC GTCCTCAGTT
CEBADOR R

Fig.20. Secuencia del producto EWS-ERG, con los cebadores utilizados.

Las características de la reacción y condiciones de amplificación son las mismas que las descritas para Pax3-FKHR (apartado 8.1), así como la elaboración y cálculo de los resultados.

Placa	Gen Probl	Type	Ews-Fli FAM	Endog FAM	Ct end	DCt
Ews-Fli-7	Ews-Fli	Calibradora	29,5	TBP	26,3	3,56
Ews-Fli-7	Ews-Fli	Calibradora	30,2	TBP	26,28	
Ews-Fli-6	Ews-Fli	Test	31,55	TBP	26,2	5,125
Ews-Fli-6	Ews-Fli	Test	31,79	TBP	26,89	
Ews-Fli-5	Ews-Fli	Test	34	TBP	27	7
Ews-Fli-5	Ews-Fli	Test	34	TBP	27	
Ews-Fli-4	Ews-Fli	Test	37,35	TBP	27	10,355
Ews-Fli-4	Ews-Fli	Test	37,56	TBP	27,2	
Ews-Fli-3	Ews-Fli	Test	39,8	TBP	27,45	12,47
Ews-Fli-3	Ews-Fli	Test	39,8	TBP	27,21	
Ews-Fli-2	Ews-Fli	Test	UND	TBP	25,9	28,5
Ews-Fli-2	Ews-Fli	Test	UND	TBP	25,5	
Sp	Ews-Fli	Test	UND	TBP	27,3	27,7
Sp	Ews-Fli	Test	UND	TBP	27,3	
Sp	Ews-Fli	Test	UND	TBP	27,3	

Fig. 21. Hoja Excel mostrando los resultados de las muestras Spiking

8.3- PCR EN TIEMPO REAL EN RABDOMIOSARCOMA EMBRIONARIO.

Análisis del receptor de Acetil colina y MYOD1.

El procedimiento de extracción RNA total y Retrotranscripción para obtener cDNA, es idéntico al descrito en el apartado 8.1.

Para la detección y cuantificación de MYOD1 y las subunidades γ y α del receptor de acetilcolina hemos utilizado de nuevo el sistema ABI Prism 7000 (ABI) y tecnología Taqman. (ver apartado 8.1)

RECEPTOR DE ACETIL COLINA

Los cebadores y la sonda utilizados son los siguientes:

Subunidad γ (RACH gamma): Hs 00183228-m1 (assay "on demand")

Subunidad α (RACH alfa): Hs 00175578-m1(assay "on demand").

Como gen endógeno de control se ha utilizado el TBP (Hs 00172424) (assay "on demand").

Se ha diseñado el ensayo para que en cada placa se testaran las muestras (por triplicado) para RACH gamma, RACH alfa y TBP.

MYOD1

Los cebadores y la sonda utilizados son:

MYOD1: Hs00183228-m1.

Como gen endógeno de control se ha utilizado TBP.

Las siguientes condiciones de amplificación: 2 minutos a 50°C para activar UNG, 10 min. 95°C para la activación de la Taq Gold Polimerasa, 50 ciclos de 15 seg. a 95°C y 1 min. de extensión a 60°C

Para el análisis de los resultados se sigue el mismo procedimiento que el descrito en 2.7.1. Las muestras utilizadas para el diseño de la curva estándar es la línea celular RH30.

9- ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD

Todos los ensayos realizados han sido testados para analizar su sensibilidad.

En todos ellos se han utilizado la mezcla a concentraciones decrecientes de células tumorales (específicas para cada tipo de tumor) y 1 ml de sangre con 7.5×10^9 cel. Mononucleadas por litro.

En los ensayos de PCR anidada se establece el límite de detección cuando no aparece la banda correspondiente al gen correspondiente.

En el ensayo de semicuantificación del Receptor de Acetil Colina γ y α mediante densitometría comparativa y multiplex PCR se ha utilizado de nuevo las muestras *spiking* de la línea celular RH30. En este ensayo no ha sido útil realizar una segunda amplificación del amplicón (*anidada*) porque con ello se

perdía toda la especificidad. A diferencia de los genes de fusión, los genes γ y α del RACH son constitucionales, es decir existe presencia de ellos, aunque a veces pequeña, en todos los tejidos. La especificidad de este ensayo se establece con la comparación mediante densitometría de las dos subunidades α y γ , relación que no se mantiene al realizar una PCR anidada.

En los ensayos de cuantificación de PCR en tiempo real se valora la expresión del gen problema respecto al gen endógeno y se calcula el ΔCt . Este valor significa el nivel de expresión de una muestra una vez normalizado por el valor Ct de su gen endógeno. El límite de detección se establece en aquella muestra *spiking* que no presenta señal fluorescente. Es decir que su valor es equivalente al obtenido en la muestra control de sangre periférica de donante sano en la que nunca hay presencia de genes de fusión.

En el ensayo de cuantificación de MYOD1 y RACH α y γ se utiliza de nuevo las muestras *spiking* de RH30. El límite de detección se establece en aquella muestra en que su valor ΔCt es equivalente al de la muestra control (pool de sangre periférica de donantes sanos).

10– ANÁLISIS DE ESPECIFICIDAD

Los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos de PCR son analizados para confirmar su especificidad.

Las bandas de los geles de agarosa obtenidas de los ensayos de PCR, con el tamaño esperado, son secuenciadas para la confirmación de los resultados.

Dicha banda, se recorta, se eluye y se purifica mediante el sistema *Concert Gel Purification System Life Technologies*. Seguidamente se realiza la secuenciación mediante el secuenciador ABI PRISM 310 Analyzer.

Además, para confirmar aún más la especificidad de los ensayos, se utilizaron muestras de tumores distintos al SE y RMS, como el tumor de wilms y el neuroblastoma. En el caso de la detección de los productos de fusión (PAX3/FKHR, EWS-Fli1 y EWS-ERG) y MYOD1, se obtuvieron resultados negativos en todos los tumores control. En cambio en el caso de la expresión de ACh, algunos tumores no RMS expresaban RACH γ y RACH α , con una ratio $\alpha/\gamma > 1$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1 - SENSIBILIDAD DE LOS ENSAYOS

La sensibilidad de los ensayos de PCR para la detección de los transcritos Pax3-FKHR y Pax 7-FKHR se estableció con las muestras *spiking* de las líneas celulares RH30 y CW9019 respectivamente.

El límite de detección del ensayo se sitúa en la muestra **S2** para Pax3-FKHR (es decir, se detectan 10 células tumorales por cada 10^7 células normales). Fig 22.

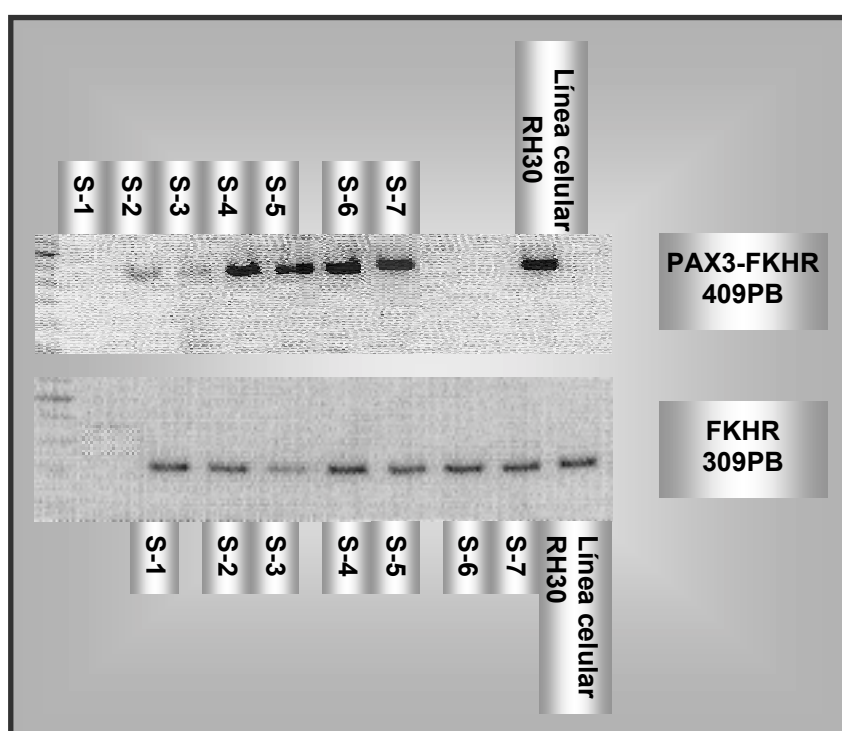


Fig. 22. Gel de Agarosa con las muestras *spiking* RH30 después de la PCR para el estudio de PAX3-FKHR (un solo round). Límite de detección en S2 (10 cel/ 10^7 cel).

El límite de detección del ensayo Pax7-FKHR fue sensiblemente inferior, situándose en la muestra **S4** (1000 cel/ 10^7 cel). Siendo necesario realizar una PCR anidada para detectar 10 células en 10^7 cel.

Algo similar ocurre con la sensibilidad de los ensayos de S.Ewing en la que el límite de detección en la PCR se establece en la muestra **S4** (1000 cel/ 10^7 cel), siendo posible aumentarla realizando una segunda reacción PCR anidada de aquellas muestras *spiking* negativas.

En el caso de la cuantificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real de **Pax3-FKHR** el límite de detección se establece en la muestra **S2**, que corresponde a la mezcla de 10 células en 10^7 células normales. (Fig.23).

	ΔCt	Cel/ 10^6	Log cel
Pax3-7	-3,17	1000000	6
Pax3-6	-3,01	100000	5
Pax3-5	-2,06	10000	4
Pax3-4	1,11	1000	3
Pax3-3	4,38	100	2
Pax3-2	7,24	10	1
Pax3-1	23	1	0
SP	25,76		0.095

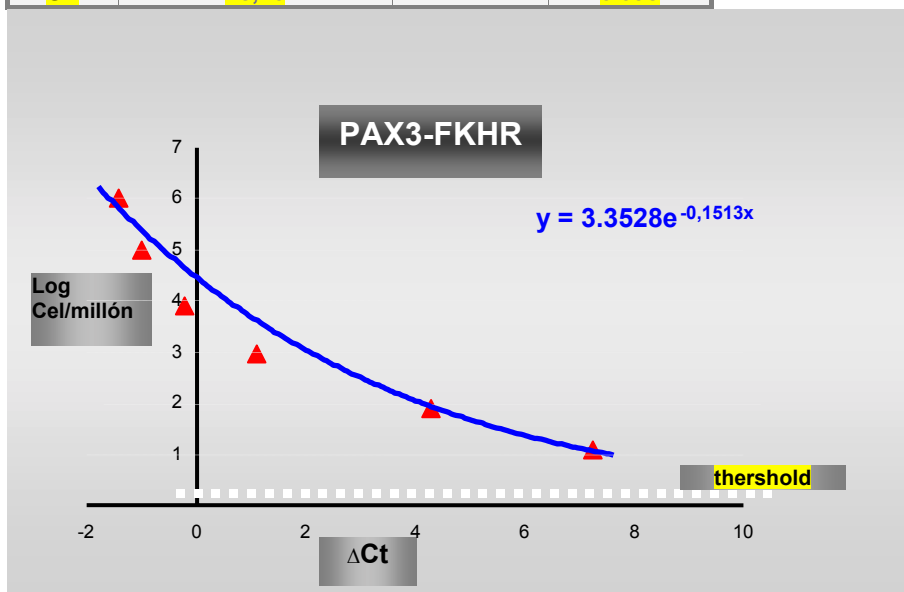


Fig. 23. Gráfica de las muestras spiking Pax-3-FKHR.

En el caso de cuantificación mediante PCR cuantitativa de **Pax7-FKHR**, el límite de detección se encuentra entre **S1** y **S2** (1 y 10 células por cada 10^7 células normales). (Fig 24).

	ΔCt	Cel/ 10^6	Log cel
Pax7-7	-0.76	1000000	6
Pax7-6	-0.34	100000	5
Pax7-5	1.2	10000	4
Pax7-4	7.2	1000	3
Pax7-3	10.4	100	2
Pax7-2	12.3	10	1
Pax7-1	15	1	0
SP	25,76		0.095

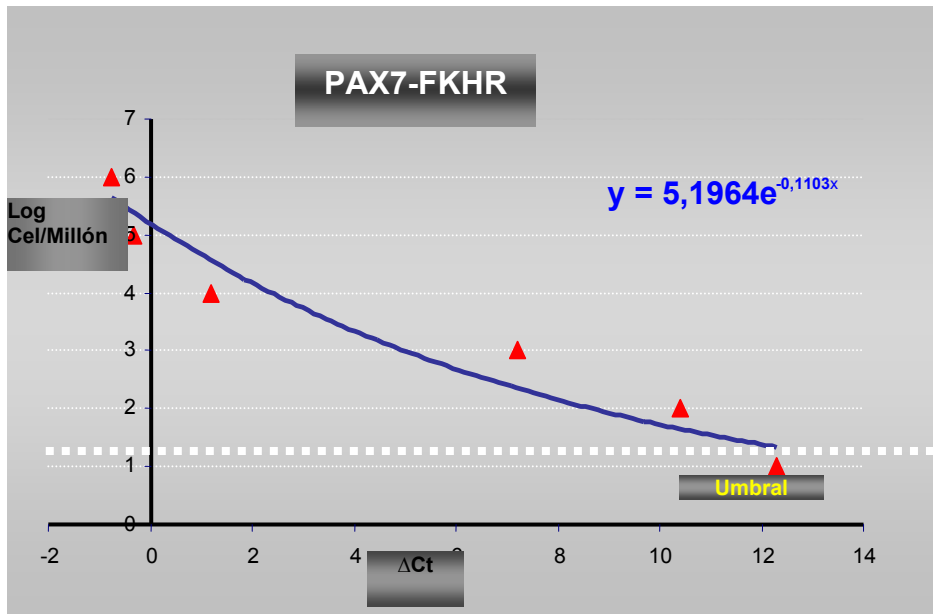


Fig. 24. Gráfica de las muestras spiking para Pax7-FKHR

En el caso de la cuantificación de MYOD1 mediante PCR en tiempo real, la mínima cantidad de células detectable se encuentra más allá de la muestra **S1**, es decir, es capaz de detectar señal en la mezcla de 1 célula por cada 10^7 células normales, aunque este punto está muy próximo al resultado obtenido en la muestra de SP y por tanto en este punto se pierde especificidad.

	ΔCt	Cel/ 10^6	Log cel
MYOD1-1-7	-7.04	1000000	6
MYOD1-1-6	-6.9	100000	5
MYOD1-1-5	-5.69	10000	4
MYOD1-1-4	-1.9	1000	3
MYOD1-1-3	2.09	100	2
MYOD1-1-2	4.6	10	1
MYOD1-1-1	8.1	1	0
SP	10.29		0.56

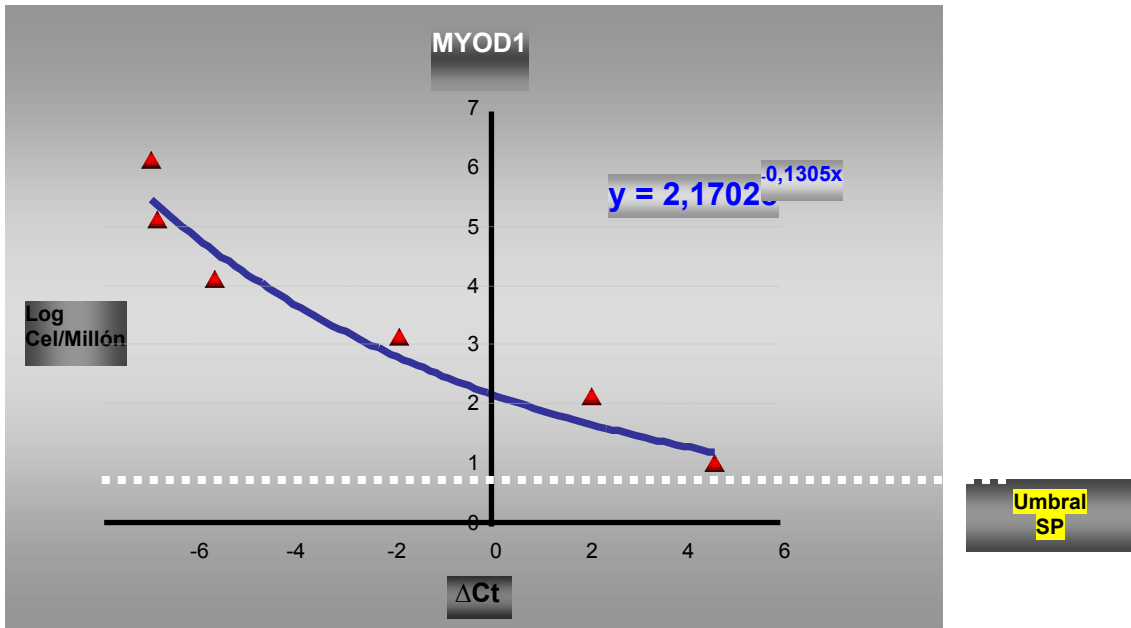


Fig.25. Gráfica de las muestras spiking MYOD1-1.

El análisis de la sensibilidad y en general, de los resultados de la cuantificación de las subunidades de RACH gamma y alfa fue esencialmente distinto a lo descrito para los otros marcadores, debido a que es necesario analizar conjuntamente RACH alfa y RACH gamma. Se analiza por separado cada una de las subunidades y las referimos al gen endógeno TBP, es decir ΔCt de gamma respecto al ΔCt de TBP, y ΔCt de alfa respecto al TBP.

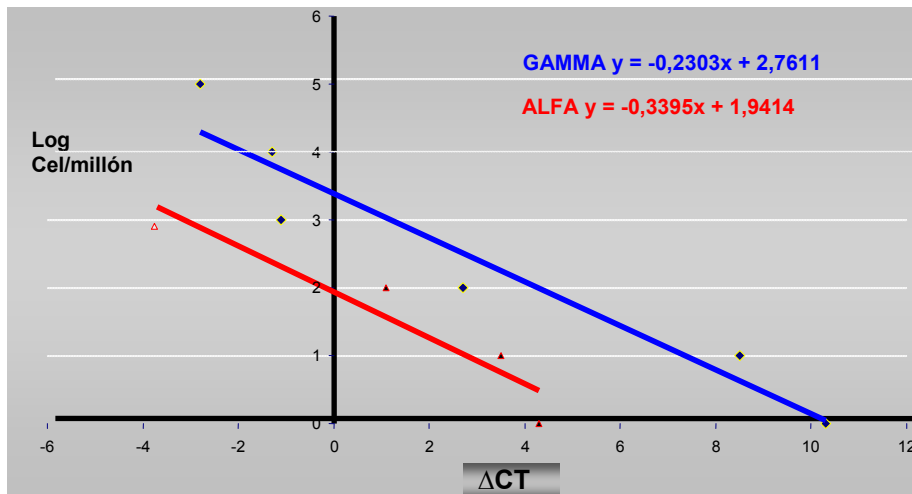


Fig. 26. Gráfica de la distribución de las muestras spiking del RACH alfa y gamma.

En la figura 27, se muestra una gráfica que compara el nivel de expresión de los tres marcadores a distintas cargas tumorales (muestras spiking S1-7)

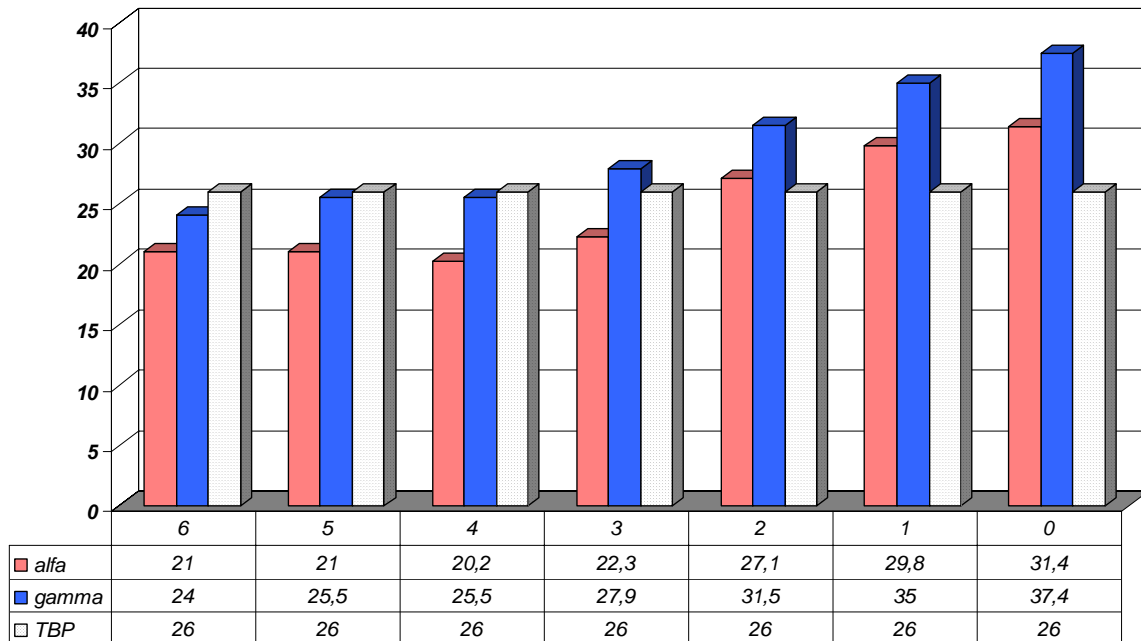


Fig. 27. Gráfica del nivel de expresión de los 3 marcadores

Si expresamos la cuantificación de los dos genes en una gráfica (Fig.28) en la que aparezca los valores Ct de alfa y gamma en cada una de las muestras *spiking*, (expresadas en logaritmo base 10), obtendremos lo siguiente:

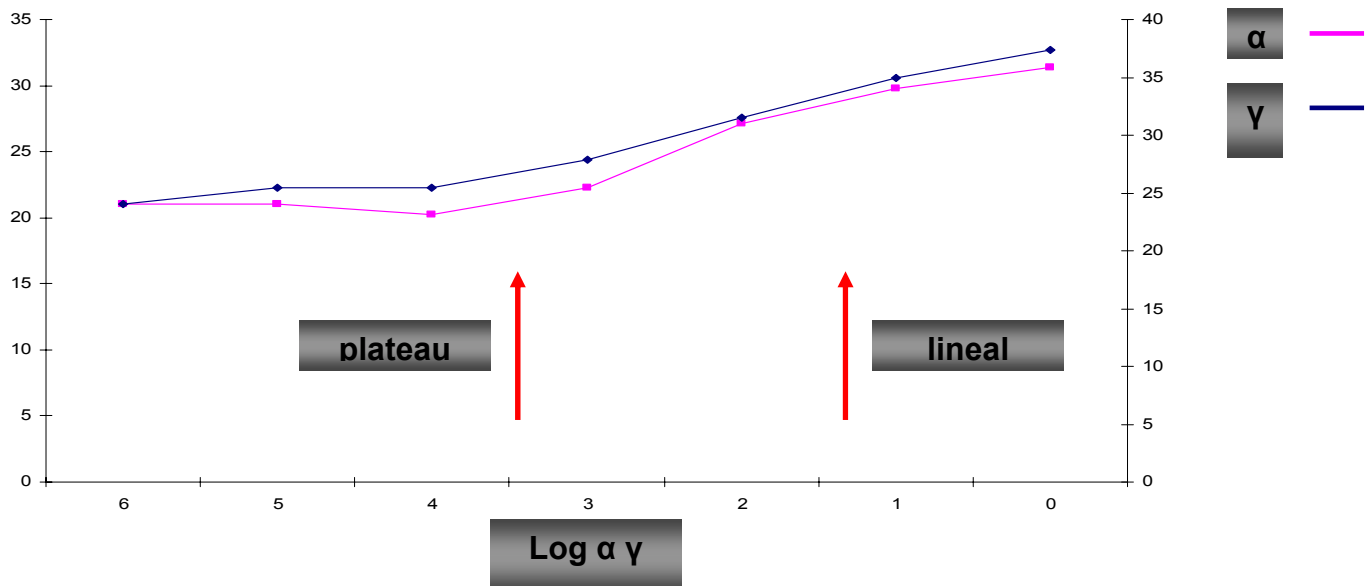


Fig. 28. Gráfica de los valores Ct gamma y alfa de las muestras *spiking*.

Se distinguen claramente dos fases:

-Una plateau, a concentraciones tumorales altas (10^6 a 10^4), indicando que la señal aparece prácticamente en el mismo ciclo y evidenciando una cierta saturación en la expresión. Es decir, la expresión de alfa y gamma se mantienen constantes a pesar de incrementar la carga tumoral.

-Una lineal, a concentraciones inferiores de 10^3 la señal de expresión aparece en ciclos progresivamente superiores, hasta detectar 1 célula por cada 10^7 cel. normales.

	ΔCt Gamma	ΔCt alfa	Log Gamma	Log Alfa	Cel/10⁶
S-7	-2.8	-4.3	6	6	1000000
S-6	-1.3	-4.3	5	5	100000
S-5	-1.2	-3.8	4	4	10000
S-4	5	-3.7	3	3	1000
S-3	8.5	1.1	2	2	100
S-2	10.3	3.5	1	1	10
S-1	11		0	2	
SP	28.5	11.5	-3.79	-1.96	

En el análisis comparativo de los diferentes marcadores utilizados para la enfermedad mínima residual, vemos que en el caso de los específicos de tumor, PAX-3/7-FKHR, el punto de corte se establece en la última muestra donde se detecta la señal, es decir, el límite lo establece la sensibilidad de la técnica. En el caso de los otros marcadores, específicos de tejido, el punto de corte lo establece el valor obtenido de la sangre periférica de niños sanos.

Así, tal como se resume en la tabla siguiente el punto de corte, para todos los marcadores, se sitúa el *spiking* S2, que equivale a la detección de 10 células tumoral en 10^7 células normales.

CÉLULAS TUMORALES	C.MNC	PAX3-FKHR ΔC_T	PAX7-FKHR ΔC_T	MYOD-1 ΔC_T	ACh- γ ΔC_T	ACh- α ΔC_T
10^6	10^7	-3,1	-0,7	-8,5	-2	-4
10^5	10^7	-3	-0,3	-8,1	-0,5	-5
10^4	10^7	-2	1,2	-6,4	-0,5	-5,8
10^3	10^7	1,1	7,2	-3,3	1,9	-3,7
10^2	10^7	4,4	10,4	0	4,5	1,1
10^1	10^7	7,2	12,3	2	9	3,8
10^0	10^7	Ø	Ø	4,5	11,4	4,4
CONTROL SP		Ø	Ø	6	Ø	8
CONTROL MO		Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Punto de corte

Fig.29.

Células tumorales: n° de células (10^6 - 10^0) obtenidas de las líneas celulares de RMS RH30 y CW9019 diluidas en 10^7 cel. mononucleadas procedentes de sangre periférica de un donante sano.

C.MNC: cel. mononucleares (10^7) de SP de donante sano sobre las que se mezclan las cel. tumorales RMS.

GENES ANALIZADOS: PAX3-FKHR, PAX7-FKHR, MYOD1, RACH γ y RACH α .

$\Delta C_T = C_T(\text{GEN PROBLEMA}) - C_T(\text{TBP})$.

ND: no detectable, es decir no se detecta el gen problema.

	ΔCt	Cell/ 10^6	Log cel
EWS-Fli1-7	4	1000000	6
EWS-Fli1-6	5.53	100000	5
EWS-Fli1-5	7.82	10000	4
EWS-Fli1-4	10.8	1000	3
EWS-Fli1-3	16.2	100	2
EWS-Fli1-2	28	10	1
EWS-Fli1-1	28	1	0
SP	27.7		0.56

En la PCR cuantitativa del transcrito EWS-Fli1 sensibilidad se estableció en la muestra spiking **S3**, es decir que se detectaba 10^2 células tumorales diluidas en 10^7 células normales. Esto ens un logaritmo más que en la RT-PCR convencional. (Fig.30).

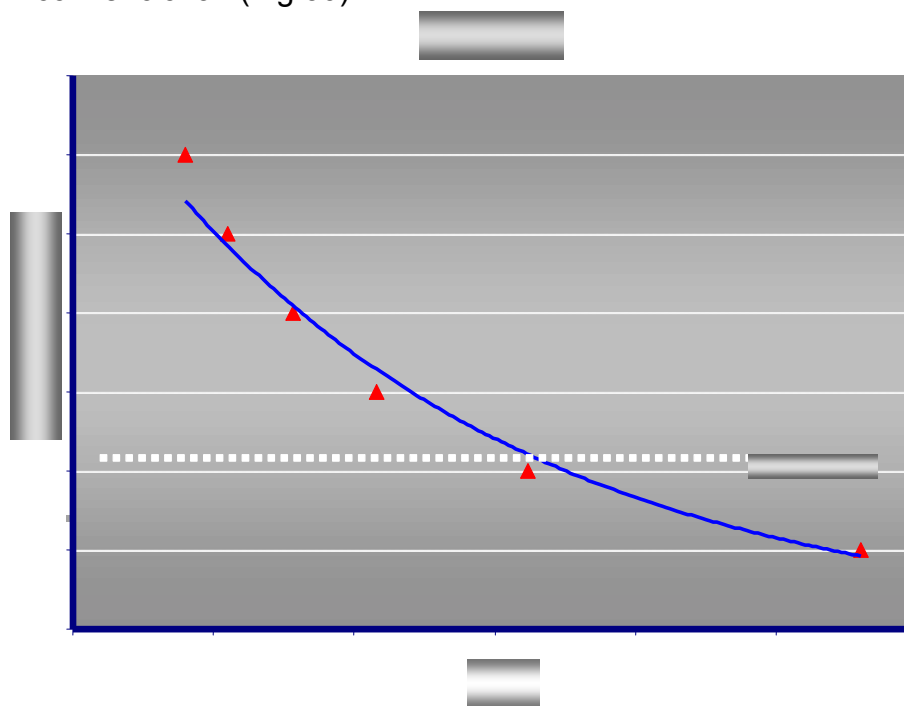


Fig. 30.-Gráfica del nivel de expresión de EWS-Fli1

La sensibilidad del ensayo con EWS-ERG fue muy baja, estableciéndose en la muestra *spiking* S4, es decir detecta a partir de 10^3 células en 10^7 células normales. (Fig.31).

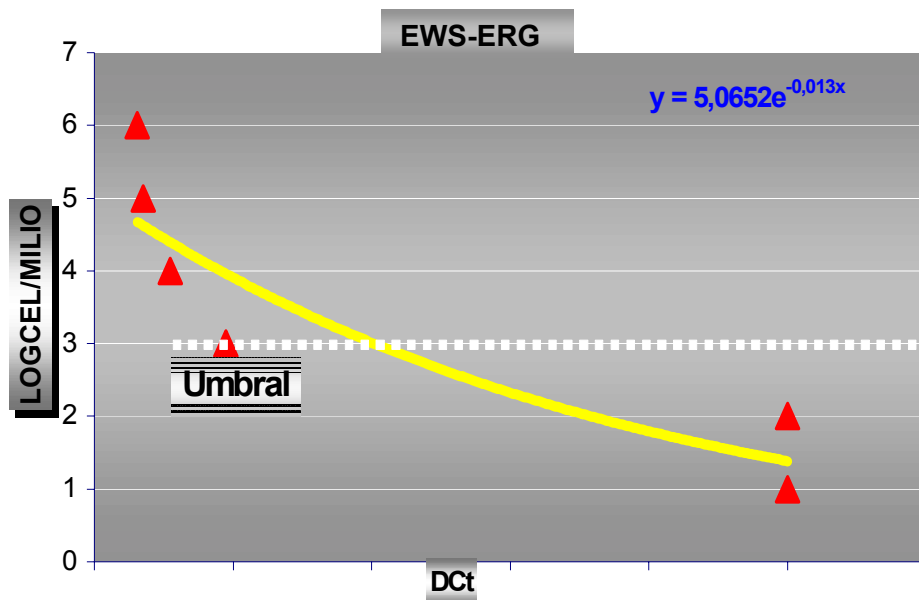


Fig. 31. Gráfica del nivel de expresión de EWS-ERG

2- ESPECIFICIDAD DE LOS ENSAYOS

El análisis de la especificidad de los ensayos de PCR “convencional”, se realizó mediante la secuenciación de las bandas de tamaño esperado, visualizadas y separadas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, como resultado de la PCR. Las secuencias obtenidas fueron contrastadas con el Banco de Genes (*Gene Bank*) y todas ellas fueron coincidentes al 100%.

A modo de ejemplo, en la fig 32 se muestra la secuencia del transcrito EWS-Fli

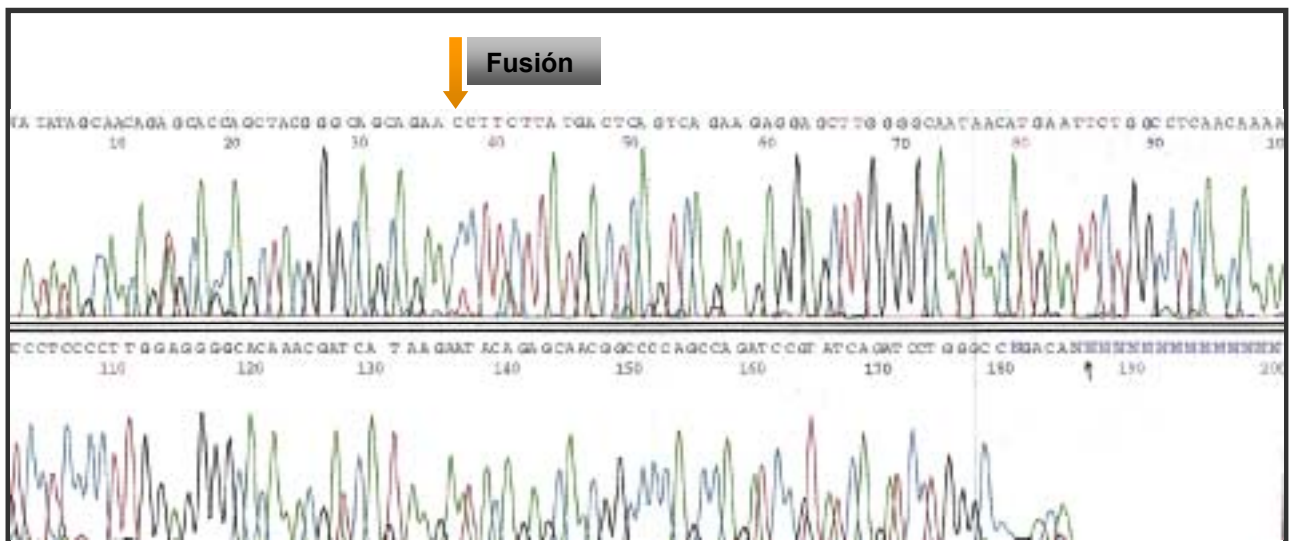
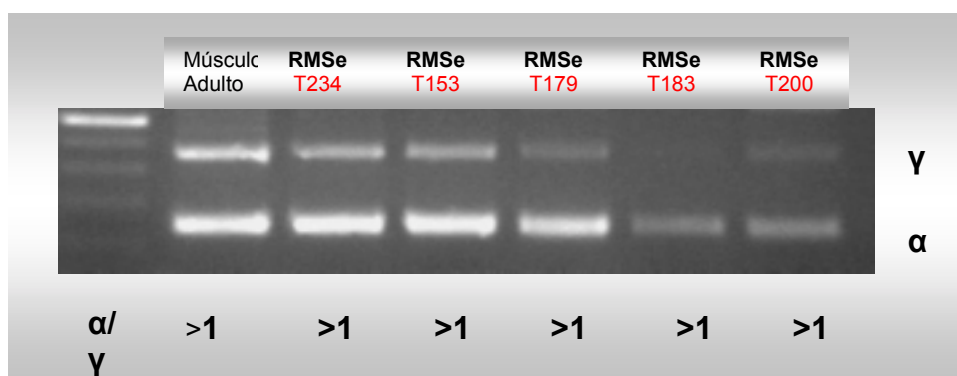


Fig.32.-Secuencia del resultado después de realizar una PCR anidada para EWS-Fli-1. Corresponde a la fusión tipo1 209pb.

En los ensayos de expresión del RACH alfa y gamma mediante multiplex PCR, se testaron además de RMS, otros tumores. Todos los RMSe expresaban ambas subunidades alfa y gamma y mediante densitometría comparativa, establece una ratio $\alpha / \gamma > 1$ en la mayoría de ellas. Este tipo de ensayo no presenta una especificidad absoluta, ya que algunos tumores, entre ellos algunas muestras de SE, Nbl y tumor de Wilms, presentaban una ratio < 1 . A continuación se muestra un gel de agarosa a modo de ejemplo (Fig 32):



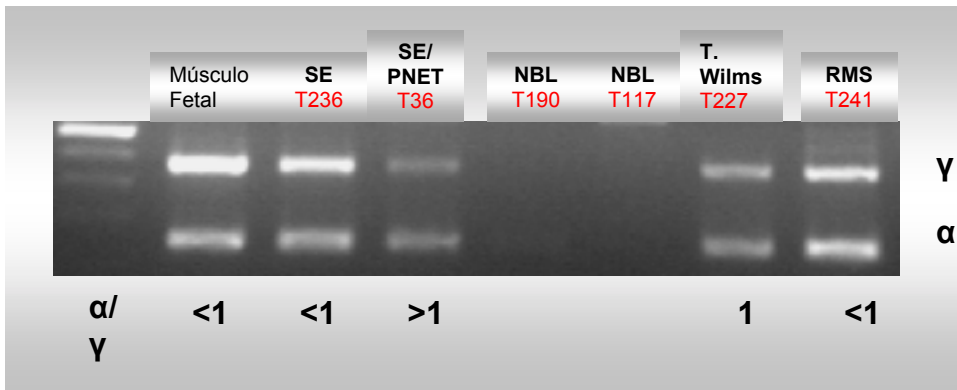


Fig. 33- Densitometría comparativa y multiplex PCR en el estudio RACH

Además, se realizó la secuenciación de las dos bandas de tamaño esperado. Las dos secuencias siguientes corresponden a la secuenciación del RACH gamma y alfa:

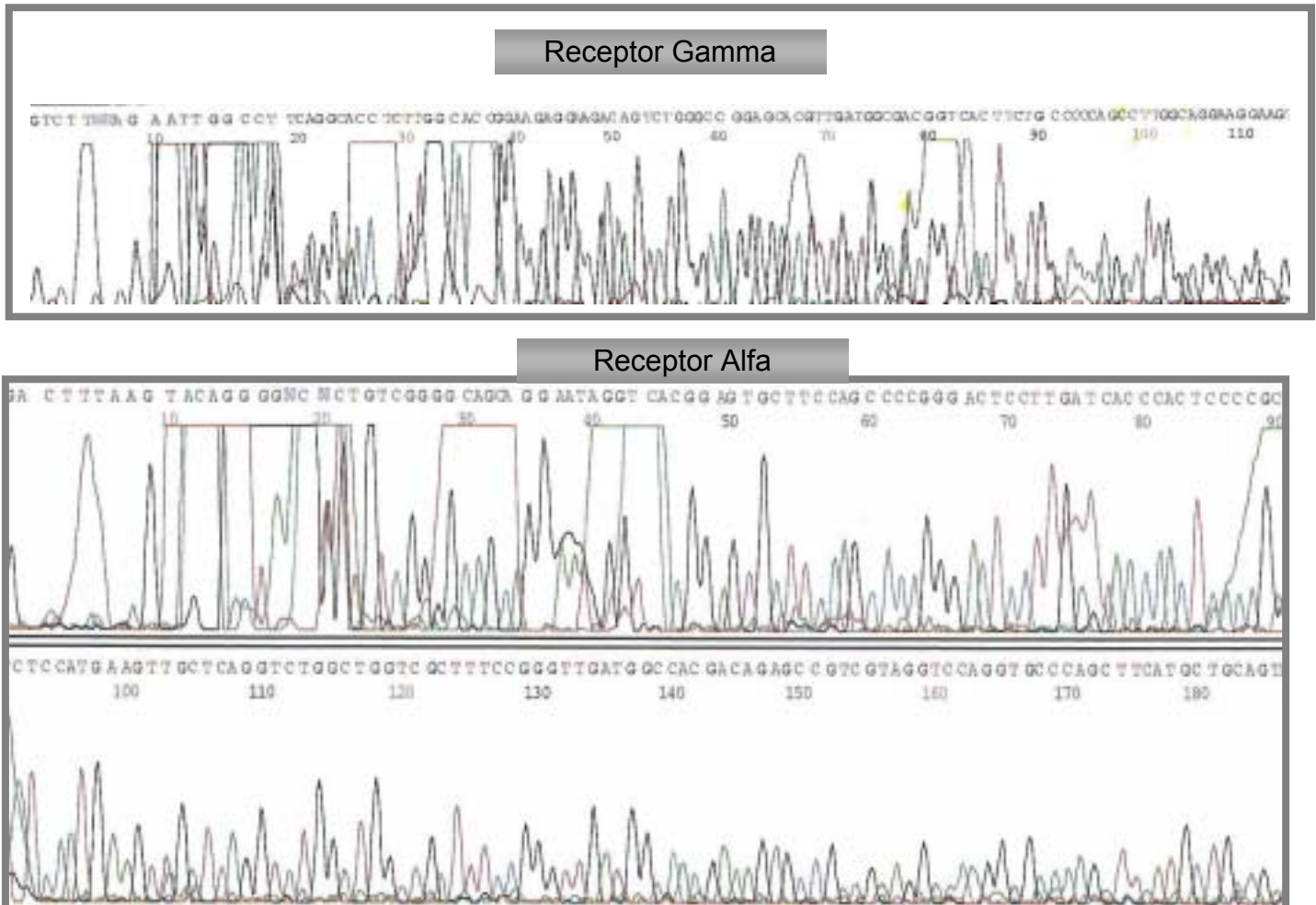


Fig.33.-Secuencia del resultado de una Multiplex-PCR para ACh.

En los ensayos de PCR cuantitativa, la especificidad se confirma por la negatividad de las muestras de sangre periférica de donantes sanos y de

muestras de otros tipos de tumores no-RMS (sin el producto de fusión Pax3/7-FKHR). Estos controles fueron todos ellos negativos.

En el caso de la PCR en tiempo real del sarcoma de Ewing se procedió de igual modo, demostrando la negatividad de las muestras de sangre periférica de donantes sanos y de muestras tumorales “no-Ewing”.

En el caso de MYOD1, la especificidad resultó ser menor (que los genes específicos de tumor), sobre todo en aquellas muestras *spiking* más diluidas o con menos carga tumoral. El rango de resultados entre las distintas cargas tumorales y la sangre periférica es estrecho y de hecho el ΔCt de la SP está muy cerca de las dos últimas diluciones 10^1 y 10^2 células tumorales en 10^7 células normales.

MYOD1-1	4.6	10	1
MYOD1-2	8.1	1	0
SP	10.29		0.56

En el caso de la detección de las subunidades alfa y gamma del receptor de acetilcolina la especificidad se estudió comparando los ΔCt alfa y gamma de las distintas muestras (Fig 34):

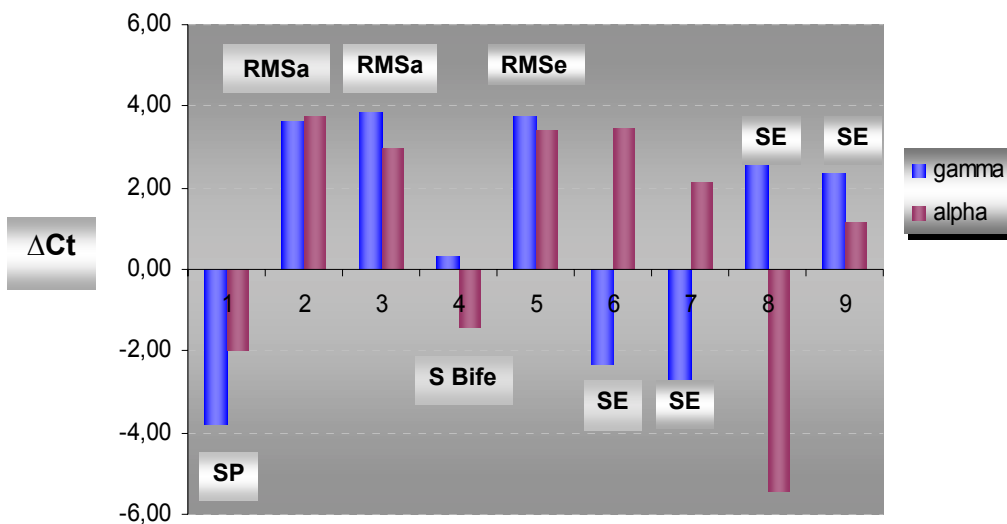


Fig.34. Gráfica de especificidad. Expresión conjunta de RACH α y RACH γ expresados según los respectivos ΔCt .

Todas las muestras tumorales de rbdomiosarcoma alveolar y embrionario mostraron una expresión con ΔCt alfa y gamma concordantes, es decir ambos ΔCt fueron positivos, a diferencia de la sangre periférica de donante sano, en la que ambos marcadores fueron negativos. En las muestras de Sarcoma de Ewing todas las muestras testadas excepto una, mostraron una discordancia

entre alfa y gamma, es decir mientras uno de los ΔCt era positivo, el otro era negativo. Una muestra de SE mostró la misma expresión que la descrita para los RMS.

Esto podría indicar que a pesar de no poseer una especificidad tan alta como los productos de fusión de los RMSa y SE, el estudio comparado de alfa y gamma resulta un ensayo útil para el seguimiento especialmente del RMSe, al no disponer éste, de un marcador específico de tumor.

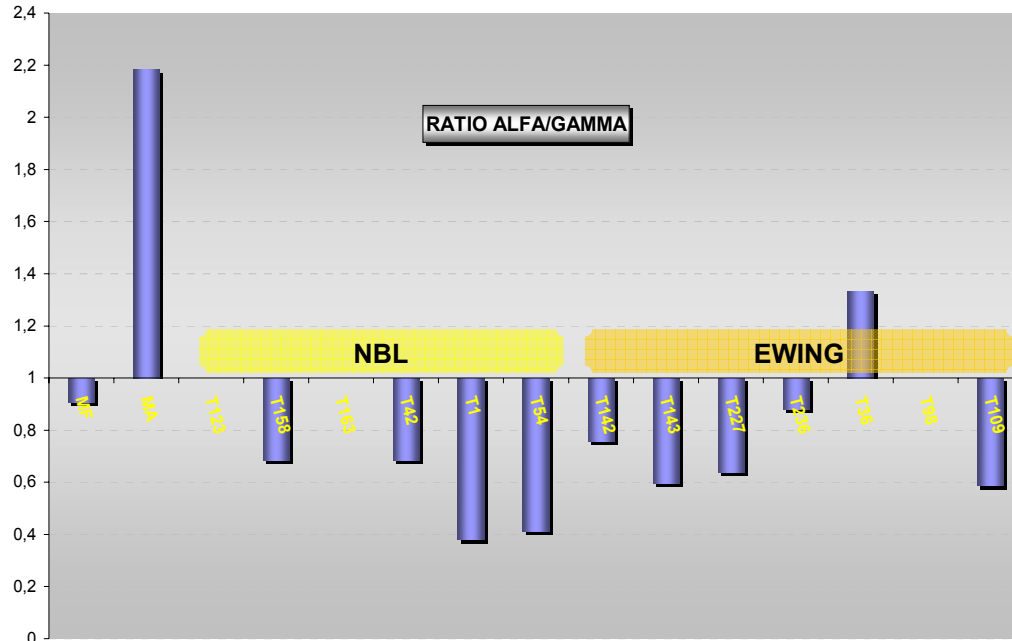


Fig 35, Ratio de RCh Alfa y el RCh Gamma en tumores no RMS

3 – SARCOMA DE EWING

3.1- ANÁLISIS DE LOS TIPOS DE FUSIÓN SARCOMA DE EWING

Se analizaron las muestras tumorales de los sarcomas de Ewing, mediante PCR, para determinar el tipo de fusión específico de cada muestra de tumor.

En la figura siguiente se muestra un ejemplo de varios tumores, expresando los dos tipos de fusión más frecuentes:

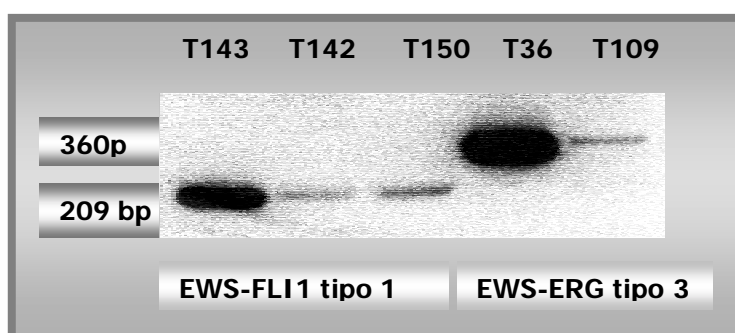


Fig.36. Gel de Agarosa con varios S Ewing, mostrando los dos principales productos de fusión: EWS-Fli tipo 1 (exón 7/ exón6) y EWS-ERG tipo 3 (exón7/ exón 6).

Se analizaron un total de 22 muestras de sarcoma de Ewing, de los cuales 17 (75.5%) expresaban la fusión EWS-Fli1 y 4, la fusión EWS-ERG (27,5%). Del grupo con EWS-Fli, sólo 1 expresaba EWS-Fli tipo 2 y el resto expresaban EWS-Fli tipo 1. Siete de ellos (31%) eran metastáticos al diagnóstico. Así **TODOS** los pacientes con tumores metastáticos y/o con fusiones **No EWS-FLI** sufrieron una o más recaídas. En cambio, entre los 7 pacientes con tumor localizado y fusión EWS-Fli1 tipo1, sólo uno sufrió una recaída, aunque los pacientes con el mismo tipo de fusión pero metastáticos el 86% presentaron recaídas.

Es interesante reseñar, que en algunas muestras tumorales se obtuvieron múltiples productos de RT-PCR. En todos ellos la PCR genómica confirmaba la presencia de un solo producto EWS-Fli1. De igual modo, en algunos casos se podía obtener productos inesperadamente grandes, sugiriendo que contenían exones o intrones extras, probablemente secundario a un *splicing* anómalo, más que a un *splicing* alternativo.

Las bandas accesorias obtenidas pueden también tratarse de formas incompletas o formas delecionadas del producto de fusión.

A continuación se presenta una tabla resumen de todos los pacientes con Sarcoma de Ewing, después del análisis mediante PCR del tipo de fusión:

TIPO DE FUSIÓN	ESTADIO	N ^a PACIENTES	REMISIÓN COMPLETA	RECAIDA
EWS-FLI tipo 1	LOCALIZADO	8(36%)	7 (87%)	1
EWS-FLI Tipo 1	METASTÁSICO	7 (31%)	1(14%)	6
EWS-FLI Tipo 2	LOCALIZADO	1 (4.5%)		1
EWS-ERG Tipo2	LOCALIZADO	1 (4.5%)		1
EWS-ERG Tipo 3	LOCALIZADO	3 (13%)		3
NEGATIVO	LOCALIZADO	2 (0.9%)		2
TOTAL		22	8	14

Fig. 37. Tabla resumen de los tipos de fusión encontrados en todas las muestras de Sarcoma de Ewing analizadas mediante PCR cualitativa.

3.2 –MONITORIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN EL SARCOMA DE EWING MEDIANTE PCR ANIDADA Y PCR EN TIEMPO REAL.

3.2.1- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS DE LOS PACIENTES

Las características clínicas de los pacientes están detalladas en la tabla siguiente. Los pacientes eran nueve niños y tres niñas con edades comprendidas entre 3 años y 17 años (media 10 años). Siete pacientes tenían tumores localizados (Grupo III) y cinco diseminados (Grupo IV). Histológicamente, tres eran PNET y 9 eran Sarcoma de Ewing. A nivel molecular, tres de ellos expresaban el producto de fusión EWS-ERG (tipo II=1, y tipo III=2), y los nueve restantes expresaban EWS-Fli1 (tipo I = 8 y tipo II=1).

Tres se localizaban en la pelvis, dos en pared torácica, dos en extremidades, uno paravertebral, uno abdominal, uno en maxilar inferior, uno paravesical y el último en la región paracardíaca. La media de seguimiento fue de 28 meses (rango: 12-60m). Durante todo ese tiempo todos los pacientes finalizaron el tratamiento. Durante el periodo de seguimiento tres pacientes presentaron recaídas metastásicas con o sin recaídas locales, tres presentaron progresión a pesar del tratamiento. Todos ellos murieron por progresión de la enfermedad. Los tres restantes, permanecen en remisión completa.

Pt ID nº	Edad (diagnóstico)	Sexo	Fusión	ESTADÍO	Localización
1	14a	F	EWS-FLi1 (I)	Diseminado (Hueso)	Pared costal
2	17a	M	EWS-ERG (II)	Localizado	Pelvis
3	7a	M	EWS-FLi1 (I)	Localizado	Paravertebral (dorsal)
4	12a	M	EWS-FLi1 (I)	Diseminado (hígado)	Abdominal
5	13a	F	EWS-FLi1 (I)	Diseminado (pulmón)	Torácico
6	9a	M	EWS-FLi1 (I)	Localizado	Extremidad (peroné)
7	13a	F	EWS-FLi1 (I)	Diseminado (hueso,pulmón)	Pelvis
8	6a	M	EWS-ERG (III)	Localizado	Pelvis
9	16a	M	EWS-ERG (III)	Localizado	Maxilar inferior
10	3a	M	EWS-FLi1 (I)	Localizado	Paravesical
11	6a	M	EWS-FLi1 (I)	Diseminado (pleura,hígado)	Paracardiaco
12	4a	M	EWS-FLi1 (I)	Localizado	Extremidad (fémur)

3.2.2- DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE FUSIÓN EWS-FLI-1 Y EWS-ERG EN SP/MO/LEUCAF

Los resultados de la monitorización de la EMR son expresados mediante gráficas que resumen la expresión (positiva o negativa) de los productos EWS/FlI1 o EWS-ERG, de las diferentes muestras tumorales, de SP y/o MO.

En el caso de la PCR cuantitativa los resultados se expresan mediante diagrama de barras, expresando el nivel de expresión de cada una de las muestras para un paciente dado.

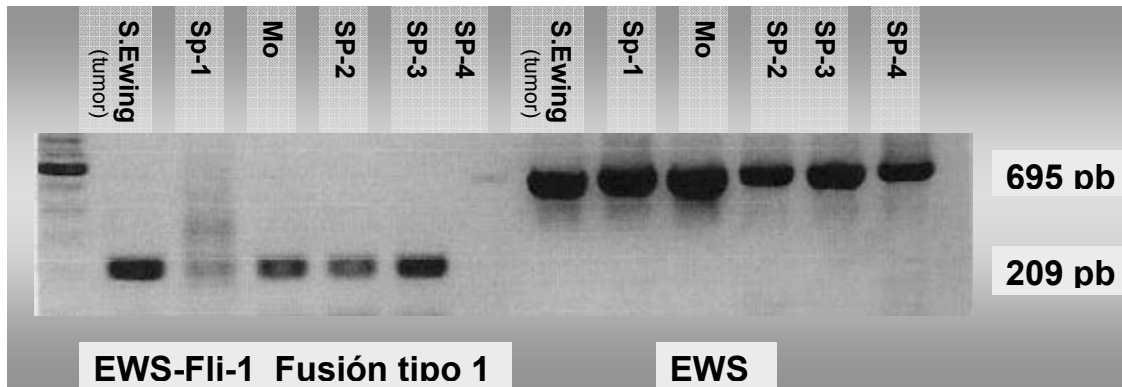
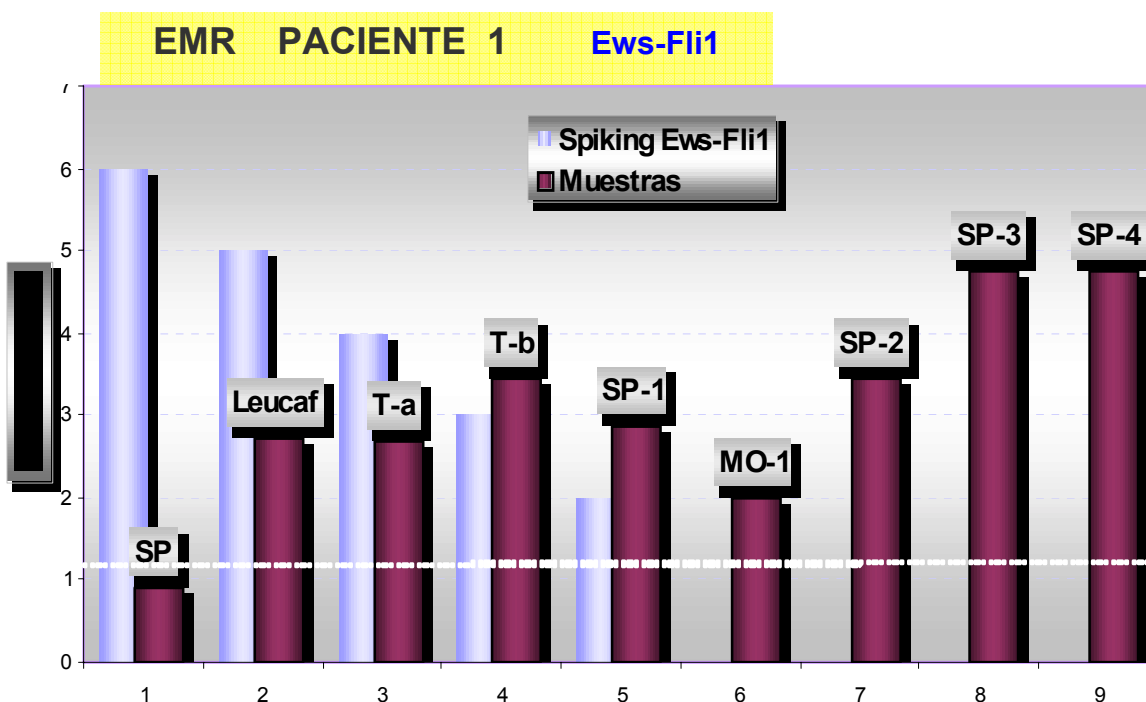
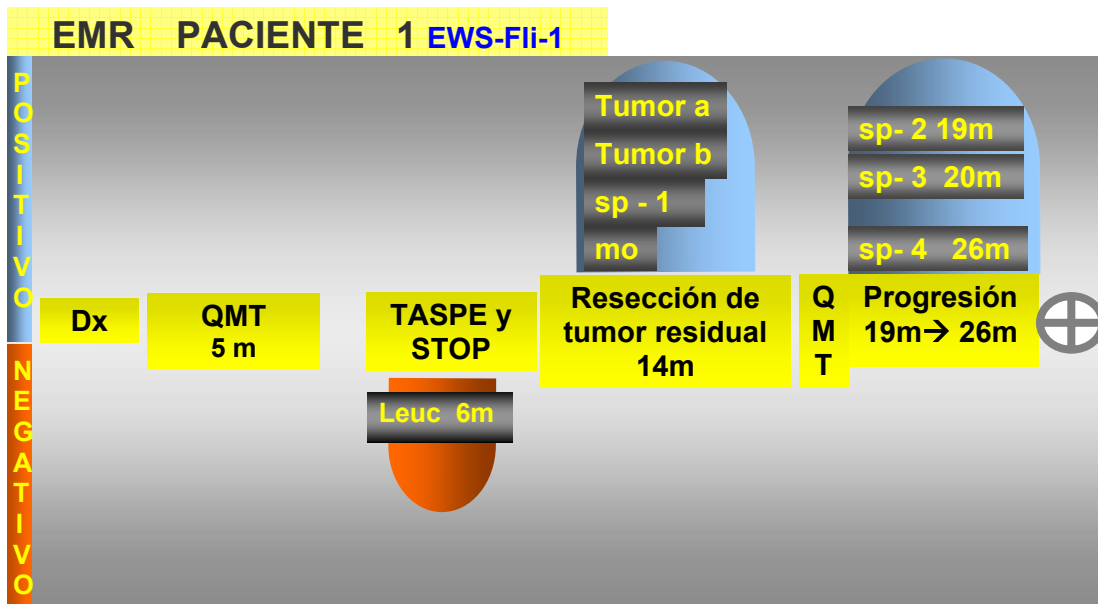


Fig. 38. Gel de agarosa con un ejemplo de seguimiento de paciente afecto de SE metastásico. Fusión EWS-Fli.1 (Tipo 1), mediante -PCR anidada.

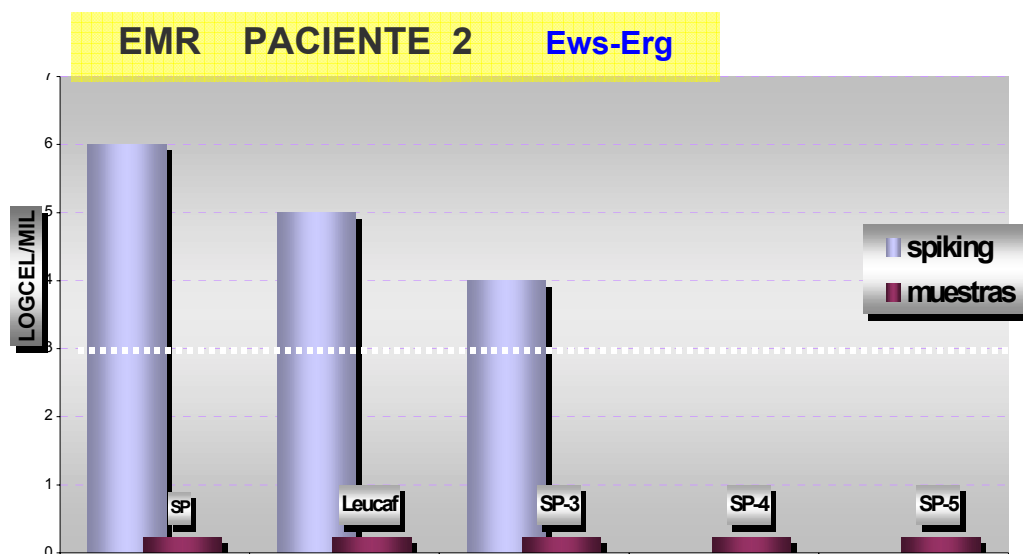
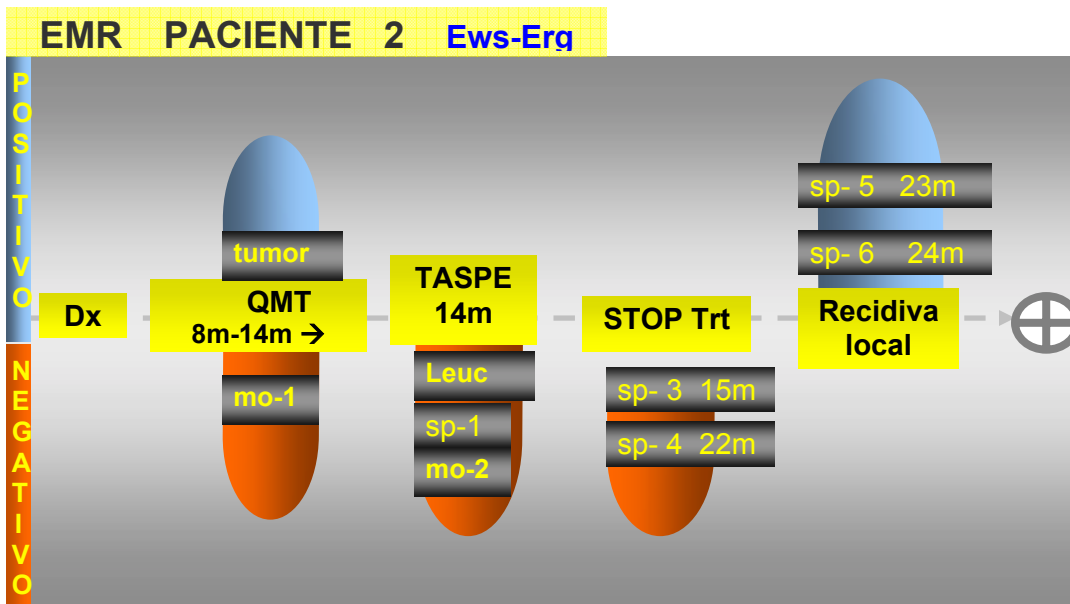
La evolución de cada paciente se expresa mediante dos gráficas, una cualitativa (PCR convencional o PCR anidada) y una cuantitativa (PCR en tiempo real). Finalmente se resume la evolución, a pie de gráfica.

En la monitorización de la ERM mediante PCR cuantitativa, se analizan los resultados, normalizándolos con el gen endógeno TBP, mediante el ΔCt y interpolando cada valor obtenido a la curva estándar de las muestras *spiking*, de las cuales conocemos la concentración de células tumorales contenidas en 1ml de sangre periférica, con aproximadamente $7.5 \text{ células mononucleares}/10^9$ (ver apartado 2.8.1).

Esto permite calcular, la carga tumoral estimada para la muestra en cuestión.

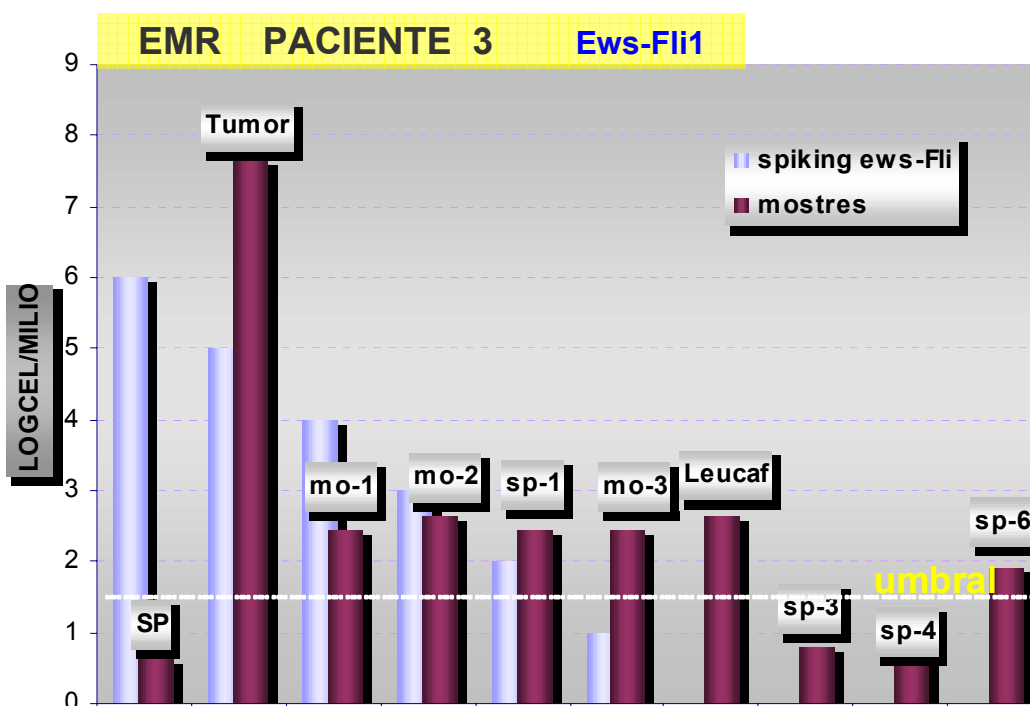
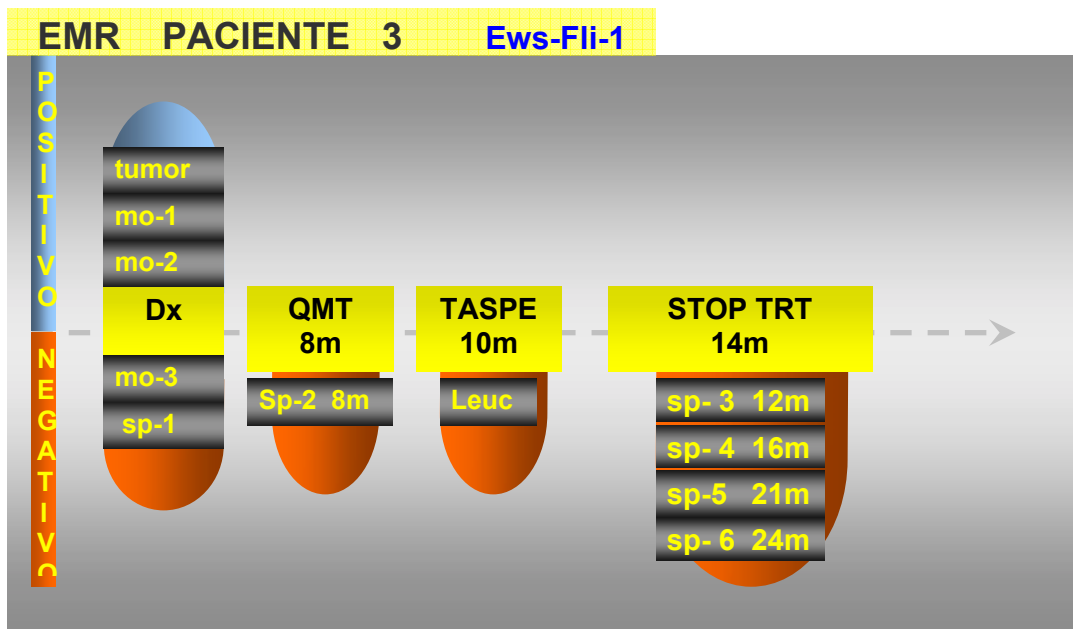


En el **paciente 1**, la primera muestra obtenida fue el producto de leucaféresis, que fue negativa. A los 10 meses de finalizar el tratamiento, se le reseco una masa residual, aparentemente estable. En ella se detectó el producto de fusión EWS-Fli1 tipo1 (exón6/exón 7), tanto en el tumor como en sangre periférica y médula ósea (SP1, MO), demostrando la presencia de actividad micrometastásica, que no era detectada a nivel histológico. Después de recibir tratamiento quimioterápico, todas las muestras de SP obtenidas siguieron siendo positivas. La paciente falleció por progresión de la enfermedad. En el análisis de las mismas muestras mediante PCR cuantitativa los resultados muestran una concordancia absoluta.



El **paciente 2** presentaba el producto de fusión EWS-ERG tipo 2 en la biopsia tumoral obtenida durante el tratamiento quimioterápico. Ésta se realizó al producirse un aumento de la masa de partes blandas. Curiosamente su histología no evidenció células malignas. El paciente recibió quimioterapia intensiva y rescate con precursores de sangre periférica. Las muestras en ese momento fueron negativas (leuc, sp, mo). A los 23m del diagnóstico aparece, en 2 muestras de sangre consecutivas (sp5 y sp6), la fusión EWS-ERG, coincidiendo con la recaída clínica. Finalmente el paciente falleció por progresión de la enfermedad.

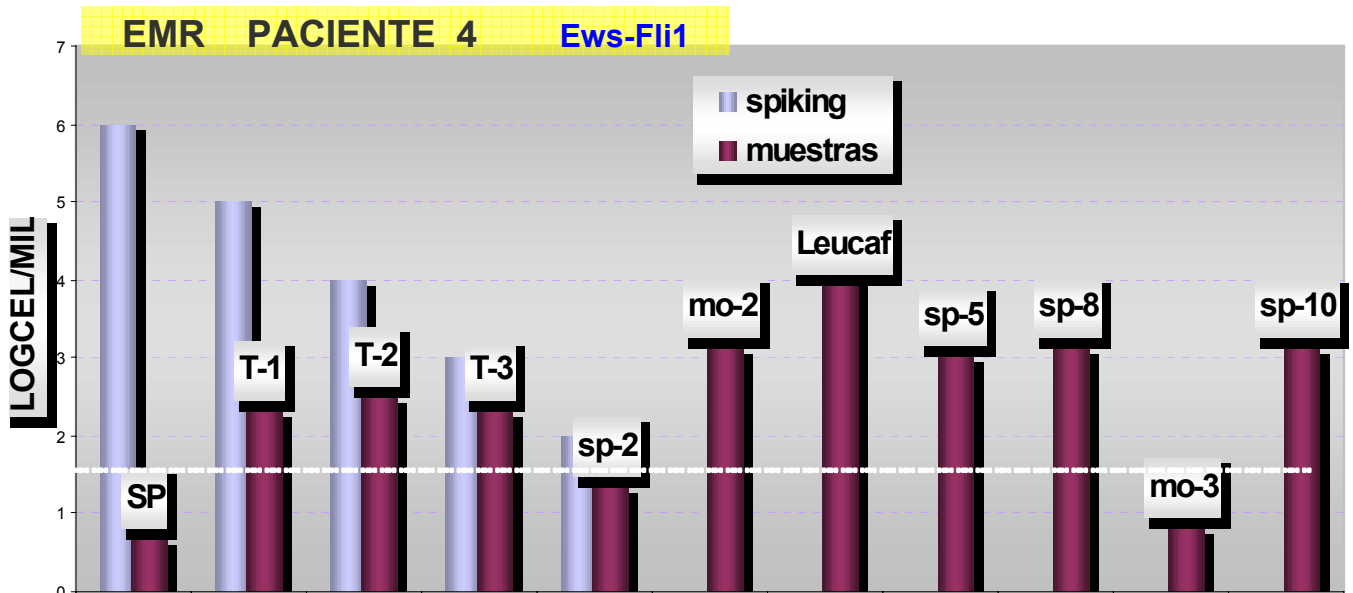
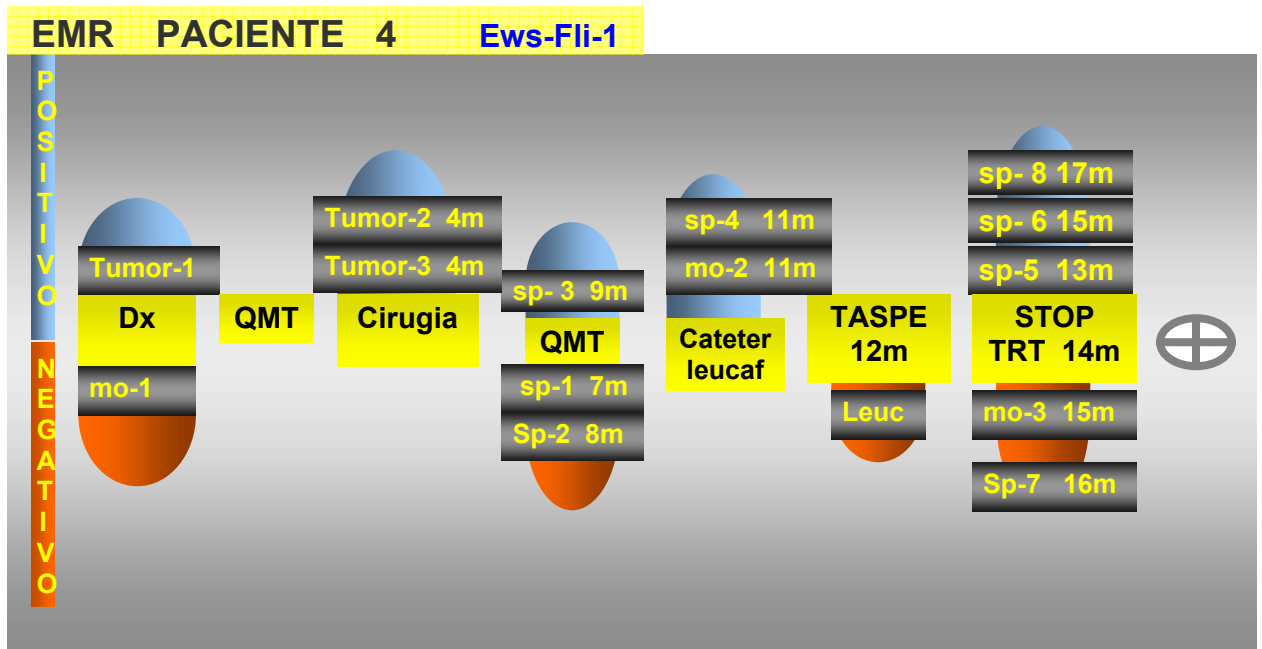
En la gráfica de PCR cuantitativa para la expresión de EWS-ERG, todas las muestras de sp/mo, resultaron negativas debido a la baja sensibilidad de la técnica. Sólo se obtuvieron valores positivos en las muestras *spiking* con cargas tumorales entre 10^5 y 10^6 células tumorales en 10^7 cel. normales. Es decir, solos las muestras tumorales fueron positivas.



El **paciente 3**, presentaba en el momento del diagnóstico, la expresión EWS-Fli tipo 1 en el tumor y en la médula ósea, siendo la muestra de sp (sp1) negativa. Después de recibir tratamiento con QMT, incluyendo una consolidación con TASPE, todas las muestras posteriores muestras fueron negativas mediante el análisis con PCR convencional.

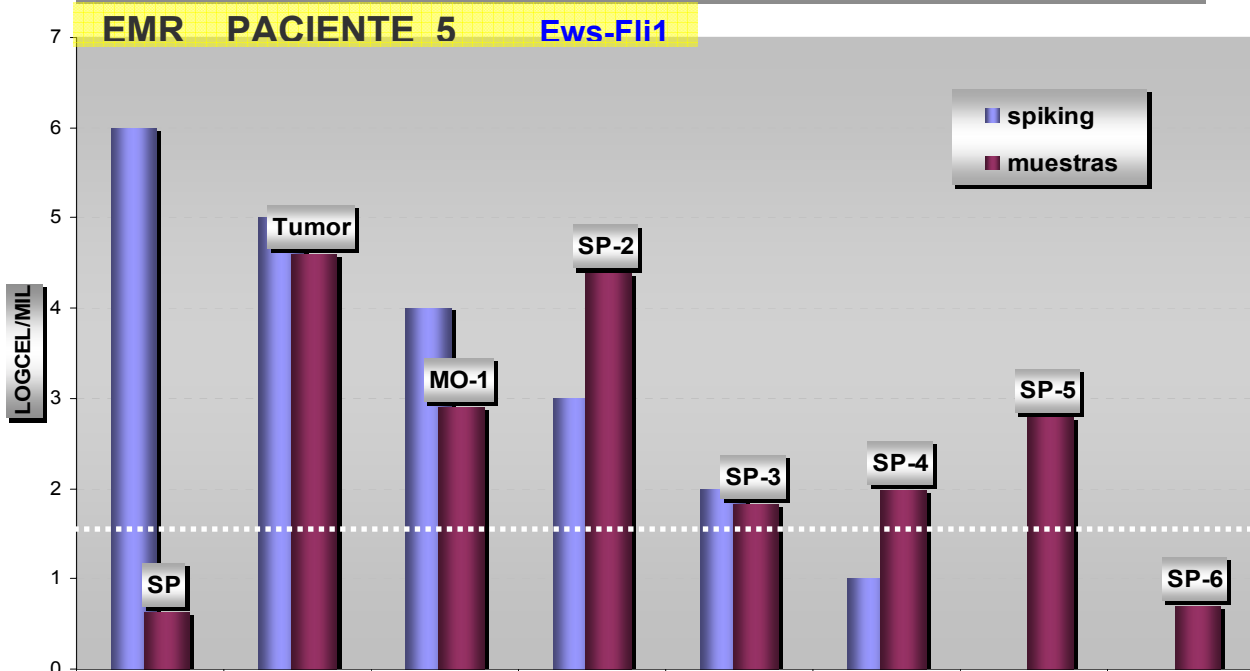
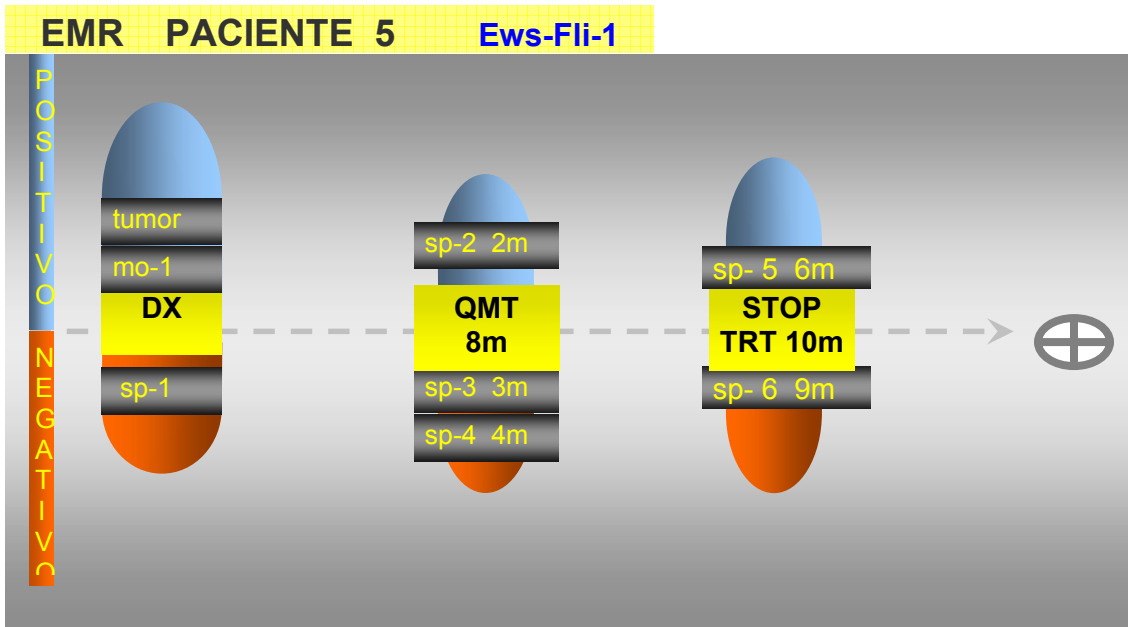
En la gráfica de PCR cuantitativa, las muestras del diagnóstico fueron todas positivas (mo1, m2, mo3, mo4 y sp1). La leucaféresis fue positiva. Después del tratamiento quimioterápico las sp3 y sp4 se negativizaron. La última muestra de sp (sp6) obtenida a los 24 meses del diagnóstico, fue débilmente positiva.

El paciente a los 36 m de finalizar el tratamiento, continúa en remisión completa de su enfermedad.



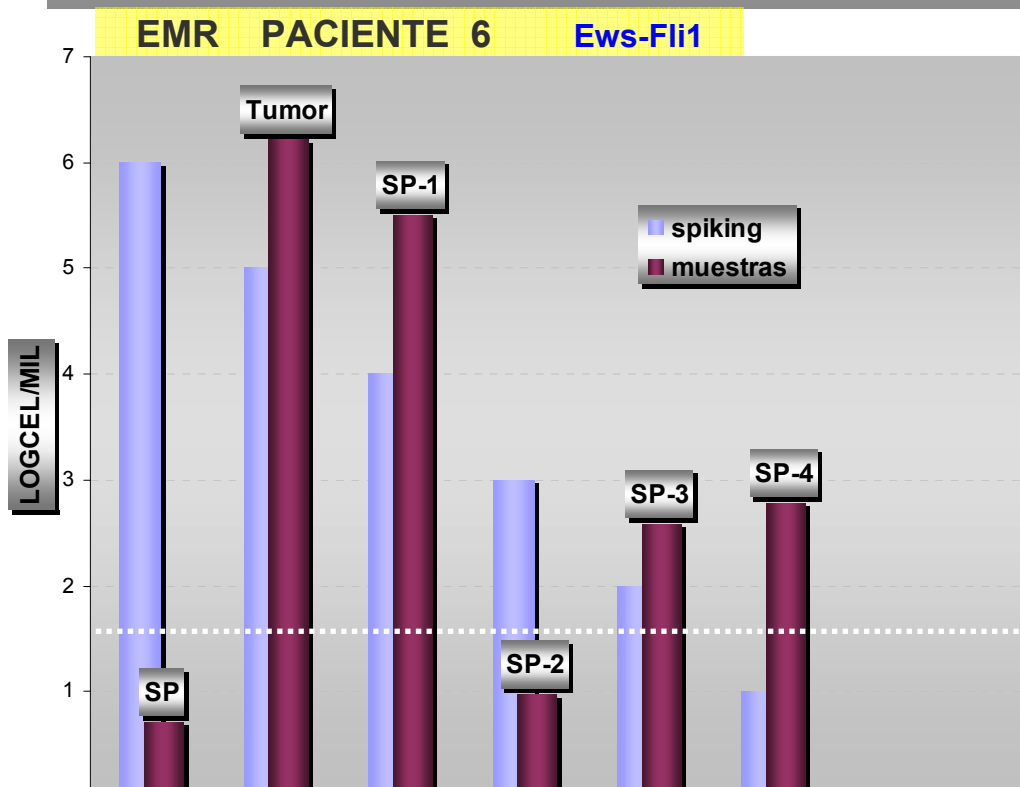
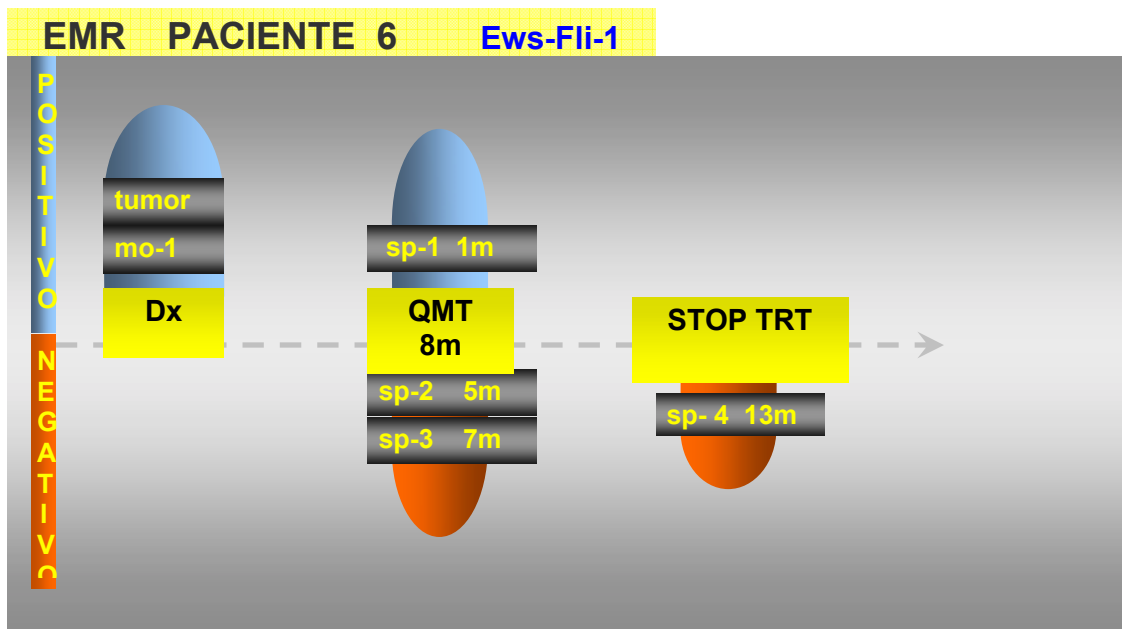
El **paciente 4**, presentaba al diagnóstico la expresión de EWS-Fli1 tipo 1 en la muestra tumoral. La mo (mo-1) de ese momento fue negativa.

Después de seguir tratamiento con quimioterapia, se realiza resección de masa residual, en la que se detecta de nuevo el producto de fusión EWS-Fli1. El paciente continuó tratamiento con QMT, con negatividad de las muestras de sp hasta 2 meses antes del transplante autólogo (TASPE). En ese momento se detecta de nuevo el producto de fusión, en dos muestras consecutivas de sp y mo (sp-4 y mo-2). Posteriormente persistió la positividad en 3 de las cuatro sangres periféricas obtenidas periódicamente (sp5, sp6 y sp8). A los 33m de evolución se produce una recaída clínica, falleciendo un mes después por progresión de su enfermedad. En el análisis cuantitativo de las muestras se presentó concordancia absoluta en todas las muestras testadas.



La **paciente 5**, presentaba al diagnóstico la expresión de EWS-Fli1 tipo 1 en la muestra tumoral, con mo positiva y sp negativa.

Se inicia tratamiento quimioterápico. La muestra de sp a los 2 meses (sp2) fue positiva. Las siguientes dos muestras a los 3 meses (sp3) y 4 meses (sp4), se negativizaron en el análisis mediante PCR cualitativa y en cambio en la PCR cuantitativa persisten positivas, aunque en el límite de positividad (10 cel tumorales /10⁷). Un mes mas tarde y coincidiendo con la progresión de la enfermedad, se detecta el producto de fusión nuevamente en sp5 en ambos análisis de PCR. El paciente continuó tratamiento con QMT de segunda línea. La muestra a los 9 meses (sp6) fue sorprendentemente negativa para ambos análisis de PCR, a pesar de encontrarse en fase avanzada de la enfermedad y fallecer al poco tiempo después.

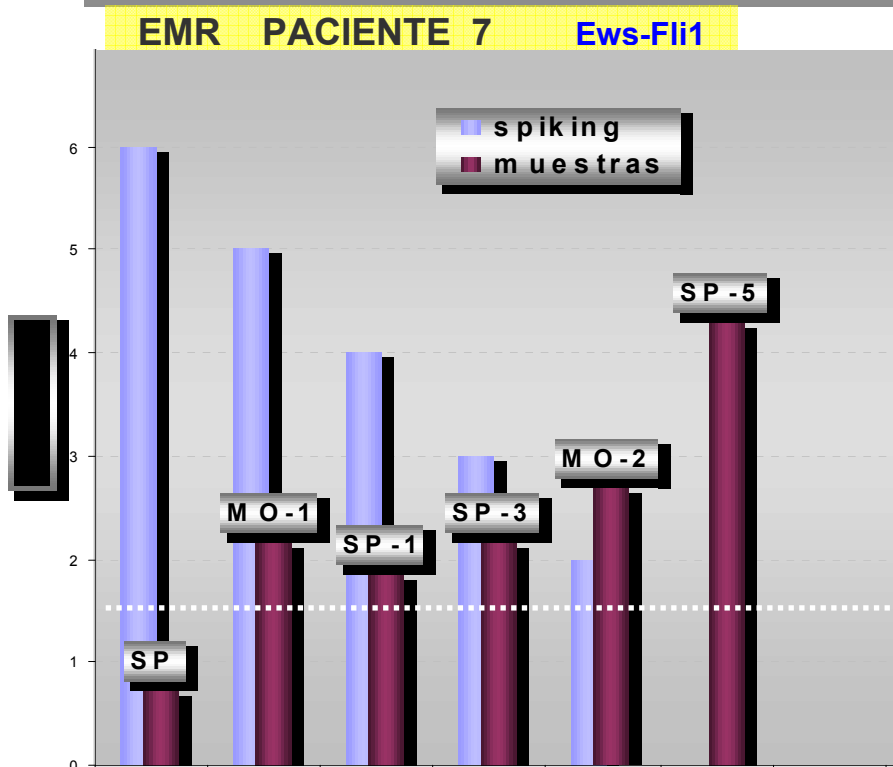
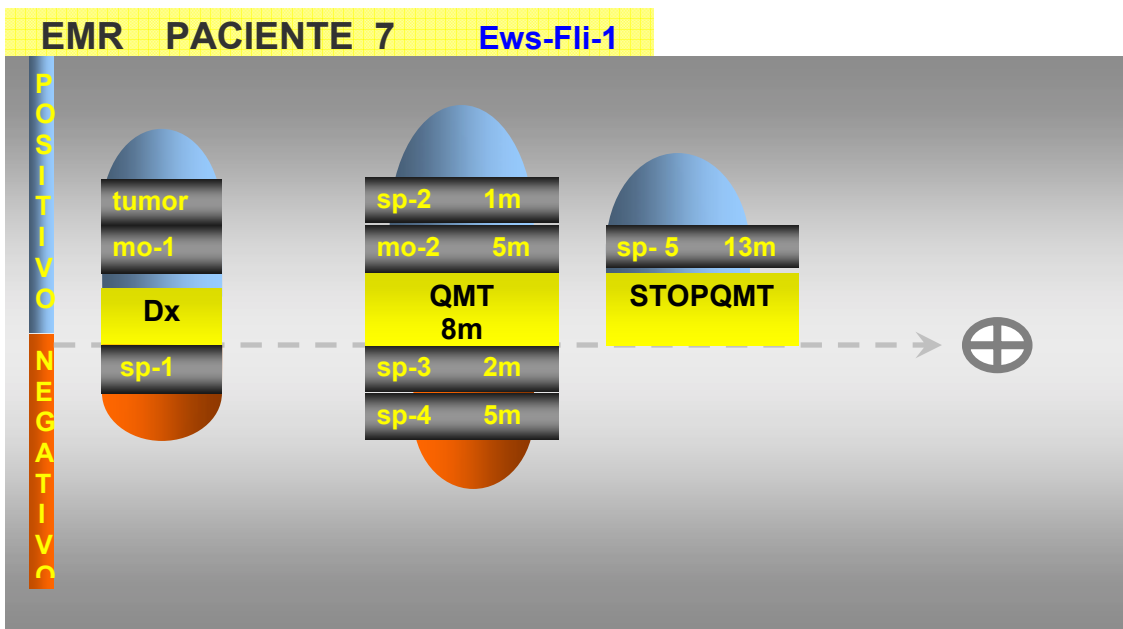


El **paciente 6**, presentaba al diagnóstico la expresión de EWS-Fli1 tipo 1 en la muestra tumoral y en la muestra mo-1.

Se inicia tratamiento quimioterápico. La muestra de sp al mes (sp1) fue positiva. Las siguientes dos muestras a los 5 meses (sp2) y 7 meses (sp3), fueron negativas. El paciente finalizó el tratamiento QMT y la muestra a los 13 meses (sp4) persistió negativa.

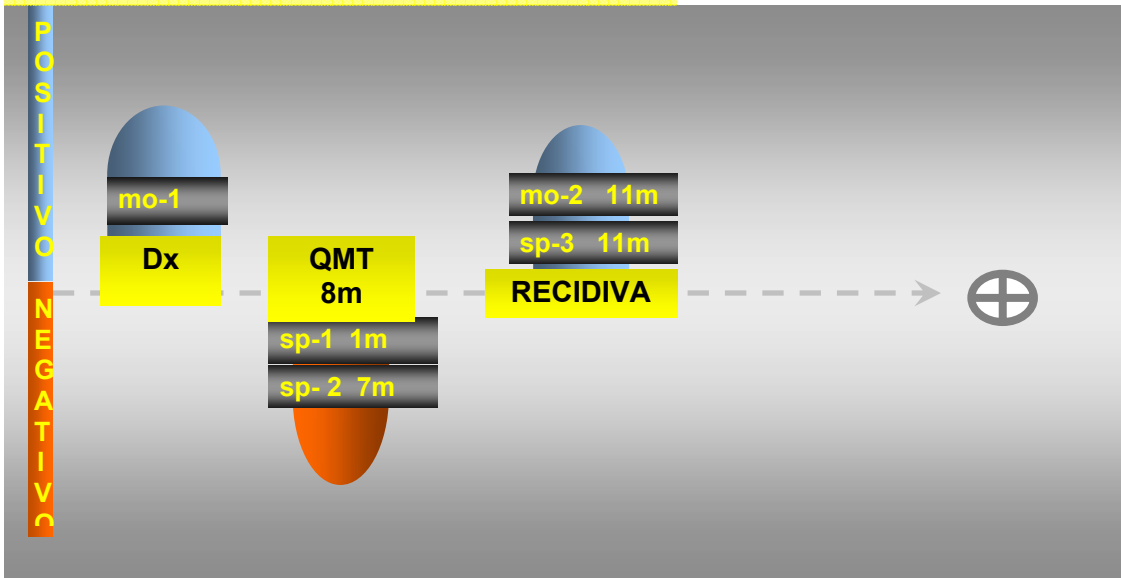
En el análisis mediante PCR cuantitativa, sp2 fue igualmente negativa, pero en sp3 y sp4 se detectan células tumorales (10^2 cel tumorales / 10^7), a un nivel similar.

El paciente se encuentra en remisión completa a los 3 años del diagnóstico.



La **paciente 7**, presentaba al diagnóstico la expresión de EWS-Fli1 tipo 2 en la muestra tumoral y en la muestra mo-1.

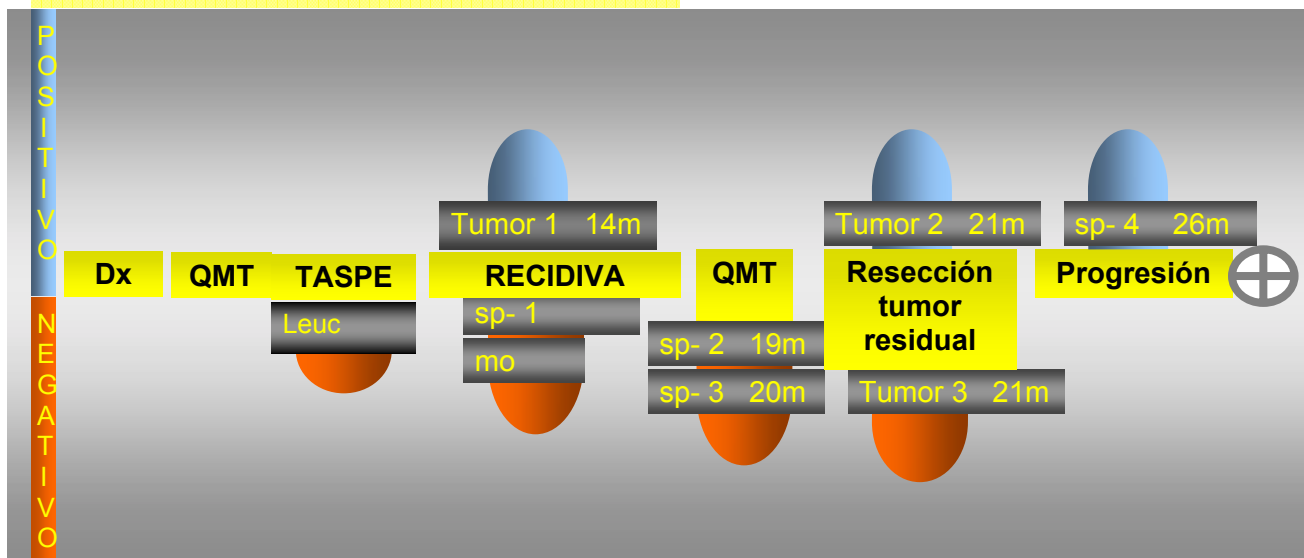
Se inicia tratamiento quimioterápico. La muestra de sp al mes (sp1) fue positiva. La sp a los 2 meses (sp3) fue negativa. A los 5 meses se realiza resección de tumor residual, la sp de aquel momento (sp4) fue negativa y la médula ósea (mo2) positiva en ambos análisis de PCR. El paciente finalizó el tratamiento QMT y a los 13 meses, coincidiendo con la recaída clínica, se obtuvo la muestra sp4 que presentaba una alta carga tumoral (10^3 cel / 10^7). La paciente falleció al poco después por progresión de la enfermedad.



El **paciente 8**, presentaba al diagnóstico la expresión de EWS-ERG tipo III en la muestra tumoral y en la muestra mo1.

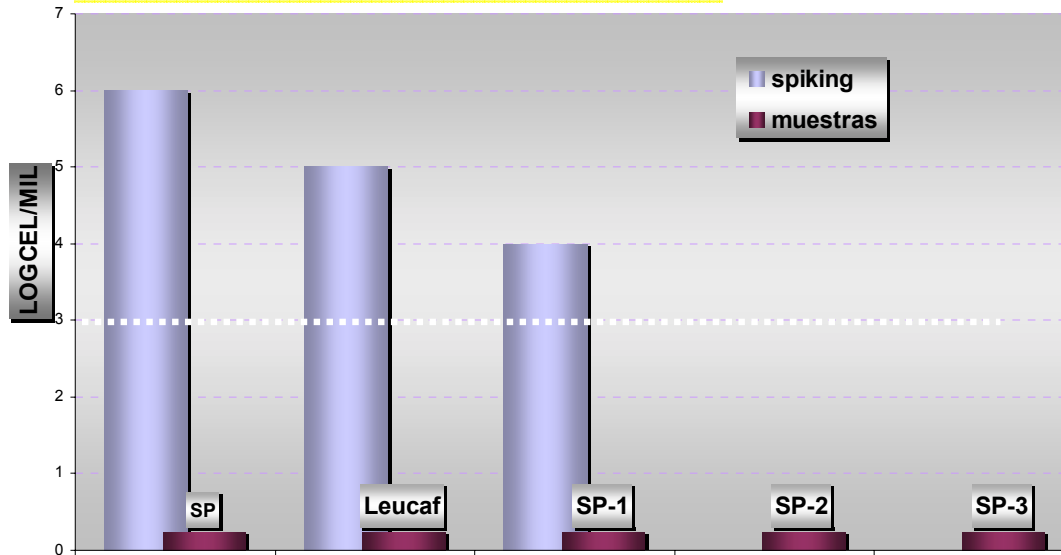
Se inicia tratamiento quimioterápico. Las muestras de sp al mes (sp1) y a los 7 meses (sp2) fueron negativas. El paciente finalizó el tratamiento QMT, incluyendo intensificación con TASPE. A los 11 meses, coincidiendo con la recaída clínica, se obtuvo la muestra sp3 y mo2 que fueron ambas positivas. El paciente falleció al poco después por progresión de la enfermedad.

EMR PACIENTE 9 Ews-Erg



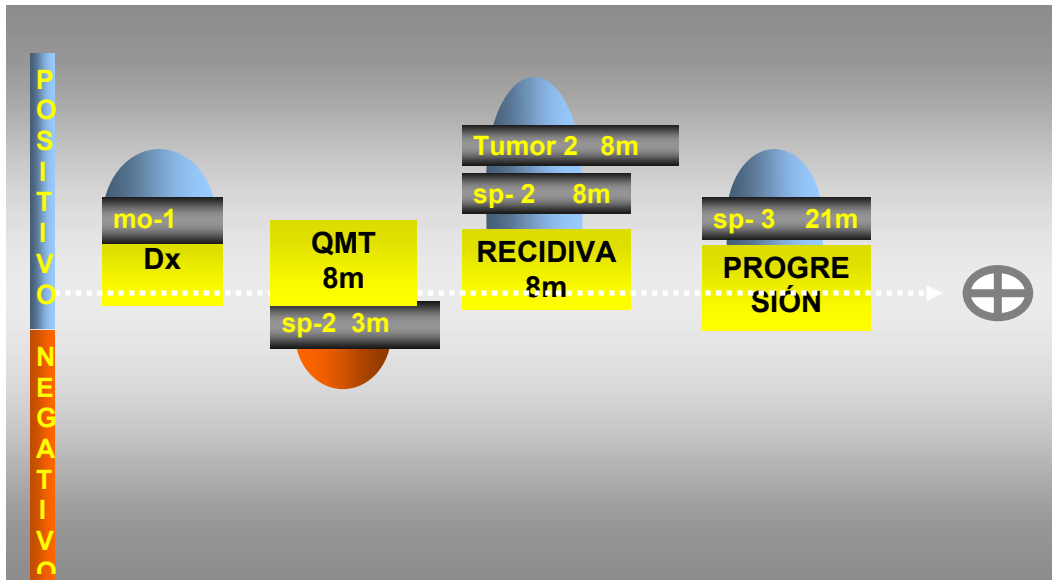
En la **paciente 9**, la primera muestra obtenida fue el producto de leucaféresis, que fue negativa. A los 14 meses de finalizar el tratamiento, se le realizó biopsia de tumoración mandibular dolorosa. En ella se detectó el producto de fusión EWS-ERG tipo III, diagnosticándose por tanto la primera recidiva. En las muestras de sp y mo no se expresó ningún producto de fusión. Se reinició tratamiento quimioterápico. Las muestras de sangre periférica después de 5 y 6 meses de este nuevo ciclo de tratamiento (sp-2 y sp-3) fueron consecutivamente negativas. Se realizó tratamiento local con radioterapia. Ante la persistencia de tumor residual se realiza resección tumoral (Tumor 2) que mostró de nuevo el producto de fusión EWS-ERG. Se obtiene una muestra de los márgenes tumorales (Tumor 3), que no presentaba enfermedad. A los 24 meses presenta la tercera recidiva local. La muestra de sp a los 26 meses (sp-4) fue positiva. La paciente falleció 2 meses después por progresión de la enfermedad.

EMR PACIENTE 9 Ews-Erg

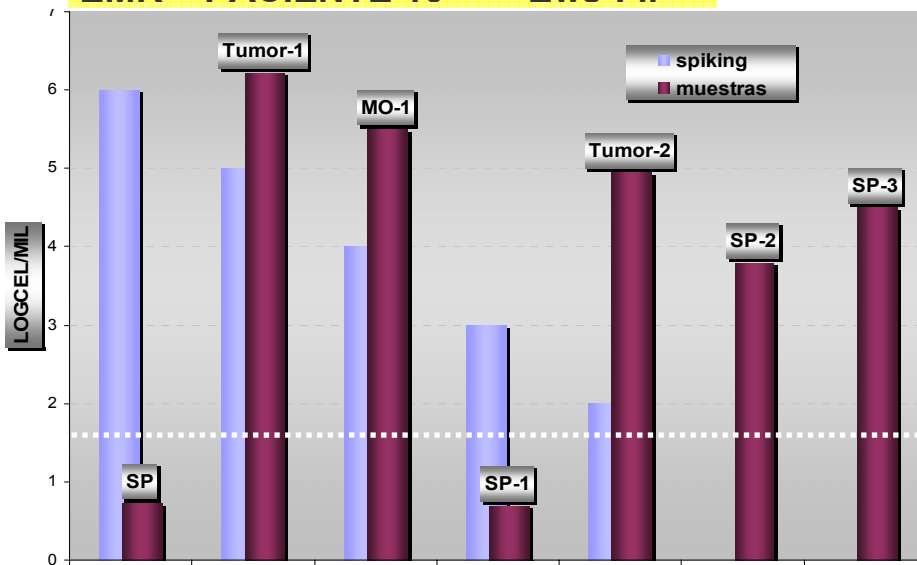


En el análisis mediante PCR cuantitativa para la expresión de EWS-ERG, todas las muestras de sp/mo, resultaron negativas debido a la baja sensibilidad de la técnica. Sólo se obtuvieron valores positivos en las muestras *spiking* con cargas tumorales entre 10^5 y 10^7 células tumorales en 10^7 cel. normales. Es decir, solos las muestras tumorales fueron positivas.

EMR PACIENTE 10 Ews-Fli



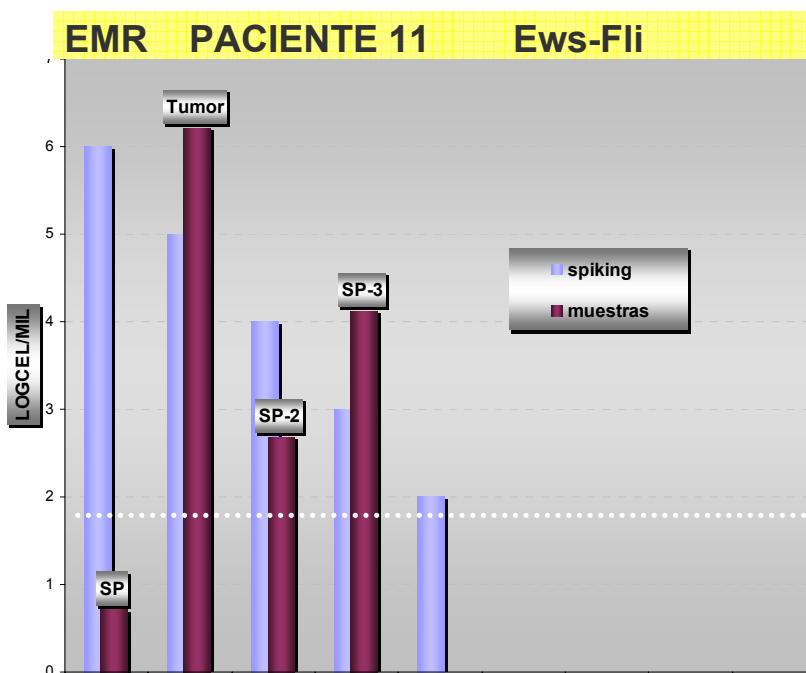
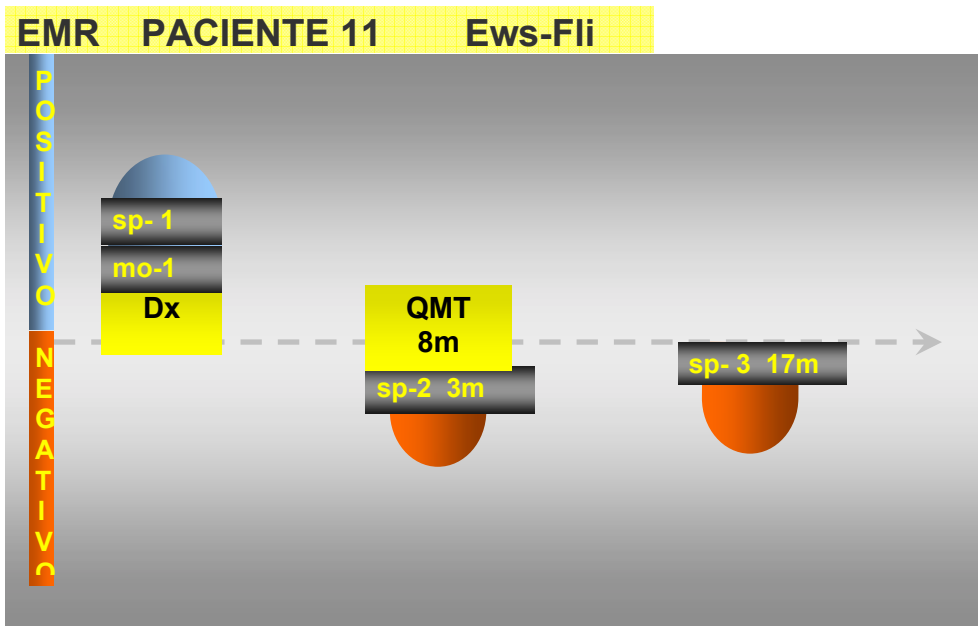
EMR PACIENTE 10 Ews-Fli



El **paciente 10**, presentaba al diagnóstico la expresión de EWS-Fli1 tipo 1 en la muestra tumoral y en la muestra mo-1.

Se inicia tratamiento quimioterápico. La muestra de sp a los tres meses (sp1) fue negativa. A los 8 meses, coincidiendo con una recaída clínica se realiza exéresis parcial de tumoración abdominal que muestra la expresión del producto de fusión Ews-Fli1. La sp en ese momento (sp2), fue también positiva. El paciente recibió nuevamente tratamiento quimioterápico. Se mantuvo con tumor residual irsecable aparentemente estable, hasta los 21 meses del diagnóstico, en el que se detecta progresión de la enfermedad. La sp en ese momento (sp3) fue otra vez positiva. El paciente falleció por progresión de la enfermedad.

En el análisis cuantitativo de las muestras se presentó concordancia absoluta en todas las muestras testadas.



El **paciente 11**, presentaba al diagnóstico la expresión de EWS-Fli1 tipo 1 en la muestra tumoral y en la muestra mo-1 y sp1.

Se inicia tratamiento quimioterápico. La muestra de sp a los tres meses (sp2) fue negativa mediante PCR convencional, y en cambio positiva en la PCR cuantitativa ($10 \cdot 10^2$ cel / 10^7). El paciente finalizó el tratamiento. La sp a los 17m (sp3) fue negativa mediante la PCR cualitativa y discordantemente positiva en la PCR cuantitativa, con una carga tumoral de 10^3 cel / 10^7 .

El paciente se encuentra actualmente en remisión completa a los 36 m.

3.2.3- RESUMEN DE LA DETECCIÓN DE EMR MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL / PCR ANIDADA EN LOS PACIENTES AFECTOS DE S EWING

Pt ID	Diagnóstico		Tratamiento		Fin Tratamiento		+6m	+12m	+18m	+24.....	EVOLUCIÓN (fecha del evento)	
	SP1	MO1	SP2	MO2	SP3	MO3	LEUCAF	SP4	SP5	SP6		SP7
1	+	+	+	ND	+	ND	+	+	+			REC (13m) M (28m)
2	-	-	ND	-	-	ND	-	-	+	+		REC (22m) M (23 m)
3	+	+	+	+	-	ND	+	-	-	+		RC (48m)
4	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+		REC (32 m) M (33 m)
5	+	+	+	ND	+	ND	ND	+	-			Progresión (9 m)
6	+	+	-	ND	+	ND	ND	+				RC (60m)
7	+	+	+	ND	ND	+	ND	ND	+			Progresión (14m)
8	+	+	-	ND	-	ND	ND	+	+			Progresión (16m)
9	-	-	-	ND	-	-	-	+				REC (12m) M (14m)
10	+	+	+	ND	+	ND	ND	+				REC (8m) M (24 m)
11	+	+	-	ND	-	-	ND	+				RC (56m)
12	-	-	ND	ND	-	-		-				RC (12m)

Fig. 39. Las filas en negrita corresponden a los pacientes con la fusión EWS-ERG. Debido a la baja sensibilidad de la PCR en tiempo real todas las muestras sp/mo fueron negativas con esta técnica. En estos pacientes los resultados corresponden a PCR anidada.

La columna de la derecha se resume la evolución.

Para el seguimiento de la enfermedad microcirculante, se obtuvieron cincuenta y una muestras de sangre periférica de los pacientes al diagnóstico y a intervalos diferentes durante y después del tratamiento. En la tabla anterior, se resumen los resultados. En el momento del diagnóstico, se detectó enfermedad

microcirculante en 8 pacientes (62%). De ellos, siete presentaban fases muy avanzadas de la enfermedad (enfermedad metastásica). Aunque este análisis no pretende determinar la frecuencia de la enfermedad microcirculante en los pacientes con SE, nuestros datos coinciden con los descritos para otros tumores sólidos como el Neuroblastoma (Burchill et al. 2001) y el Rbdomiosarcoma (Thomson et al).⁶⁹⁻⁷¹.

Cinco de los 8 pacientes (62%) con sp positiva al **diagnóstico** presentaron una evolución desfavorable (recaída/éxitus). Asimismo, 2 de los 4 pacientes con sp negativa al **diagnóstico** (50%) recayeron.

De los 5 pacientes que tuvieron sp al **final de tratamiento** positiva, 4 (80%) presentaron recaídas metastásicas y muerte por progresión de la enfermedad. Seis pacientes tuvieron sp al **final de tratamiento** negativa, y dos de ellos fallecieron por progresión de la enfermedad.

Durante el **seguimiento**, tres pacientes presentaron enfermedad circulante persistentemente positiva y todos ellos fallecieron por progresión de la enfermedad.

Durante el **seguimiento**, 10 de los 12 pacientes tenían sp positivas y siete de ellos presentaron recaídas y murieron por progresión de la enfermedad, y los tres restantes siguen en remisión completa. Curiosamente estos tres pacientes, las últimas sp obtenidas durante el seguimiento fueron negativas mediante RT-PCR cualitativa, siendo esta disparidad explicable por la mayor sensibilidad de la PCR en tiempo real (aumente un logaritmo el umbral de detección).

La enfermedad microcirculante se detectó en la mayoría de ellos 3 meses antes de la recaída.

En médula ósea, encontramos enfermedad micrometastásica al diagnóstico, en 9 pacientes (75%). De todos ellos, ninguno de ellos tenía metástasis evidentes a nivel citológico. Un 66% de los pacientes del grupo de pacientes con **mo** positiva, fallecieron y los tres restantes presentaron enfermedad microcirculante persistente (por PCR cuantitativa) durante parte del seguimiento, aunque, hasta la fecha no se ha traducido en una recaída clínica. De los tres pacientes con **mo** negativa al diagnóstico, dos están en remisión y el tercero murió por progresión de la enfermedad.

4- RABDOMIOSARCOMA

4.1- ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ACETIL COLINA EN EL RABDOMIOSARCOMA MEDIANTE DENSITOMETRIA COMPARATIVA Y MULTIPLEX PCR.

En el análisis de la expresión de las subunidades alfa y gamma del receptor de acetilcolina (RACH), se analizaron 22 muestras de rabdomiosarcomas (alveolares y embrionarios) y como controles: *pool* de muestras de músculo fetal (MF) y de músculo adulto (MA). Tal como se visualiza el gráfico siguiente:

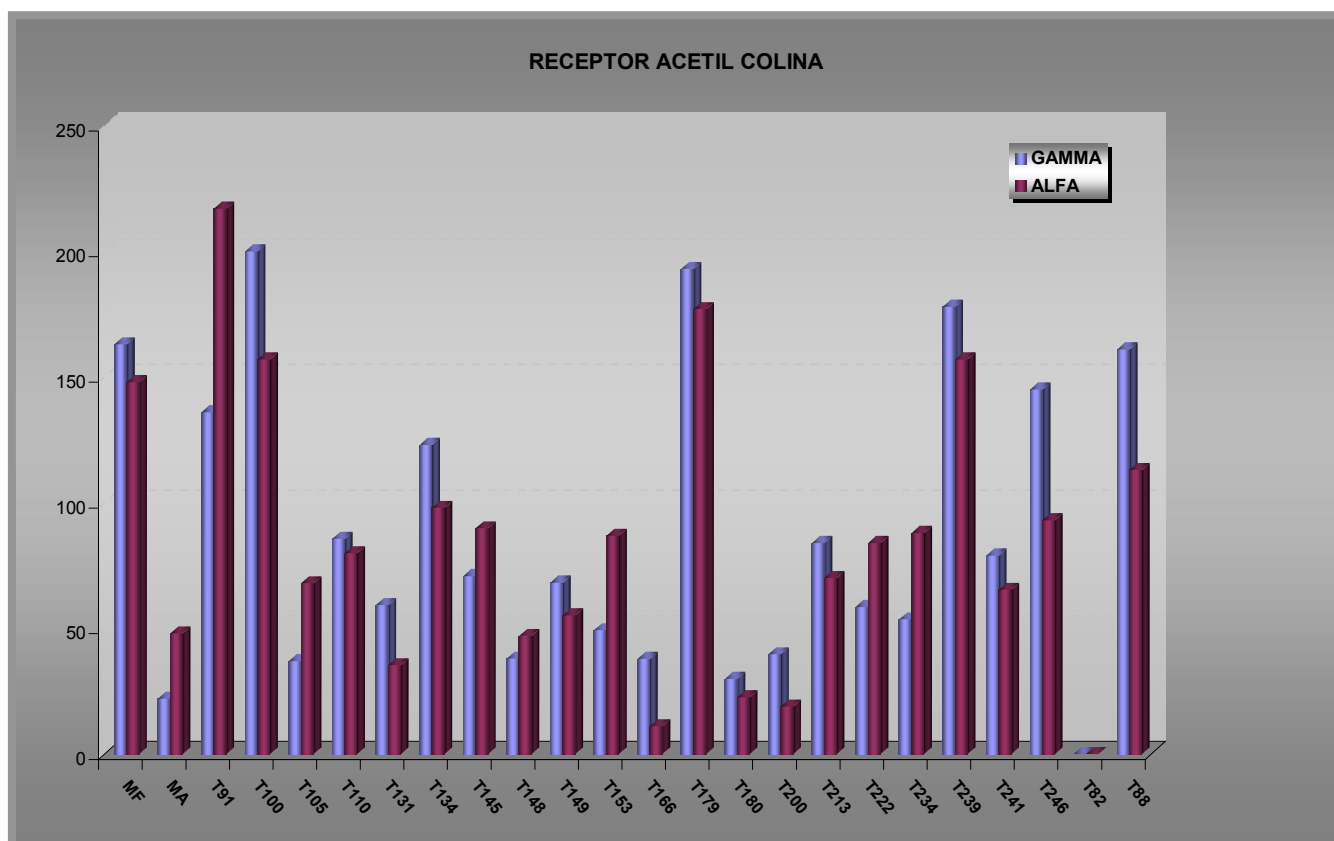


Fig 40, Expresión del RACH en RMS mediante PCR cualitativa (cuantificación relativa mediante densitometría)

Catorce RMS de 22 (63.6%) expresaban más gamma que alfa, es decir tenían una ratio $A/G < 1$. En el resto de muestras la expresión de gamma era algo inferior a alfa, por lo tanto la ratio obtenida de estas muestras era > 1 . Tan solo una muestra no expresó ninguno de las dos subunidades (T82). (Figura 40)

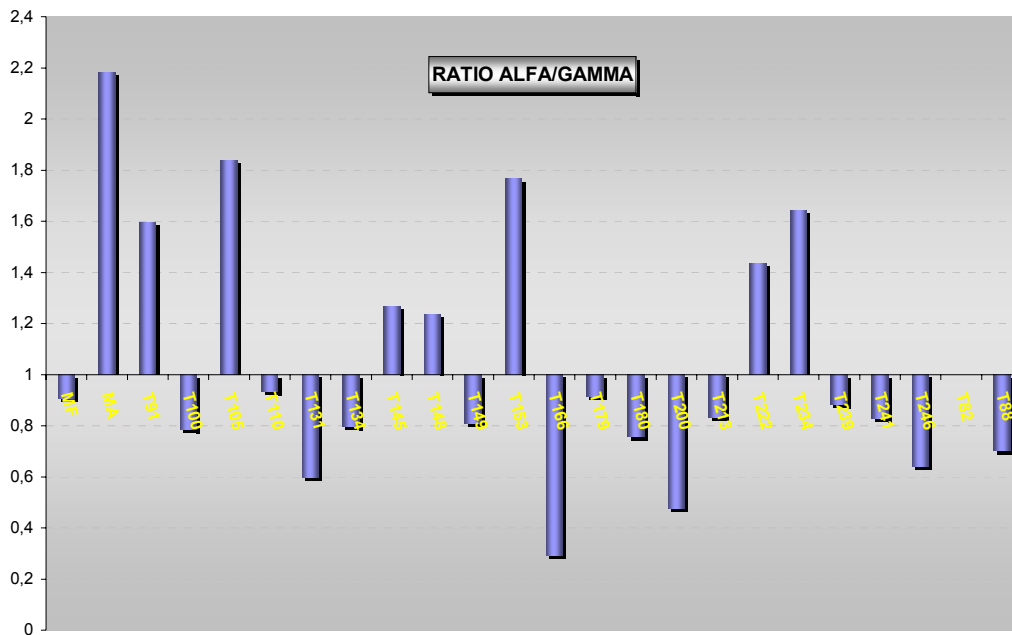


Fig 41, Ratio de RCh Alfa y el RCh Gamma en RMS

En el caso de otros tumores no-RMS, el resultado no fue el esperado atendiendo a lo descrito por Gattenlöhner S.³⁷⁻³⁸ Es decir, de los 13 tumores no RMS, de los cuales 5 eran Neuroblastomas y 8 eran S.Ewing, 10 de los 13 (76.9%) expresaban más gamma que alfa (ratio $\alpha/\gamma < 1$). Las 3 muestras restantes no expresaron ninguna de las 2 subunidades. (Fig. 41). Es decir, todos los tumores que mostraban expresión del RCh, expresaban con más intensidad la subunidad γ . Esto difiere completamente con la teoría planteada por Gattenlöhner S, donde se defendía como altamente específico de RMS, una ratio $\alpha/\gamma < 1$. Nosotros no asentimos en el valor de la ratio, pero si en la utilidad de la utilización de estos marcadores en la EMR de los RMS, y especialmente en los embrionarios, dado que para el seguimiento de un paciente individualmente el RCh, resulta muy útil porque no se expresa en la sp de niños sanos.

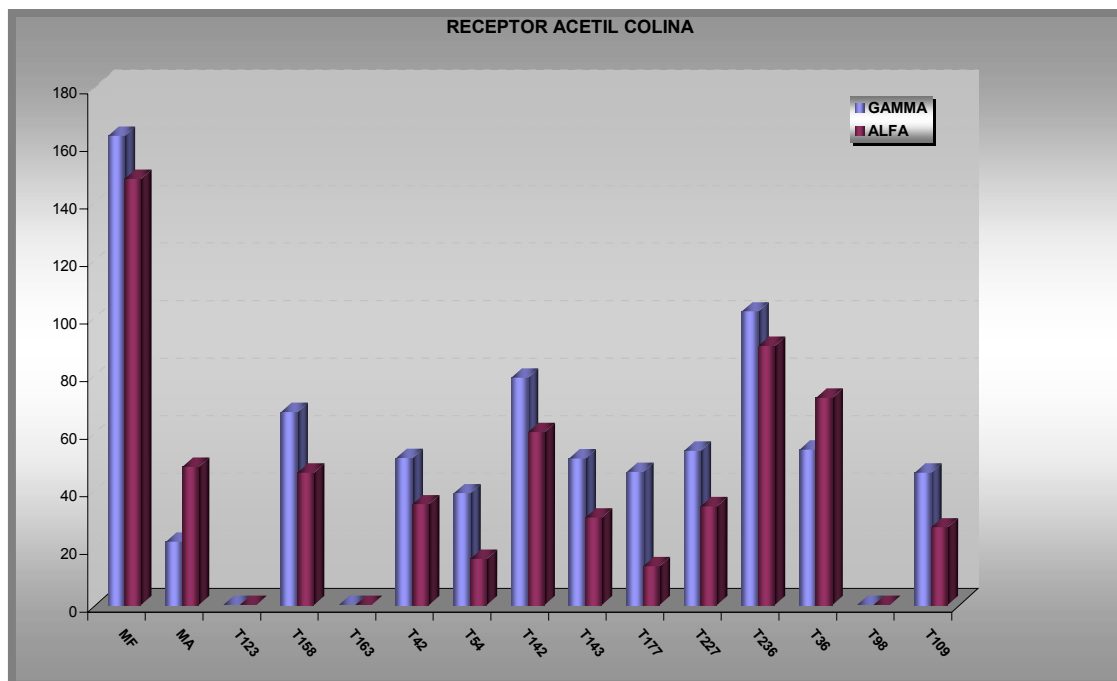


Fig 42. Expresión del RACH Gamma y alfa tumores no-RMS

No fue posible realizar el seguimiento de la EMR mediante Multiplex PCR (cualitativa), debido a la escasa sensibilidad del procedimiento. Al realizar una PCR anidada, para la subunidad gamma, del producto obtenido en la primera reacción (multiplex), TODAS las muestras resultaban positivas, perdiendo por tanto la especificidad.

4.2- MONITORIZACIÓN DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL EN RABDOMIOSARCOMA.

4.2.1-CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

Las características clínicas de los pacientes están detalladas en la tabla siguiente. Los pacientes eran 10 niños y 6 niñas con edades comprendidas entre 7 meses y 15 años (media 6 años). Catorce pacientes tenían tumores clasificados en Grupo III y dos en el grupo IV. Histológicamente, 7 eran alveolares y 9 eran embrionarios. Los RMS alveolares expresaban productos de fusión (3 PAX3-FKHR y 4 PAX7-FKHR)

Siete se localizaban en la región genitourinaria, 3 en la zona cabeza-cuello, 2 en extremidades y 4 en otras zonas. La media de seguimiento fue de 44 meses (rango: 11-108). Durante todo ese tiempo todos los pacientes finalizaron el tratamiento. Durante el periodo de seguimiento 6 pacientes presentaron recaídas metastásicas con o sin recaídas locales. Todos ellos murieron por progresión de la enfermedad. Tres pacientes presentaron una recaída local y actualmente están en remisión completa, después de un tratamiento de segunda línea.

Pt ID n.	Edad (diagnóstico)	Sexo	Histología	Fusión	Grupo (IRS)	Localización
1	11m	M	aRMS	PAX7	IV (MO,Hueso)	Próstata
2	14a	M	aRMS	PAX3	IV (MO,Pulmón)	Cabeza y cuello (NPM)
3	8a	M	aRMS	PAX7	III	Brazo
4	8a	F	aRMS	PAX7	III	Brazo
5	15a	F	aRMS	PAX3	III	Pelvis
6	6a	F	aRMS	PAX3	III	Pared costal
7	5a	M	aRMS	PAX7	III	Cabeza y cuello (NPM)
8	5a	M	eRMS	-	III	Próstata
9	3a	M	eRMS	-	III	Hígado
10	2a	M	eRMS	-	III	Vejiga
11	7m	F	eRMS	-	III	Vagina
12	6a	M	eRMS	-	III	Vejiga
13	5a	M	eRMS	-	III	Próstata
14	9a	M	eRMS	-	III	Orbita
15	7a	F	eRMS	-	III	Vejiga
16	3a	F	eRMS	-	III	Cabeza y cuello (NPM)

Fig.43. Tabla resumen de las características clínico patológicas de los pacientes, en los que se ha hecho la monitorización de la enfermedad mínima residual.

4.2.2- DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE FUSIÓN PAX3-FKHR, PAX7-FKHR, RECEPTOR DE ACETIL COLINA (subunidades alfa y gamma) Y MYOD-1 EN SP/MO/LEUCAF

Se analizaron las muestras tumorales de los rhabdomiosarcomas alveolares, mediante RT-PCR, para determinar el tipo de fusión específico de cada muestra de tumor.

En la figura 44 se muestra un ejemplo de varios tumores, expresando los dos tipos de fusión:

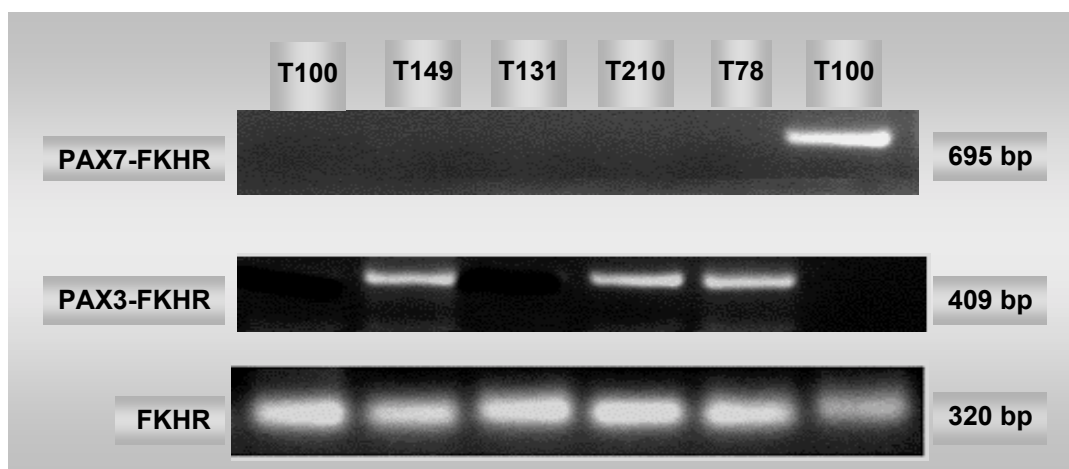


Fig.44. Gel de agarosa varios tumores RMSa expresando PAX3-FKHR o PAX7-FKHR. La muestra T131, corresponde a un RMS embrionario. No expresa ningún tipo de fusión.

Además, las muestras, se analizaron individualmente para cada uno de los pacientes, mediante PCR anidada. El paciente nº16 se resume en la figura 45:

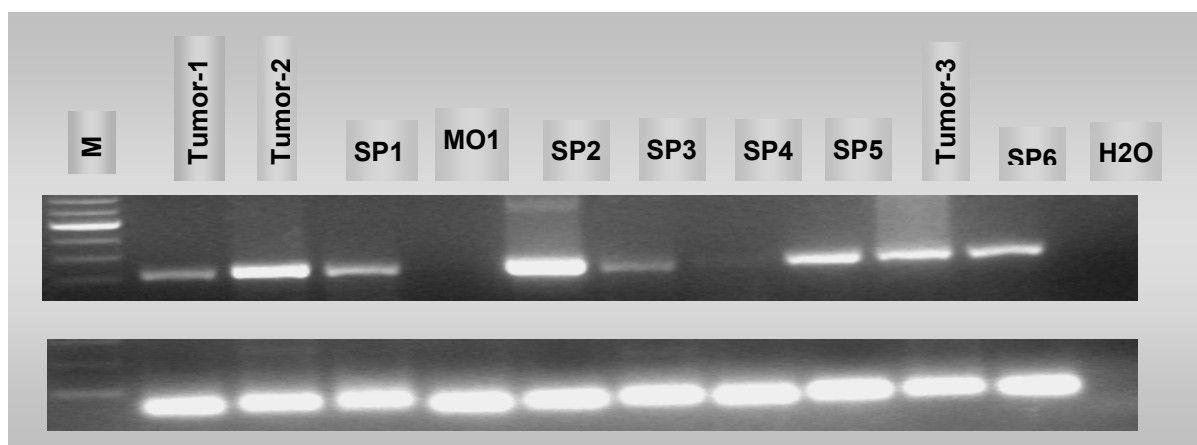
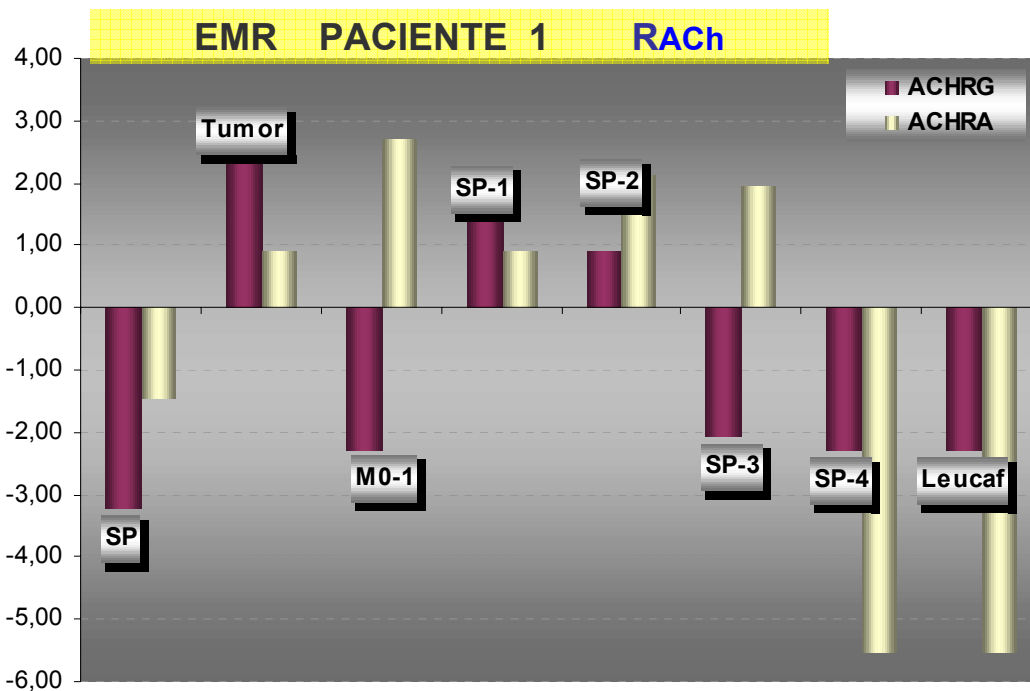
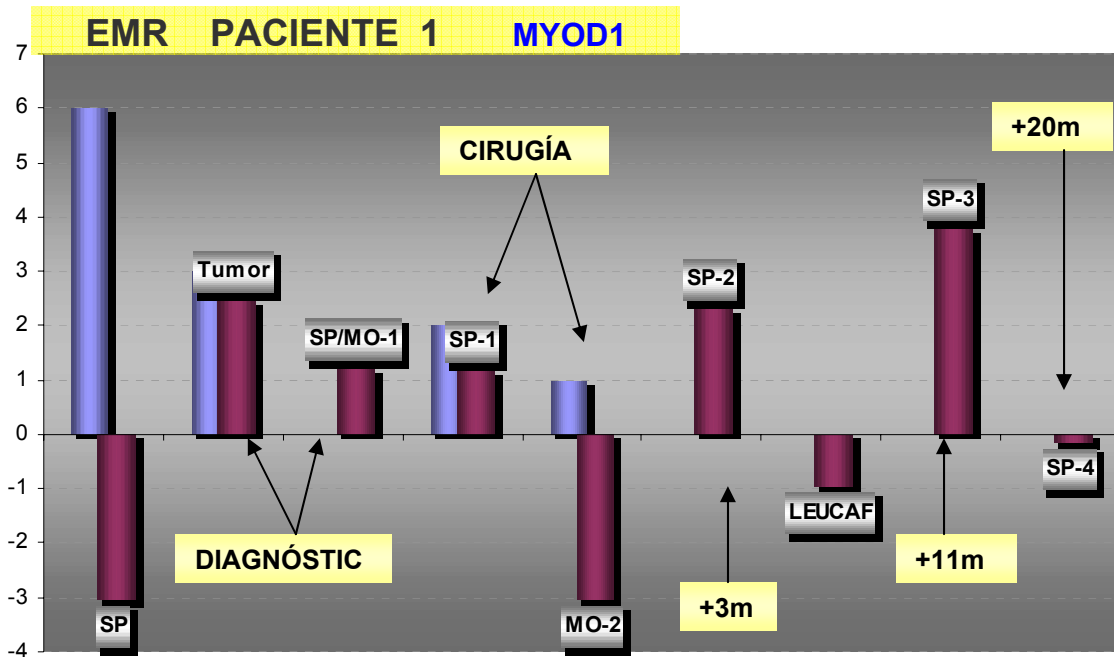


Fig 45. Gel de agarosa con un ejemplo de seguimiento de paciente afecto de RMSa metastásico. Fusión PAX3-FKHR, mediante PCR anidada.

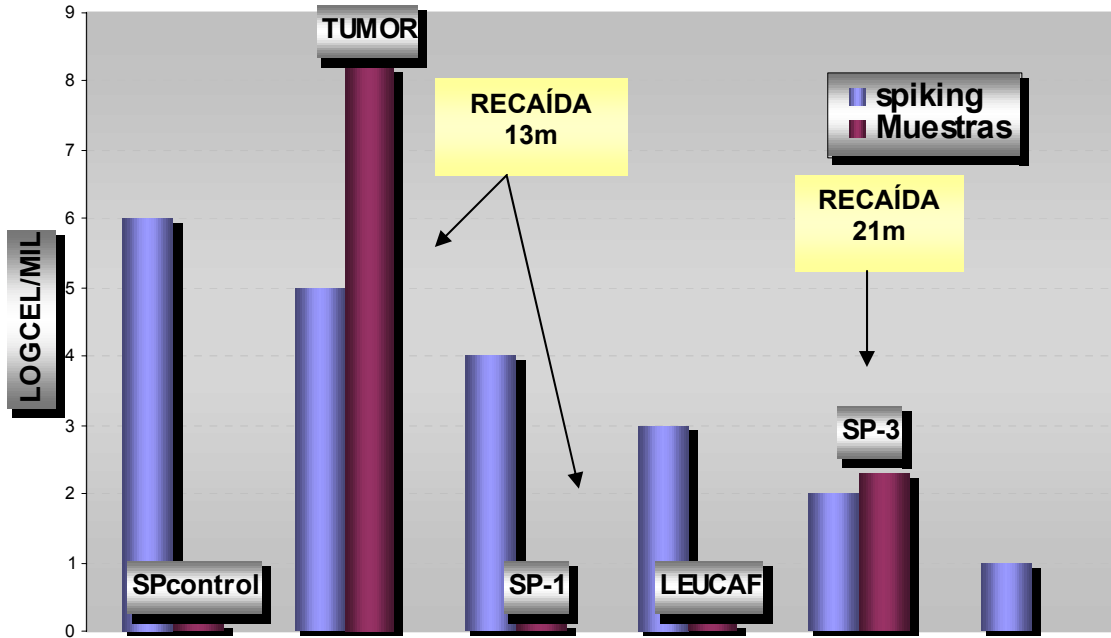
GRÁFICAS INDIVIDUALIZADAS POR PACIENTES:



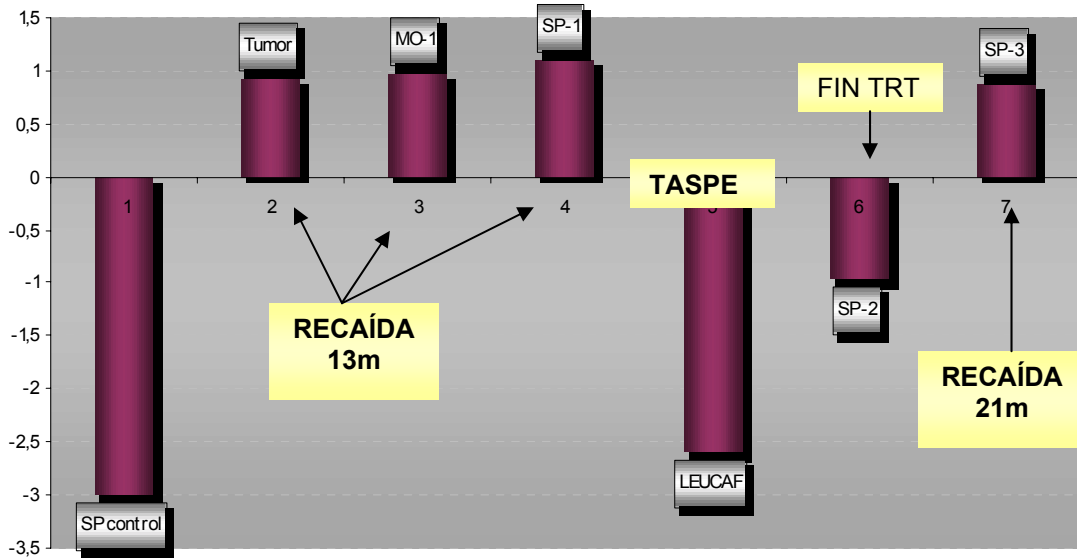
El **paciente 1**, presentaba un RMS alveolar diseminado (con metástasis en mo y hueso). Expresaba el producto de fusión PAX7-FKHR. Las muestras de sp y mo obtenidas al diagnóstico fueron positivas para MYOD1 y negativas para RACH. Se inició tratamiento quimioterápico. A los 3 meses se realizó resección de tumor residual. Las muestra sp de ese momento (sp1) fue positiva para ambos marcadores (MYOD1 y RACH), y la mo-2 fue negativa para MYOD1.

Tres meses después la sp persistía positiva para ambos marcadores. Se realizó consolidación con TASPE, siendo ésta muestra negativa. Una vez finalizado el tratamiento, a los 11m, la sp (sp3) persistía positiva para MYOD1 y en cambio ya era negativa para RACH. A los 20m, sp4 fue negativa para MYOD1 y RACH. El paciente se encuentra en remisión completa a los 30 m de seguimiento.

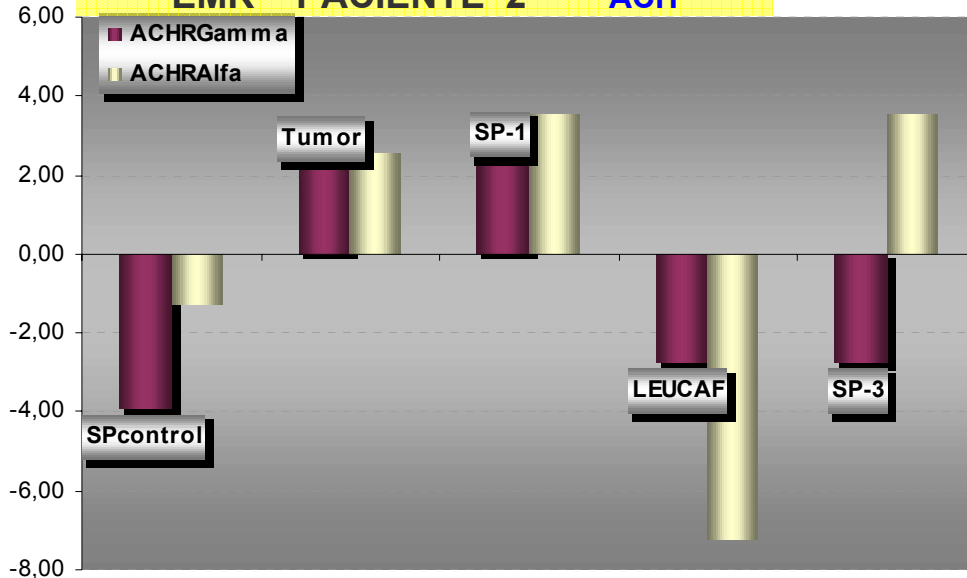
EMR PACIENTE 2 Pax3-Fkhr



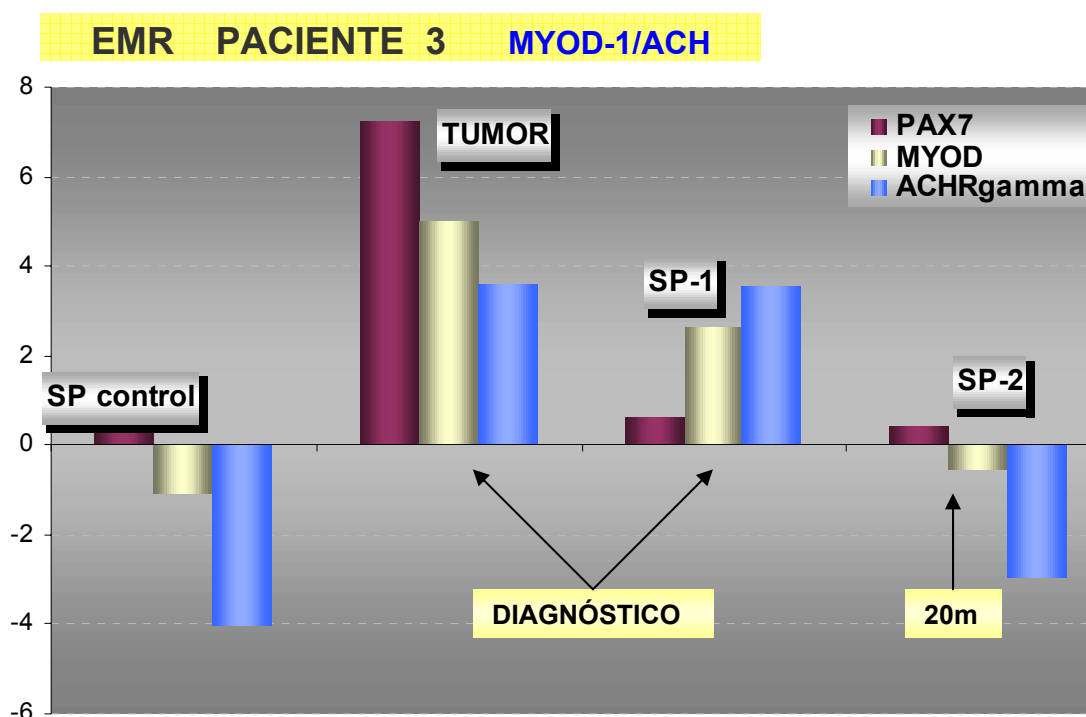
EMR PACIENTE 2 MYOD1



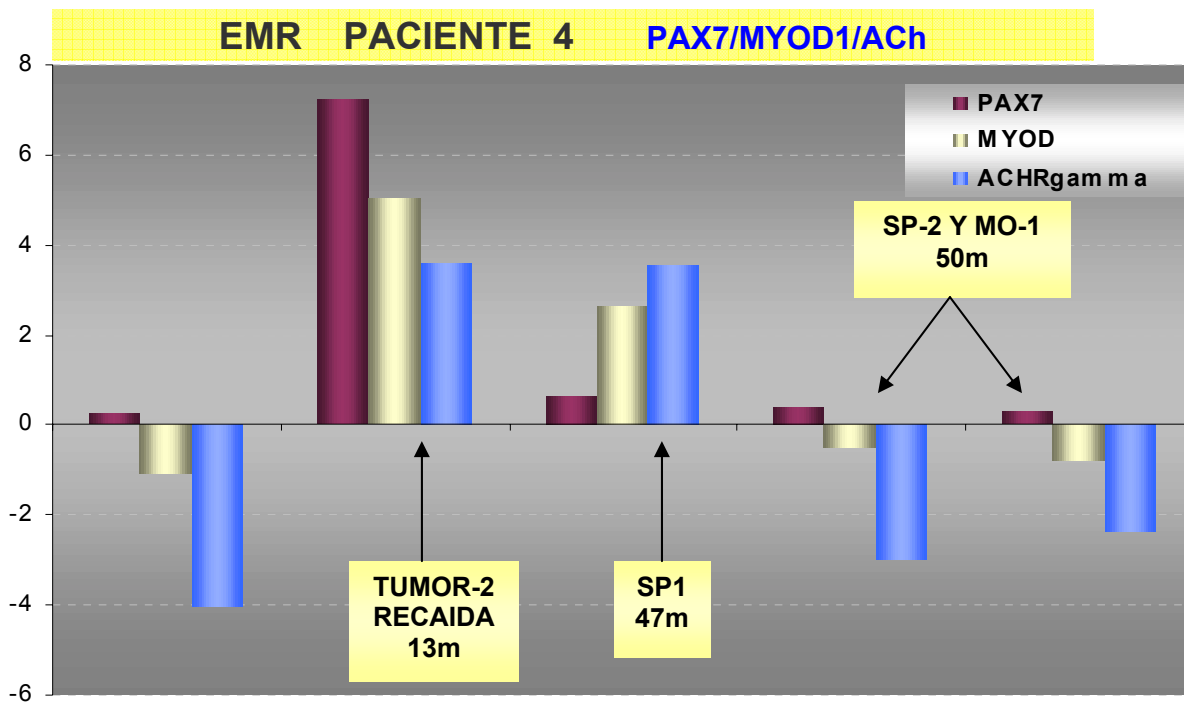
EMR PACIENTE 2 ACH



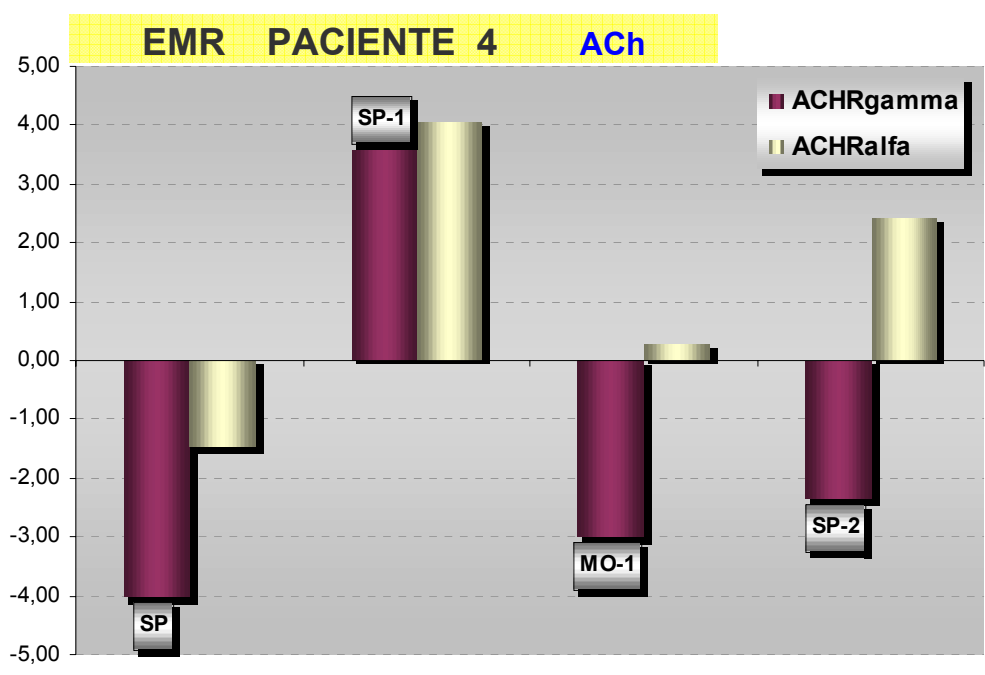
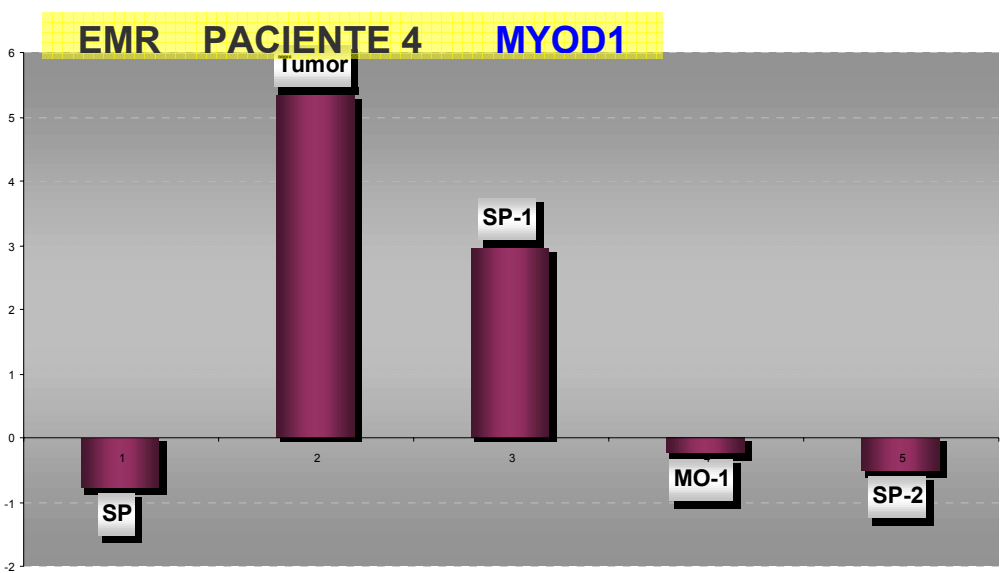
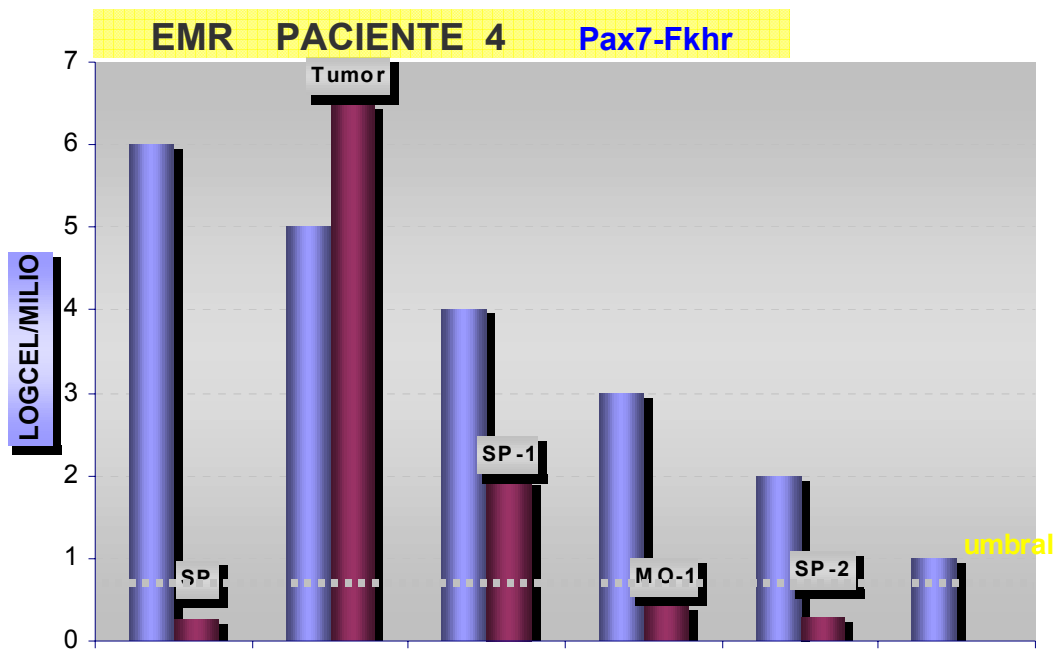
El **paciente 2**, presentaba un RMS alveolar parameningeo estadio IV (metástasis pulmonares y en mo, por citología). El producto de fusión que expresaba el tumor era Pax3-FKHR. A los 13 m se produjo la 1ª recaída clínica. La muestra de sp en ese momento, (sp-1), fue negativa para Pax3-FKHR, y en cambio fue positiva para MYOD1 y RACH. El paciente siguió tratamiento con quimioterapia incluyendo consolidación con TASPE y radioterapia. La muestra de Leucaféresis fue negativa para los tres marcadores (PAX3-FKHR, MYOD1 y RACH). Dieciocho meses después, una vez finalizado éste, la sangre periférica testada (sp2), fue negativa. A los 24 meses, coincidiendo con una recaída metastásica, la muestra de sp (sp3) fue positiva para PaX3-FKHR y MYOD1, y negativa para RACH. El paciente falleció al poco tiempo por progresión de la enfermedad.

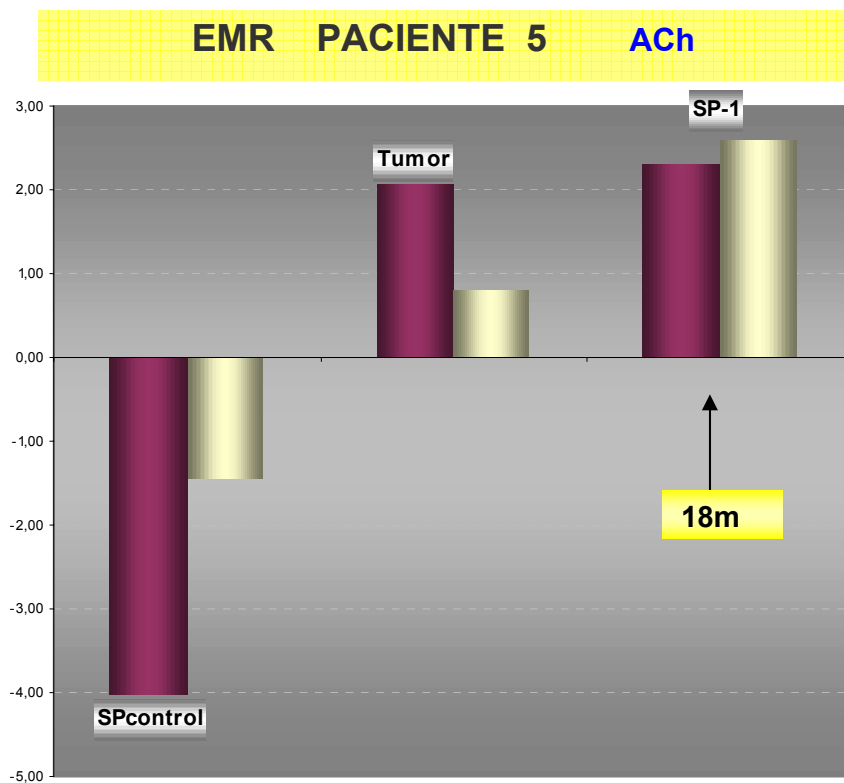
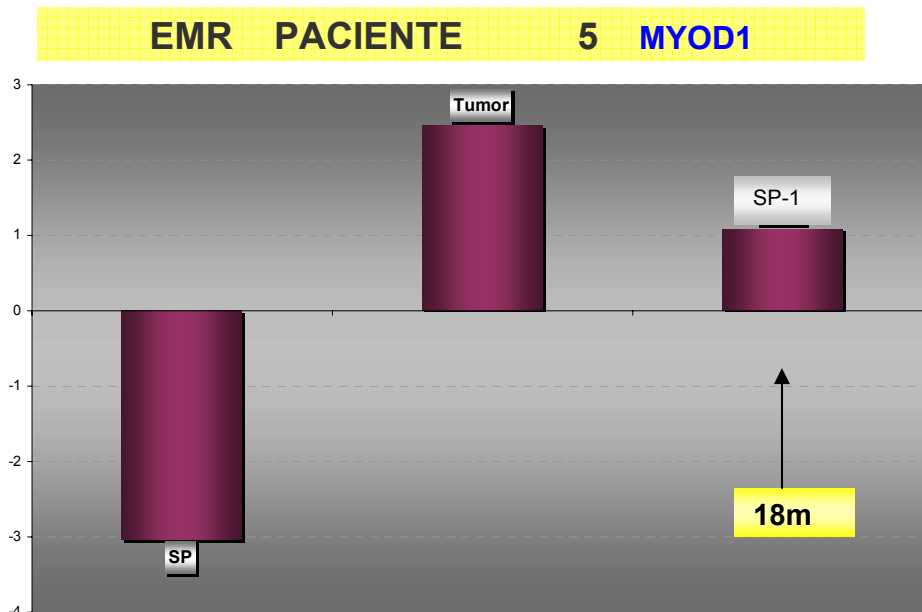


El **paciente 3**, presentaba un RMS alveolar localizado, con el producto de fusión PAX7-FKHR. La muestra de sp obtenida al diagnóstico fue positiva para MYOD1 y RACH. La sp2 obtenida a los 20 meses fue negativa. Después del tratamiento el paciente se encuentra en remisión completa a los 30m de seguimiento.

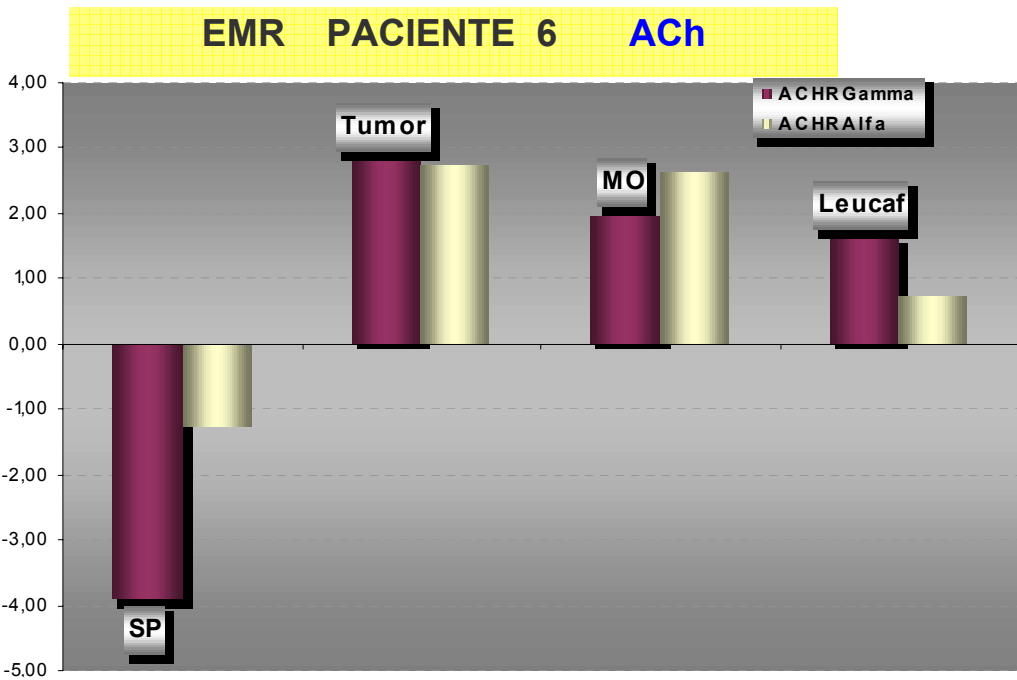
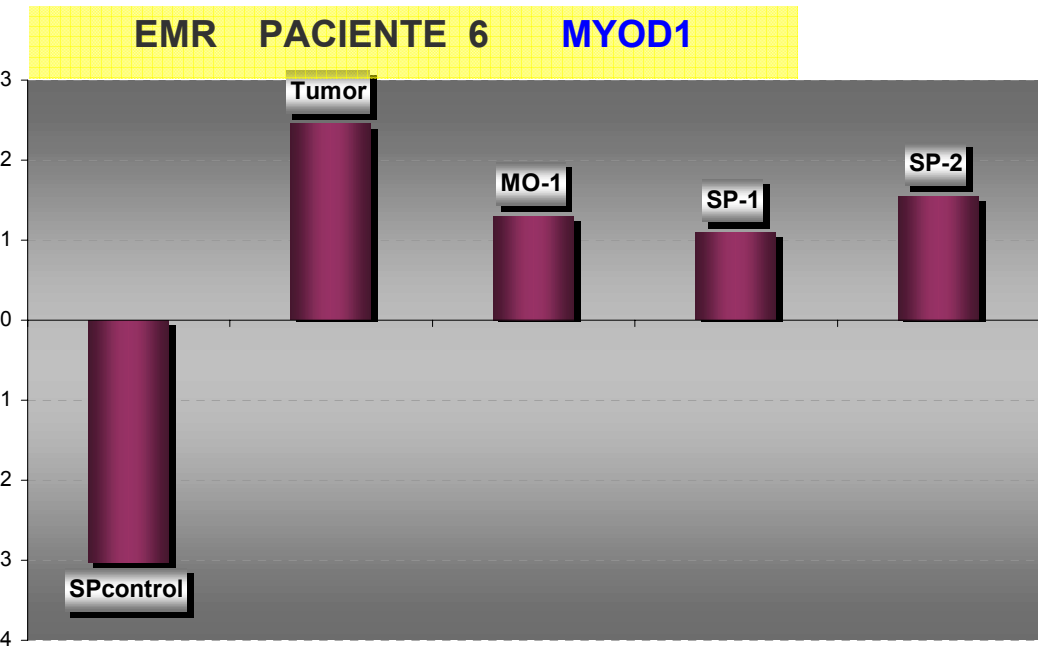
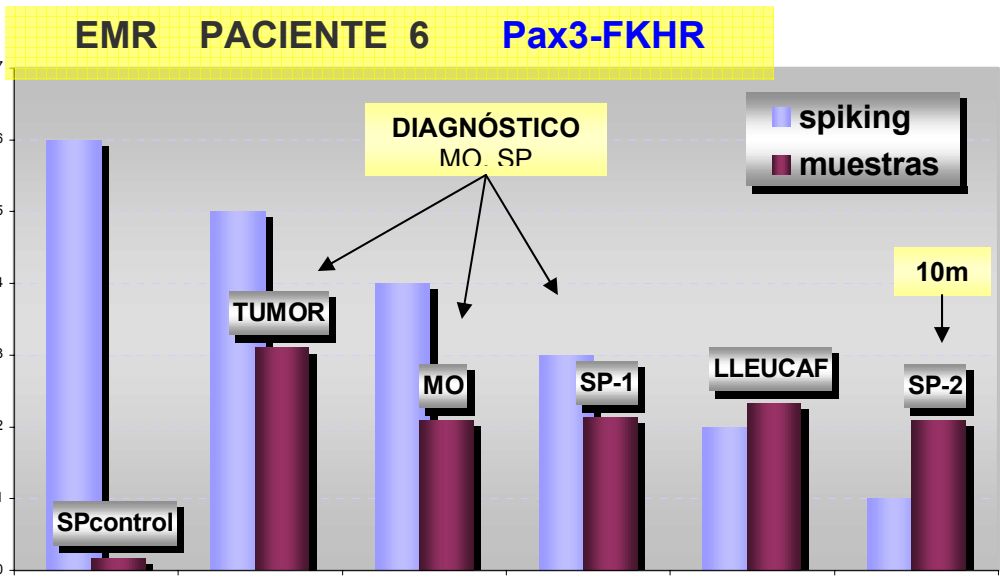


La **paciente 4**, presentaba un RMS alveolar localizado, con el producto de fusión PAX3-FKHR. Después del tratamiento quimioterápico y radioterápico, la paciente sufrió una recaída local (Tumor-2, 13m). La primera muestra de sangre periférica obtenida, fue 36m después de la recaída (sp1). Dicha muestra fue sorprendentemente positiva para los tres marcadores (PAX3-FKHR, MYOD1 y RACH), dado que la paciente permanecía en remisión completa de larga evolución. Tres meses después, las muestras SP-2 y Mo-1 fueron ambas concordantemente negativas para los tres marcadores. La paciente se encuentra en remisión completa a los 91 m de seguimiento.

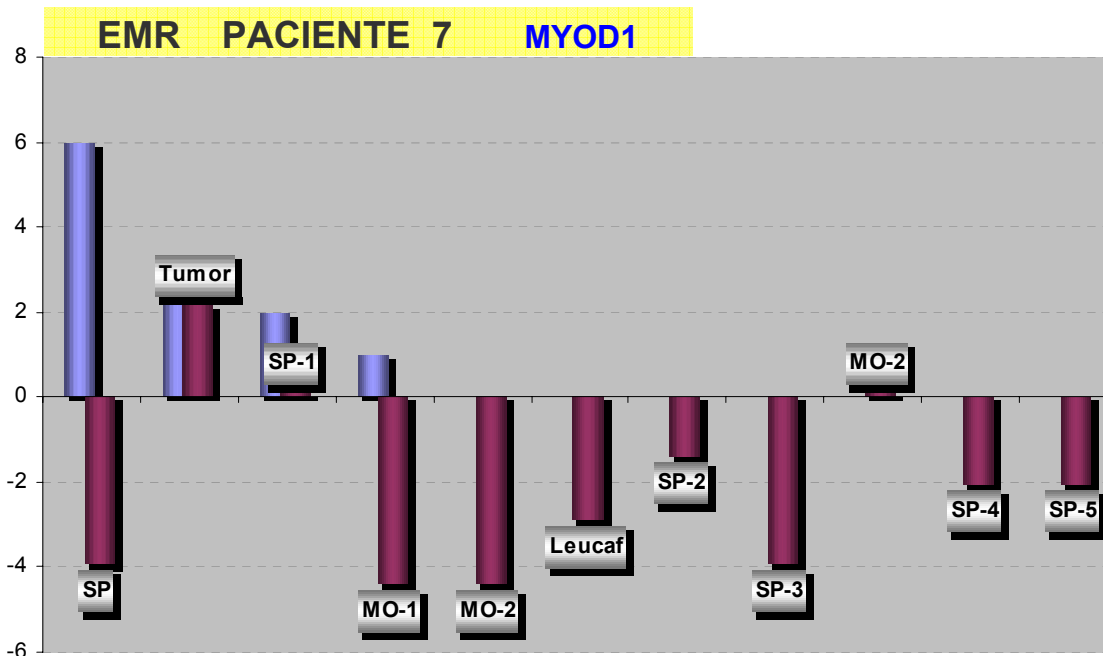
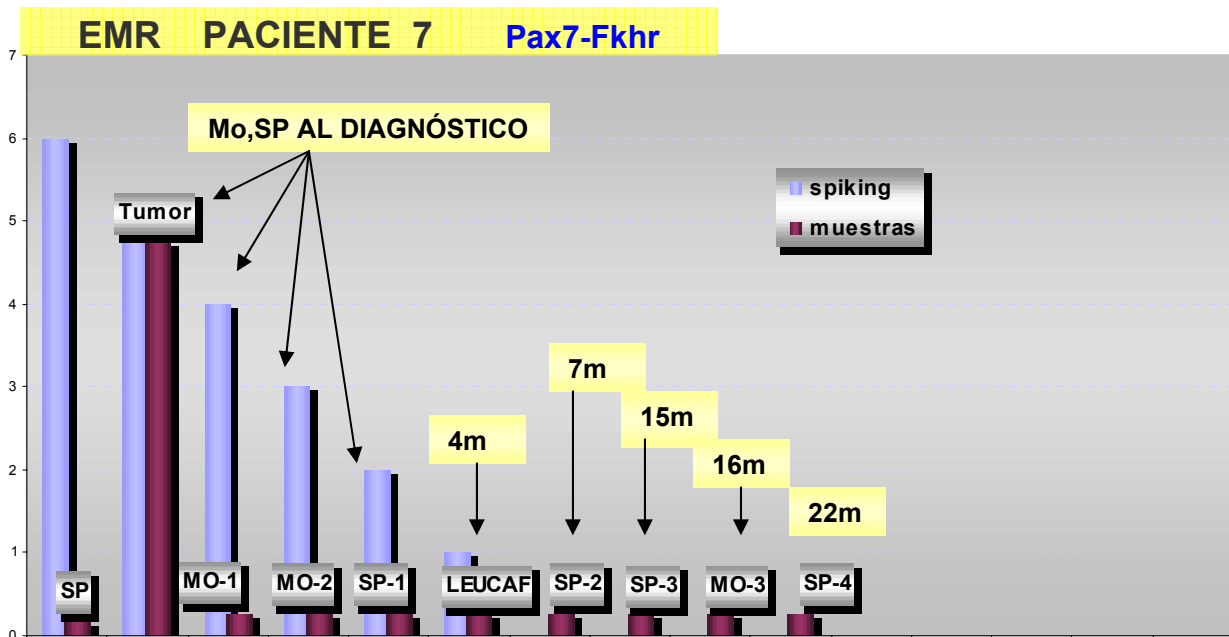




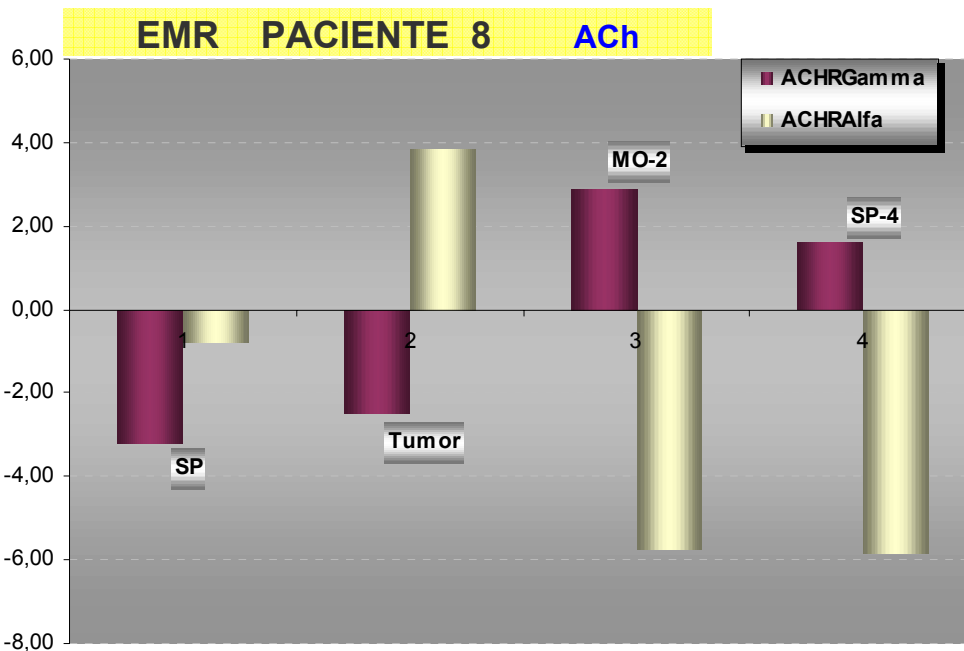
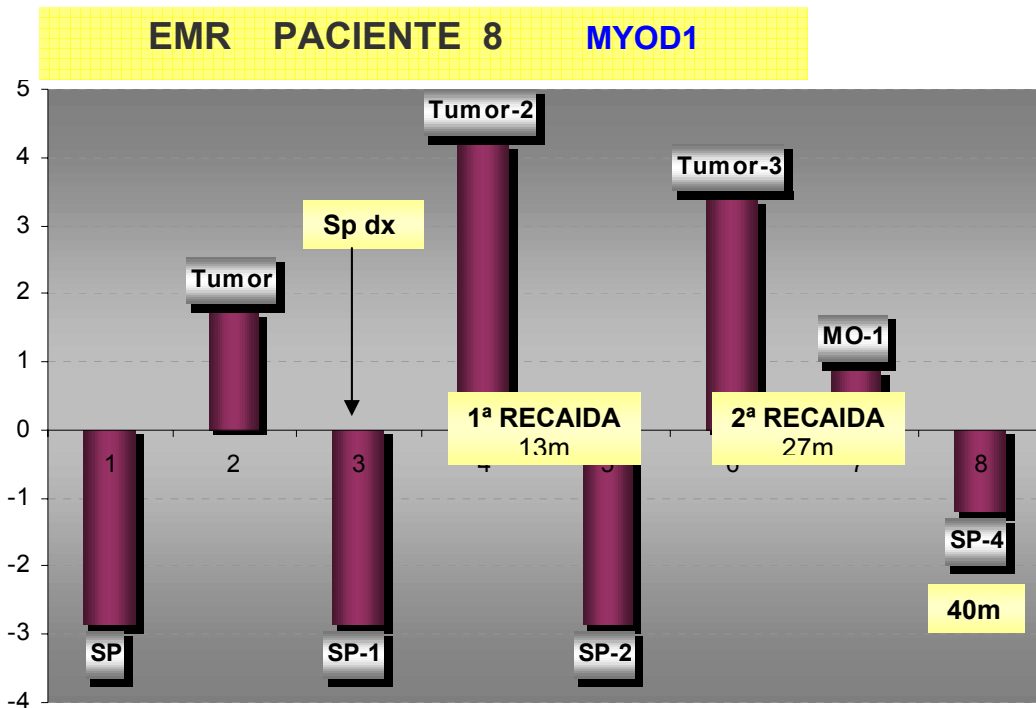
La **paciente 5**, presentaba un RMS embrionario parameningeo. La muestra obtenida durante el seguimiento corresponde a una sangre periférica obtenida al fin del tratamiento. Ésta, fue positiva en el análisis cuantitativo de MYOD1 y RACH. Actualmente la paciente se encuentra en remisión completa después de 84 meses de seguimiento.



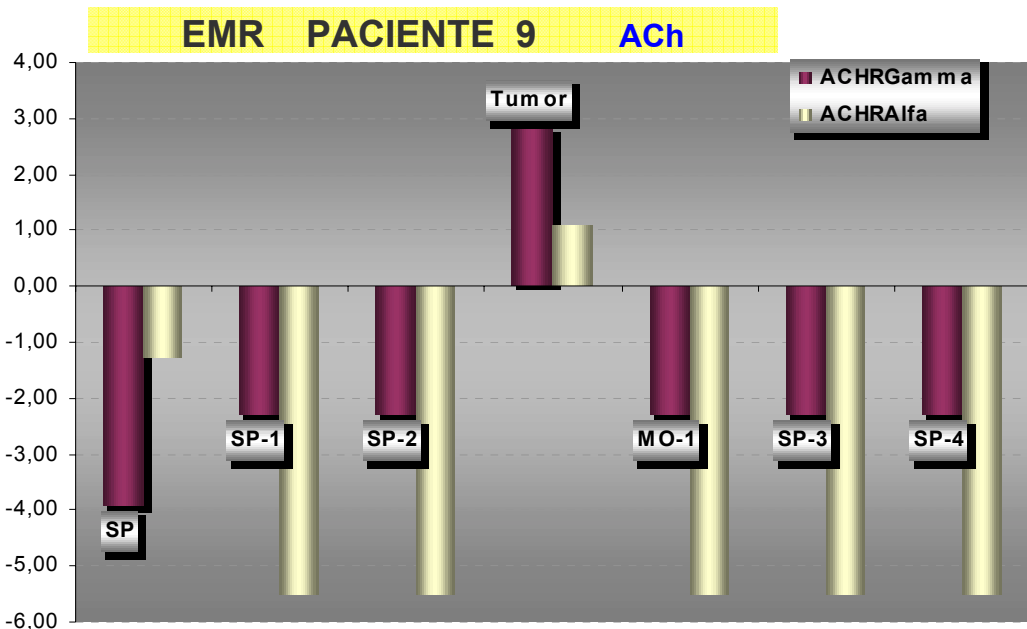
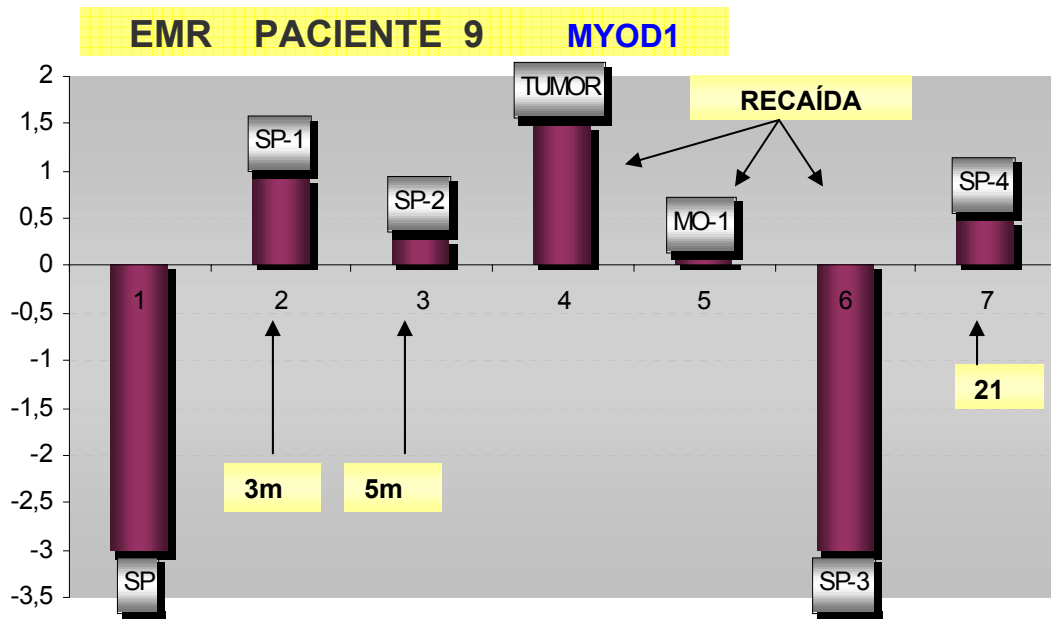
La **paciente 6**, presentaba un RMS alveolar localizado de pared costal. El tumor expresaba el producto de fusión PAX3-FKHR. Las muestras de SP i MO en el diagnóstico fueron ambas positivas (SP-1 y MO-1). Siguió tratamiento quimioterápico, incluyendo consolidación con TASPE. Se obtuvo una alícuota de ésta, que fue claramente positiva para PAX3-FKHR y MYOD1. A los 10 meses la muestra SP2, fue positiva para los tres marcadores, coincidiendo con la recaída clínica. Poco después falleció por progresión de la enfermedad.



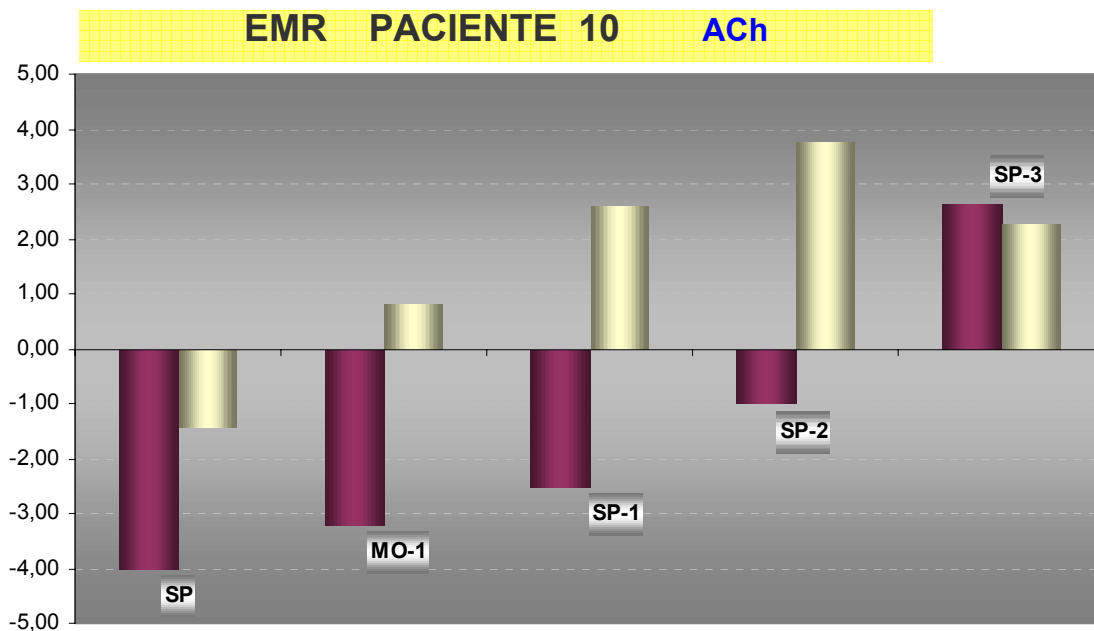
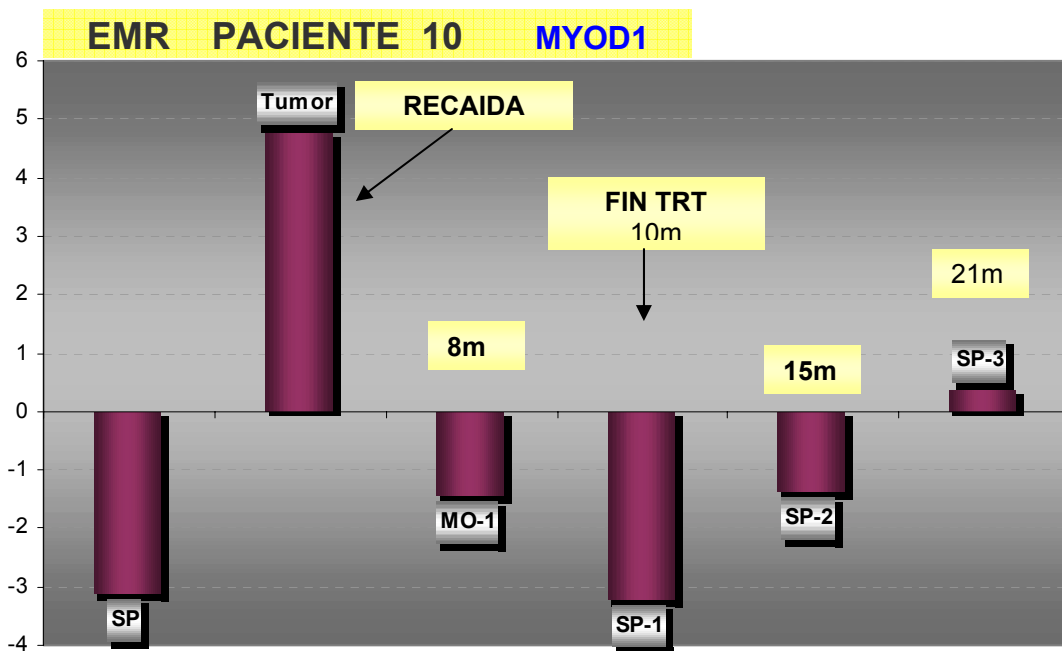
El **paciente 7**, presentaba un RMS alveolar parameningeo, con la fusión PAX7-FKHR. La sangre periférica (sp1) fue negativa para PAX7-FKHR y débilmente positiva para MYOD1. Las muestras de mo al diagnóstico (mo1,mo2) fueron negativas para Pax7-FKHR y MYOD1. Se inició tratamiento quimioterápico incluyendo consolidación con TASPE. Una alícuota de éste producto (Leucaf) fue también negativa para ambos marcadores. Todas las muestras posteriores testadas fueron igualmente negativas para PAX7-FKHR y MYOD1, excepto mo2, que fue débilmente positiva para MYOD1 (recogida en la retirada de un PAC). El paciente continúa en RC a los 84 m de seguimiento.



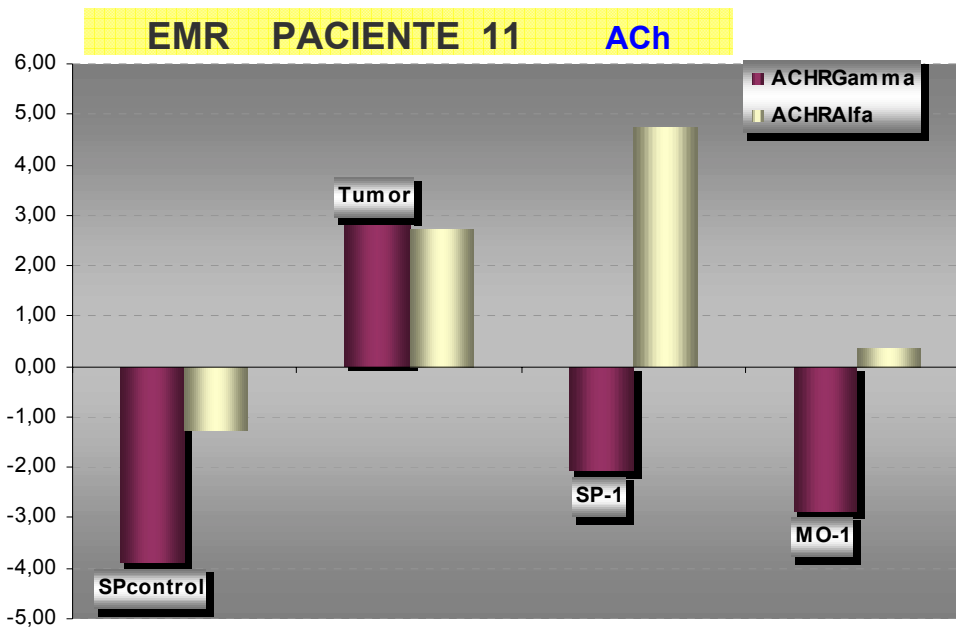
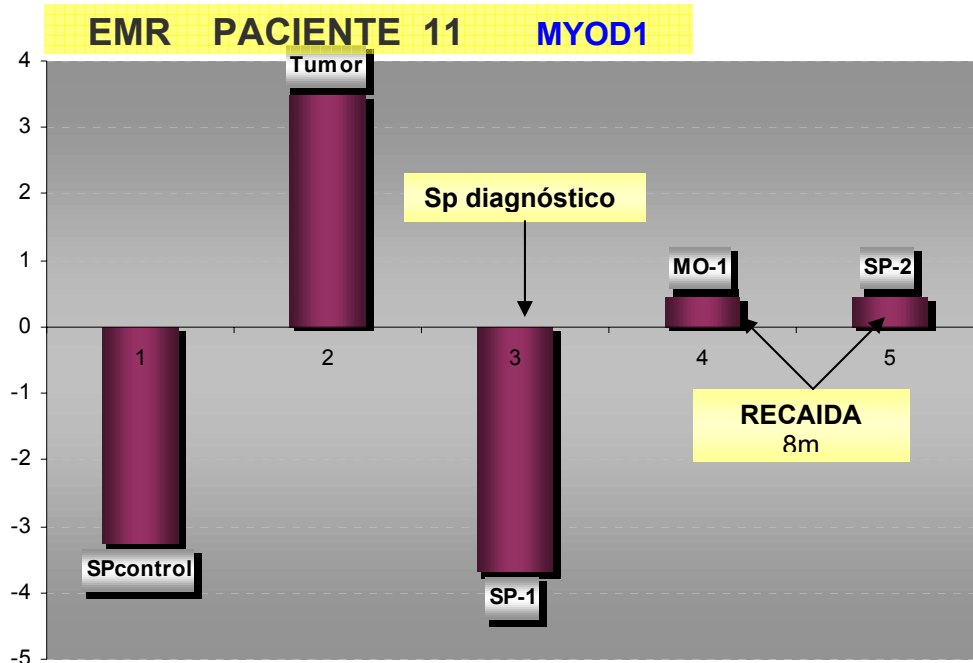
El **paciente 8**, presentaba un RMS embrionario localizado. La sp al diagnóstico fue negativa para MYOD1. Inició tratamiento quimioterápico. A los 13 meses se produce una recaída clínica local (tumor 2). La sp en ese momento (sp2) fue negativa. Se reinició tratamiento quimioterápico. A los 27 meses se produce una 2ª recaída local. La mo de ese momento (mo1) fue positiva para MYOD1 y RACH. A los 40 m, la sp-4, fue negativa para MYOD1 y discordantemente positiva para RACH. El paciente continúa en RC a los 68 m de seguimiento.



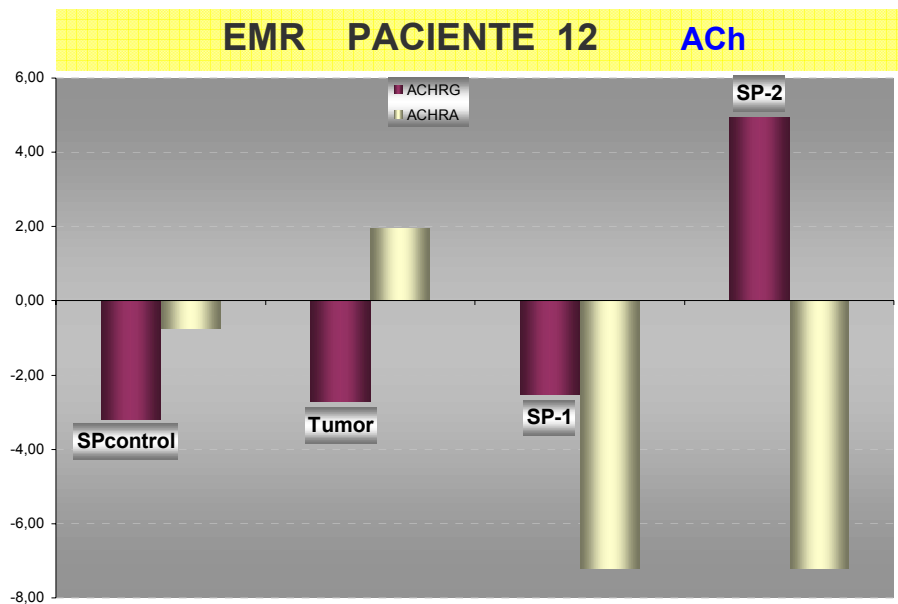
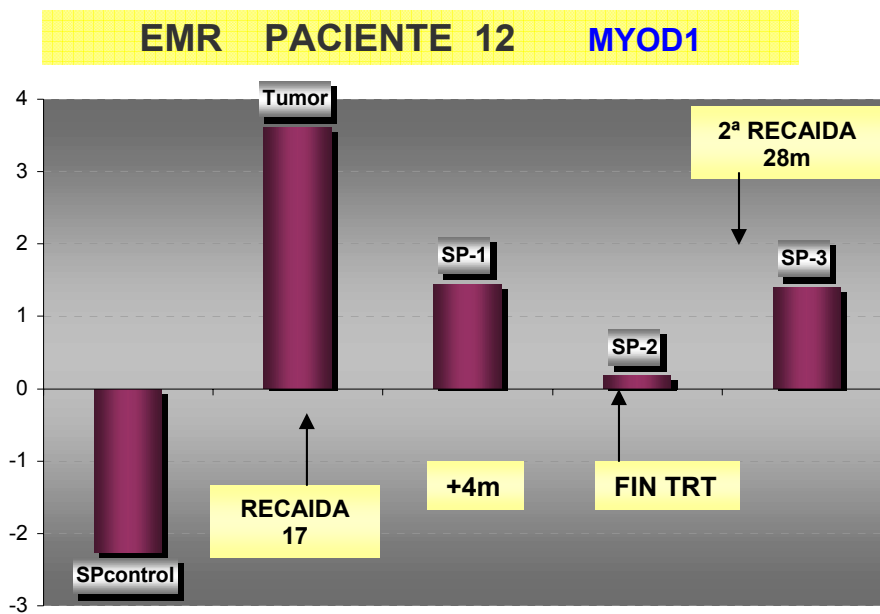
El **paciente 9**, presentaba un RMS embrionario localizado, aunque irresecable por la localización (vía biliar). La primera muestra de sp obtenida fue a los 3 meses del diagnóstico, durante el tratamiento quimioterápico. Dos meses después al finalizar el tratamiento, la sp (sp-2) fue positiva para MYOD1. Dos meses después se produciría la recaída clínica (Tumor 2), la mo de ese momento (mo1), fue débilmente positiva para MYOD1 y la sp (sp3) negativa. Se reinicia el tratamiento quimioterápico y radioterapia local. A los 21m, la sp-4, fue positiva de nuevo para MYOD1 y RACH, coincidiendo con aparición de metástasis pulmonares. El paciente falleció a 22m por progresión de la enfermedad. Todas las muestras de sp y mo para RACH en este paciente resultaron negativas.



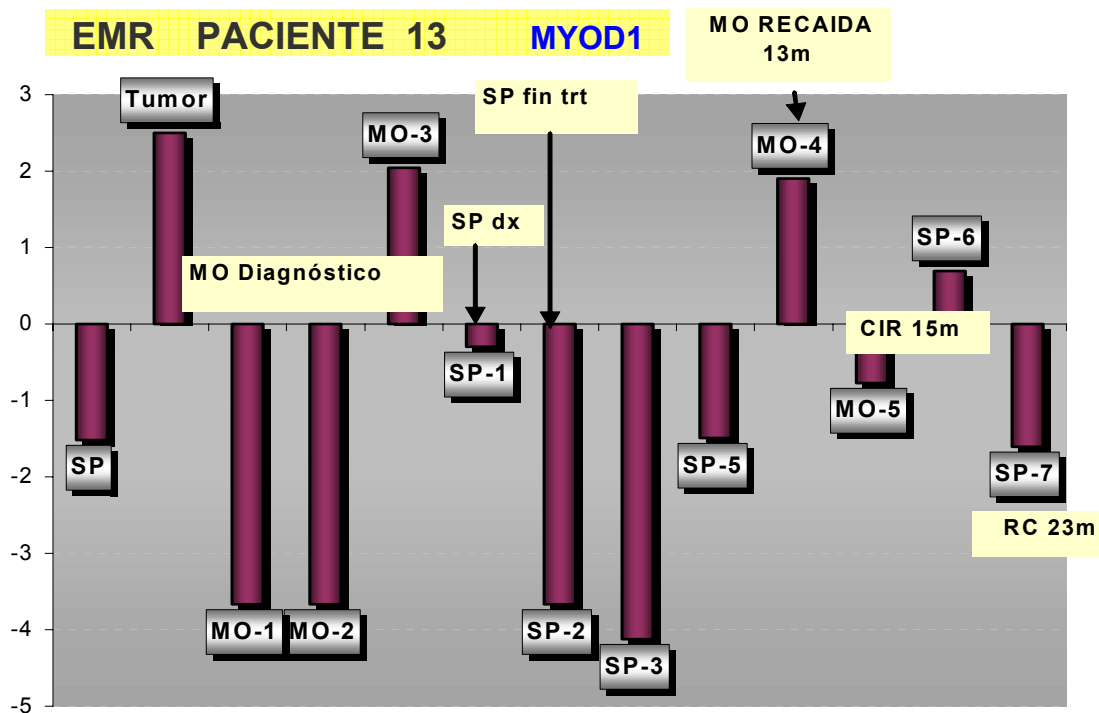
El **paciente 10**, presentaba un RMS embrionario localizado. La primera muestra de mo obtenida, fue a los 8 meses de sufrir una recaída local (mo-1), una vez finalizado el tratamiento quimioterápico. Ésta, fue negativa para MYOD1 y RACH. Las siguientes sp a los 10m y 15m (sp1 y sp2) fueron igualmente negativas para los dos marcadores. A los 21m, la sp-3, fue positiva de nuevo para MYOD1 y RACH, sin enfermedad detectable. El paciente continúa en RC a los 87m de seguimiento.



La **paciente 11**, presentaba un RMS embrionario. La muestra de sangre periférica al diagnóstico fue negativa para los dos marcadores. La paciente recibió tratamiento quimioterápico. Ocho meses después se produce una recaída clínica, las muestras de sp y mo de ese momento (mo1,sp2) fueron ambas positivas para MYOD1, aunque negativas para RACH. La paciente falleció a los 10 meses del diagnóstico, por progresión de la enfermedad.

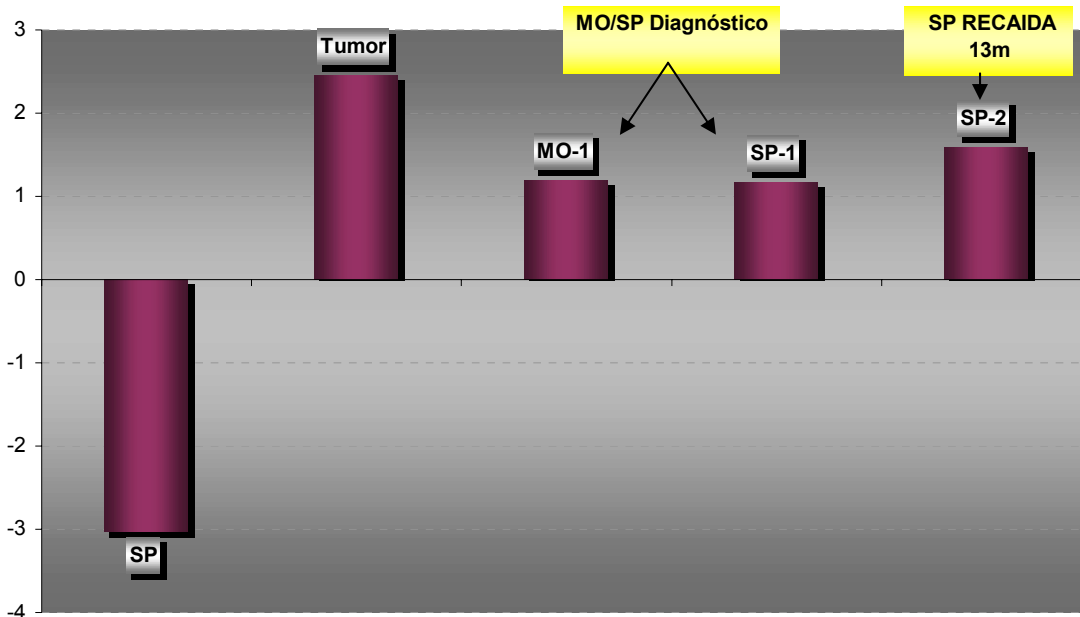


El **paciente 12**, presentaba un RMS embrionario. La muestra de sp obtenida a los 4 meses de sufrir una recaída (sp-1), una vez finalizado el tratamiento quimioterápico, fue positiva para MYOD1 y negativa para RACH. Ocho meses después la muestra sp-2 persiste positiva para los dos marcadores (MYOD1 $<1\text{cel}/10^7$). A los 28m se produce una recaída clínica, la sp de ese momento (sp3) fue claramente positiva para MYOD1 ($1-10\text{cel}/10^7$). El paciente falleció poco después por progresión de la enfermedad.

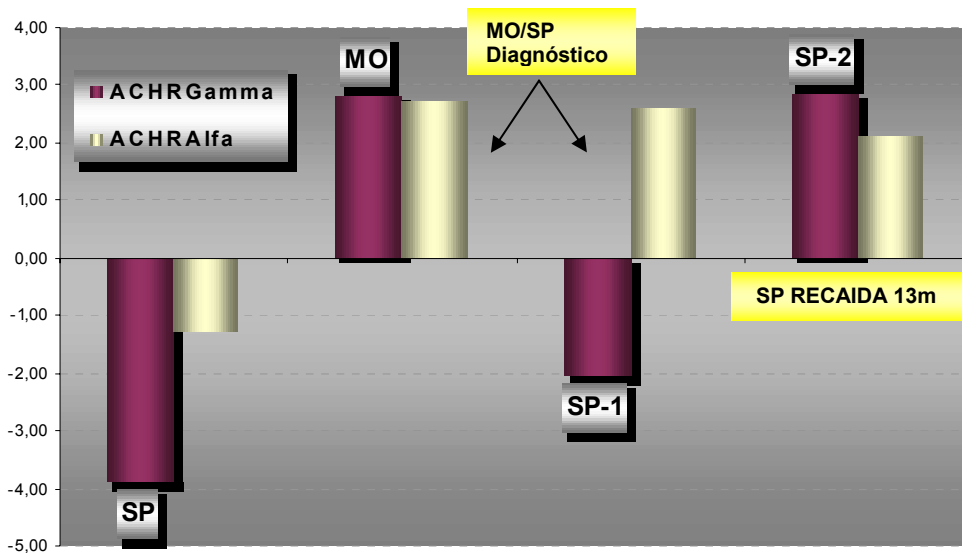


El **paciente 13** presentaba un RMS embrionario. Al diagnóstico se realizaron 3 punciones de mo en lugares distintos, dos de ellas (mo1, mo2) fueron negativas y la tercera (mo3) resultó ser claramente positiva en el análisis cuantitativo de MYOD1. La sangre periférica al diagnóstico (sp1) fue negativa. Se inició tratamiento quimioterápico. Al finalizar el tratamiento sp-2 (3m) y sp-3 (7m) fueron negativas. A los 13 meses se produce una recaída clínica. La muestra de ese momento (mo4) fue muy positiva, en cambio la muestra de sp fue negativa (sp5). Se reinicia QMT. A los 15 meses se realiza resección del tumor residual. La mo y sp de entonces (mo5,sp6) fueron negativa y positiva respectivamente. En un control, a los 23 meses, ya fue negativa (sp7). El paciente se encuentra en remisión completa a los 78m de seguimiento.

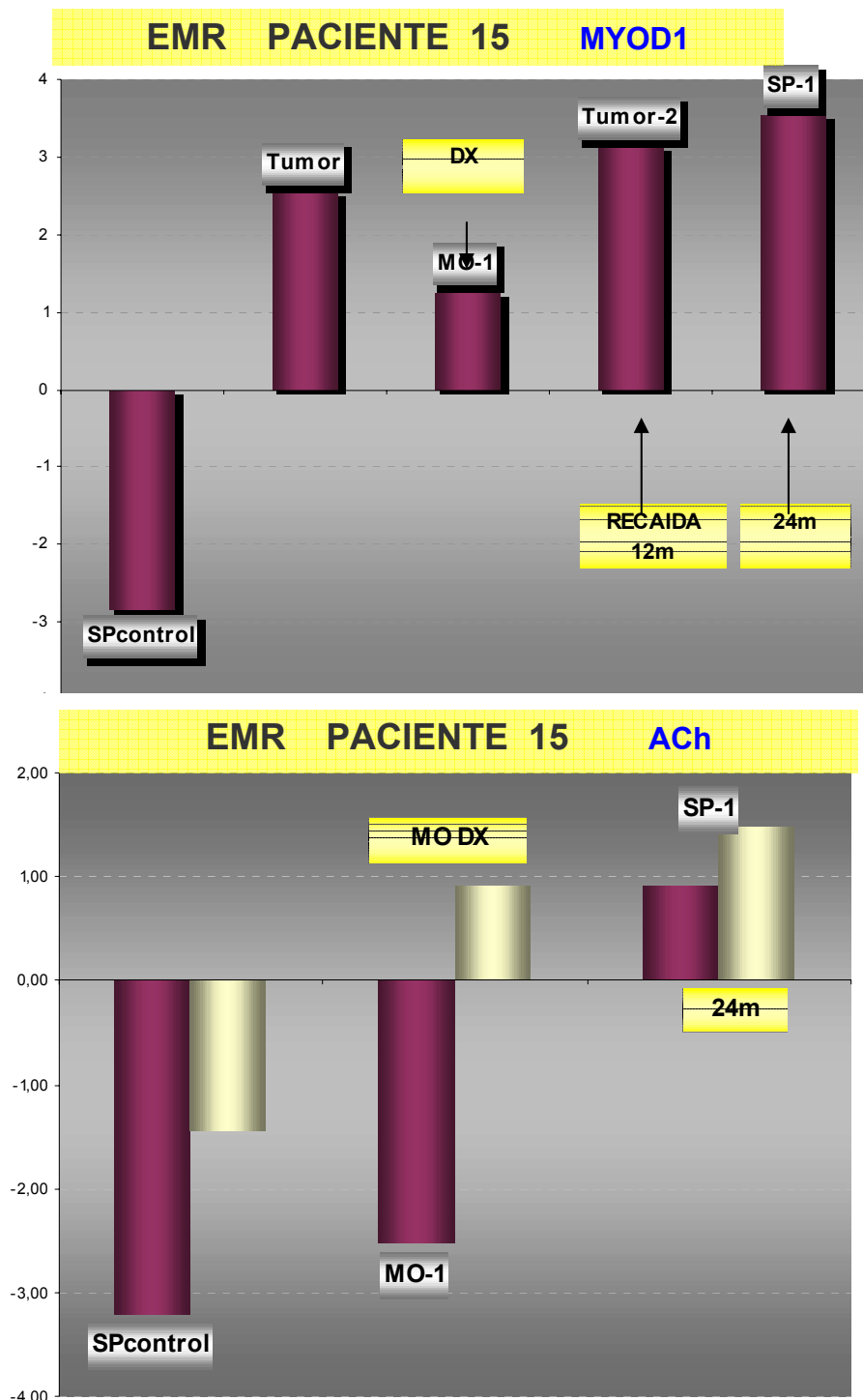
EMR PACIENTE 14 MYOD1



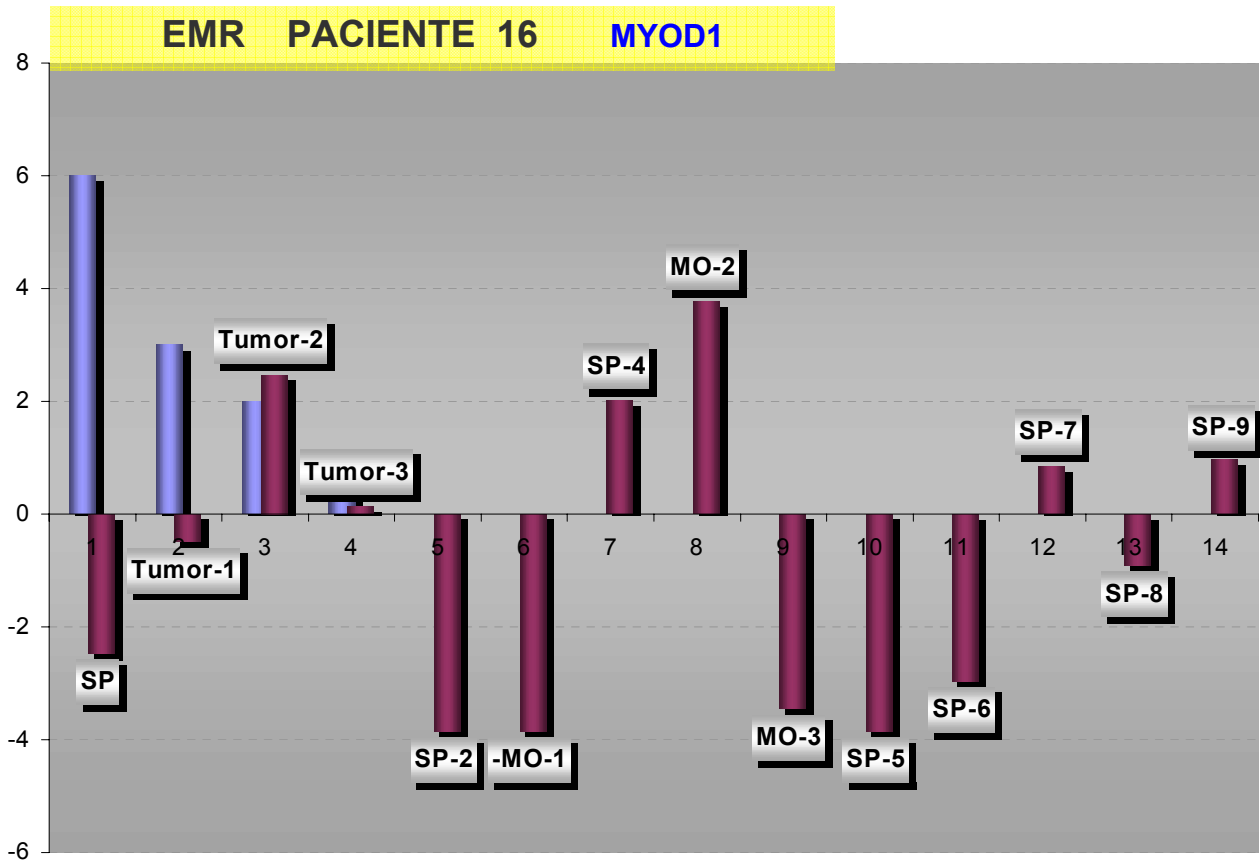
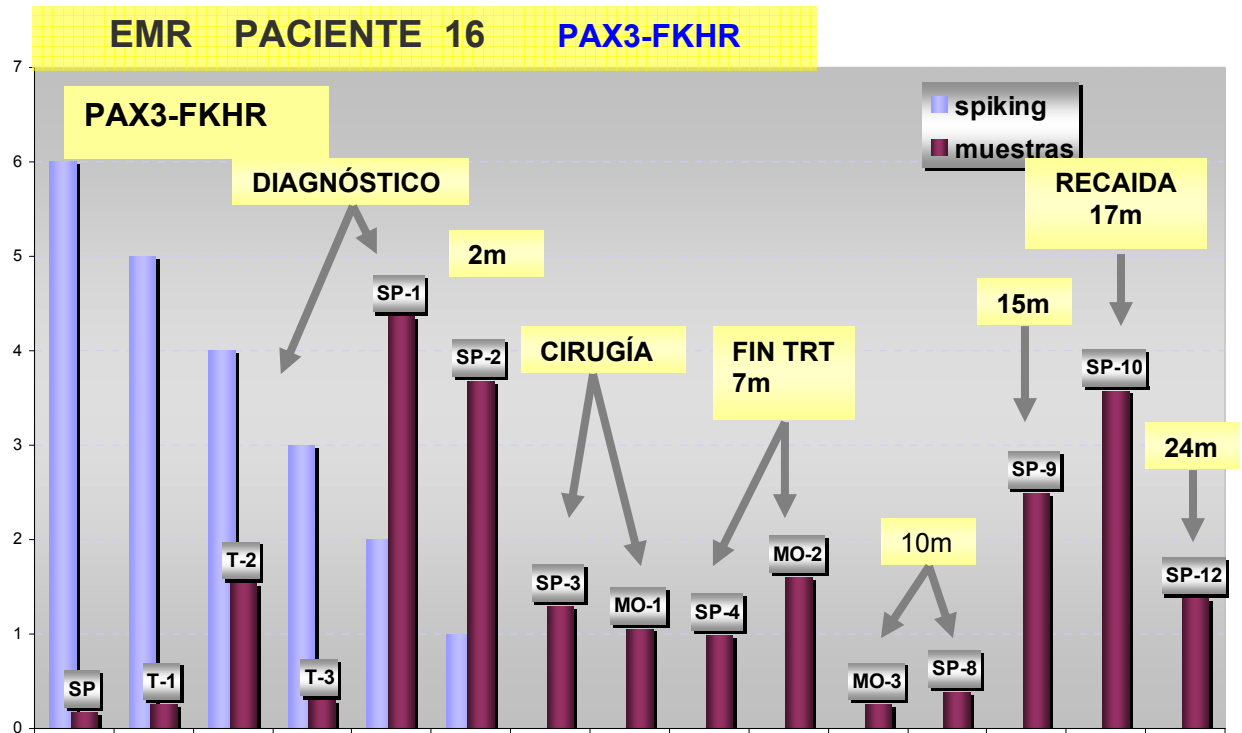
EMR PACIENTE 14 ACH



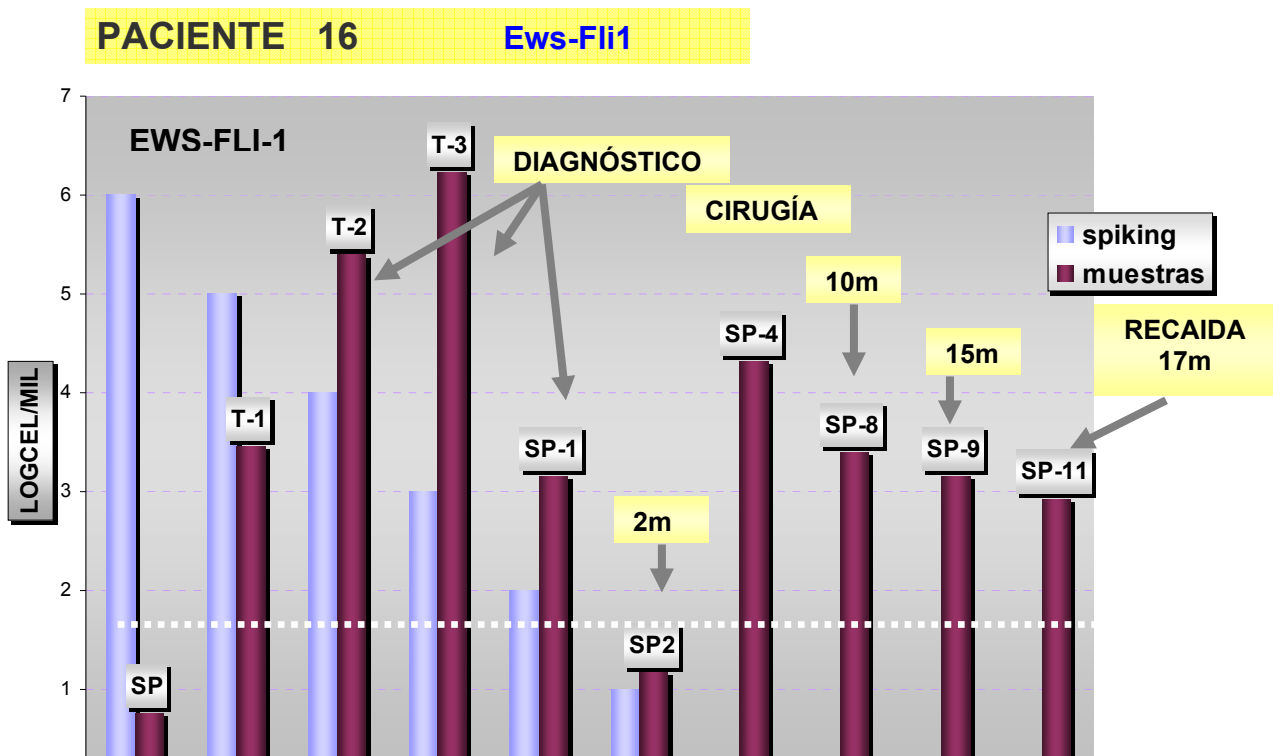
El **paciente 14** presentaba un RMS embrionario. Al diagnóstico tenía una muestra de médula ósea positiva en el análisis cuantitativo de MYOD1 y RACH. La sp al diagnóstico en cambio fue discordante, positiva para MYOD1 y negativa para RACH. Se inició tratamiento de quimioterapia. Se realizó además radioterapia para el control local, porque su localización lo hacía irreseccable (orbitario). A los 13 meses se produce una recaída clínica. La muestra sp, de ese momento fue muy positiva para los dos marcadores. Se reinicia QMT. Posteriormente, el paciente, falleció, a los 26m por progresión de la enfermedad.



La **paciente 15**, afecta de un RMS embrionario, presentaba al diagnóstico una muestra de médula ósea positiva en el análisis cuantitativo de MYOD1 y negativo para RACH. Se realizó tratamiento quimioterápico. A los 12 meses se produce una recaída local, por lo que se reinicia tratamiento QMT y exéresis quirúrgica del tumor residual (tumor1). La muestra obtenida una vez finalizado el tratamiento, a los 24 meses, (sp1), es positiva para los dos marcadores (MYOD1 y RACH). Actualmente la paciente se encuentra en remisión completa después de 45 meses de seguimiento.



La **paciente 16**, presentaba un RMS alveolar localizado, con el producto de fusión PAX3-FKHR. Posteriormente al analizar esa muestra también expresaba EWS-Fli tipo 1 (**SARCOMA BIFENOTÍPICO**). La sp al diagnóstico fue muy positiva (10^5 cel/ 10^7) para PAX3-FKHR y EWS-Fli ($10^3 \times 10^7$). Inició tratamiento quimioterápico. A los 2 meses la muestra sp2 mostraba positividad para PAX3-FKHR (aunque en menor cantidad de células que al diagnóstico, 10^3 cel/ 10^7). En cambio esa muestra obtenida durante el tratamiento, ya no expresaba EWS-Fli1. Además, sp2 fue negativa para MYOD1. A los 5 meses se realiza resección del tumor residual, siendo las muestras de sp y mo obtenidas en ese punto (sp3, mo1) positivas para PAX3-FKHR (10^1 cel/ 10^7) y EWS-Fli1 ($10^4 \times 10^7$) y negativas para MYOD1. Las muestras obtenidas durante la evaluación del final del tratamiento (sp 4, mo2) fueron positivas para todos los marcadores. A los 10 meses mo3 y sp5 fueron negativas para los marcadores de RMS y en cambio positivos para EWS-Fli1. A los 15 y 17m meses las muestras sp9 y sp10 fueron muy positivas para PAX3-FKHR (10^3 cel/ 10^7), MYOD1 y EWS-Fli1 ($10^3 \times 10^7$), precediendo a una recaída clínica metastásica. La paciente falleció por progresión de la enfermedad



4.3- RESUMEN DE LA EMR EN LOS PACIENTES CON RMS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

Pt ID	Diagnóstico		Tratamiento		Fin Tratamiento		+6m	+12m	+18m	+24.....	LEU CAF	Evolución (fecha del evento)
	SP1	MO1	SP2	MO2	SP3	MO3	SP4	SP5	SP6	SP7		
1	+	+	+	-	+		+			-	-	RC (72m)
2	-	+			-		+				-	REC (13m) M (24 m)
3	+						-					RC (27m)
4							+	-	-			RC (100m)
5	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+		REC (20m) M(30 m)
6	+	+					+				+	REC (11m) M (12 m)
7	-	-	-		-	-	-					RC (108m)
8	-	+						-	-			REC(13m, 21m) 2ªRC (79 m)
9	-	+	+		+							REC M(19 m)
10	-	-			-	-	-	+				RL.2 ND (15 m) CR (78m)
11	-	+					+					RM.EP (10 m)
12	+	+	+				+	+				RM.EP (17 m)
13	-	+	-		-		-					Rec (15m) 2ªRC (88m)
14	-	+						+				Rec(11m) E (26m)
15	+	+									+	Rec(12m) 2ªRC(45m)
16	-	-					+					RC (84m)

4.4- CORRELACIÓN ENTRE MARCADORES (PAX3/7-FKHR, MYOD-1, ACh)

La concordancia entre los marcadores se estudió en 55 muestras de SP/MO/Leucaféresis de los pacientes del estudio. Estas muestras corresponden a pacientes con RMSa (15 muestras de pacientes con PAX3-FKHR y 19 de pacientes PAX7-FKHR, RACH y MYOD1) y 29 muestras de pacientes afectos de RMSe (RACH y MYOD1).

De las muestras de los pacientes con fusión PAX3-FKHR, 7 fueron positivas para los tres marcadores (PAX3-FKHR, RACH y MYOD1), mientras que una fue positiva sólo para MYOD1. Entre las muestras de pacientes con la fusión PAX7-FKHR, 5 fueron positivas para los tres marcadores (PAX7-FKHR, RACH y MYOD1) y 4 positivas solo para MYOD1.

Siete de las 38 muestras de los pacientes con RMSe, testadas para RACH y MYOD1 fueron positivas para los dos marcadores, 18 negativas para ambos marcadores y 3 positivas sólo para MYOD1.

Cuarenta y tres de las 55 muestras testadas fueron concordantes para los marcadores testados y 8 muestras fueron positivas sólo para MYOD1. De acuerdo con los resultados, una muestra se consideraba positiva cuando se detectaba la expresión del producto de fusión PAX3/7-FKHR, en los pacientes con tumores alveolares fusión positiva, y en los pacientes con tumores sin fusión, cuando se detectaban MYOD1 y RACH.

FUSIÓN	GENES	Muestras (Positiva/Total)
PAX3-FKHR+	PAX3-FKHR + ACh + MYOD1 +	7/15
PAX3-FKHR+	PAX3-FKHR Ø Ach Ø MYOD1 +	1/15
PAX7-FKHR+	PAX7-FKHR + Ach + MYOD1 +	5/19
PAX7-FKHR+	PAX7-FKHR Ø Ach Ø MYOD1 +	4/19
Fusión -	ACh + MYOD1 +	6/21
Fusión -	ACh Ø MYOD1 Ø	9/21
Fusión -	ACh Ø MYOD1 +	6/21

Fig. 46. Tabla de concordancia entre los marcadores RMS.

4.5- ENFERMEDAD MICROMETASTÁSICA EN MO Y EVOLUCIÓN

Se obtuvieron un total de veinte muestras de MO, en el diagnóstico, cirugía, durante y al final del tratamiento. Los resultados están resumidos en la tabla siguiente. Se compararon los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real con los de citología. Siete muestras fueron negativas tanto por citología como por RT-PCR. Trece muestras de mo fueron positivas mediante PCR y de todas ellas, sólo 2 fueron positivas desde el punto de vista morfológico. De las 15 muestras obtenidas en el diagnóstico (o en los episodios de recaída), dos fueron positivas por los dos métodos y el resto (9), tan solo por RT-PCR. Esto corresponde a un índice de infiltración al diagnóstico del 63%. De los 11 pacientes con MO positivas mediante RT-PCR, 10 (90%) presentaron recaída (local o metastásica) y siete (79%) fallecieron por progresión de la enfermedad. De los 4 pacientes con MO negativas al diagnóstico, uno presentó una recaída local, pero los tres están actualmente libres de enfermedad y en RC. El paciente con MO positiva al final del tratamiento recayó al poco tiempo y murió por progresión de la enfermedad.

4.6- ENFERMEDAD MICROCIRCULANTE Y EVOLUCIÓN

Se obtuvieron 53 muestras de sangre periférica en el diagnóstico y en diferentes intervalos, durante y después del tratamiento. En la tabla del apartado 4.3 se resumen todos los resultados de la enfermedad microcirculante. Siete pacientes presentaron muestras **positivas** al **diagnóstico** o episodio de recaída. Seis de ellos ($6/7=85\%$) recayeron y 4 ($4/6=66\%$) de ellos murieron por progresión de la enfermedad.

Nueve pacientes tenían sp **negativas** al **diagnóstico**, cuatro de ellos (44%) continúan en RC, si bien 3 de los 4 sufrieron una recaída local.

Al final del tratamiento los 3 pacientes que persistían con sp positivas, murieron por progresión de la enfermedad. Otros 4 pacientes tenían sp negativa al final del tratamiento, de ellos sólo uno recayó, virando las siguientes muestras a positivas.

Durante el seguimiento, 9 pacientes tenían sp **positiva** persistente (SP4-SP7). Seis de ellos (66%) desarrollaron metástasis a distancia y murieron por progresión de la enfermedad.

Durante el seguimiento 6 pacientes tenían la **sp negativa**, todos ellos (100%) están en RC, si bien tres de ellos habían sufrido en fases previas una recaída local, de la cual se trataron y permanecen en RC.

En casi todos los casos de recaída clínica, la enfermedad microcirculante de detectó 1-6 meses antes de la recaída.

5- SARCOMA BIFENOTÍPICO

El paciente número 16, tal como ya se ha descrito en la página 123, presentaba un sarcoma bifenotípico. En un primer momento diagnosticó como un RMSa por sus características morfológicas, aunque inicialmente destacaba, a nivel inmunohistoquímico, una relativa ausencia o disminución en la expresión de marcadores miogénicos. En la tinción de Hematoxilina-eosina (Fig 47), se aprecian células rabiomioblásticas muy embrionarias junto con ausencia de expresión de desmina (fig: 48).

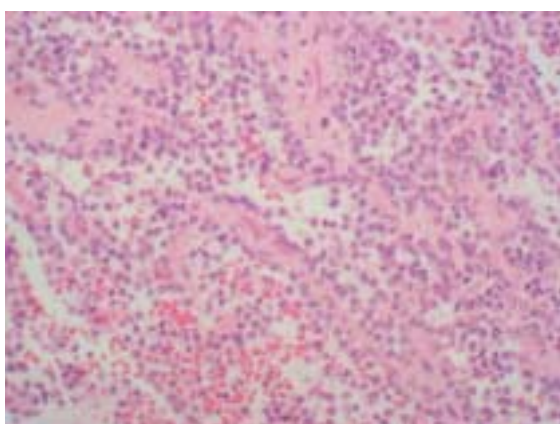


Fig 47. Hematoxilina-eosina 100x

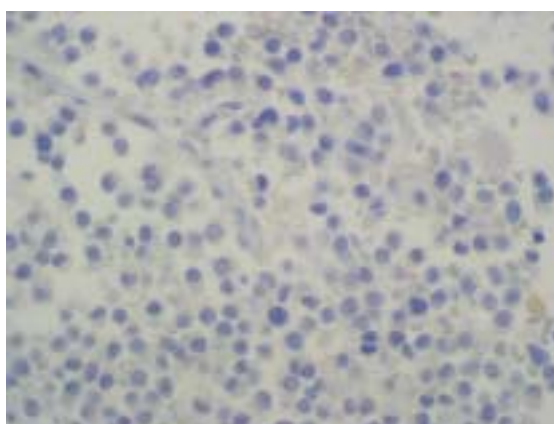


Fig48: Desmina negativa

La actina de músculo estriado fue débilmente positiva. La expresión del marcador MYOD1, se muestra en la figura 49, donde se aprecia positividad poco intensa, aunque en el 50% de las células.

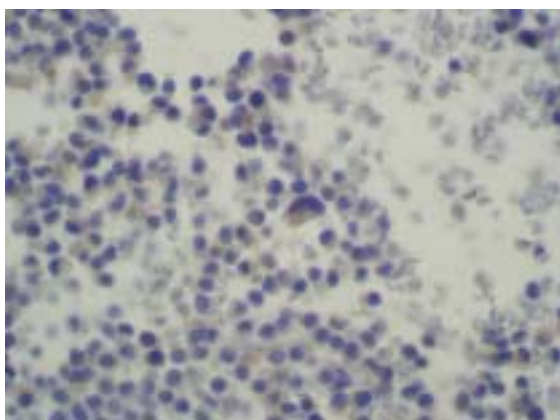


Fig49: MYOD1 débilmente + en el 50% de las Cel.

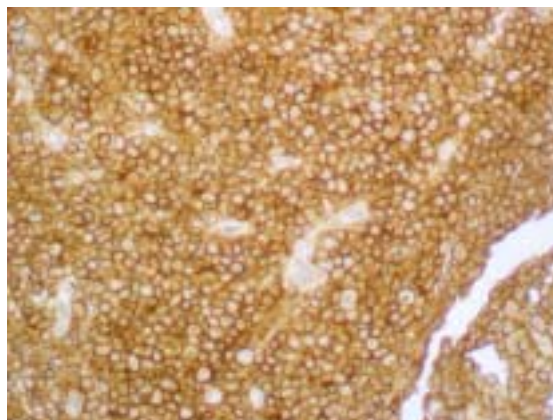


Fig50: CD99 intensamente positivo en la Membrana citoplasmática de todas las células.

Posteriormente, se realizó el marcador de CD99, que fue intensamente positivo, en el 100% de las células (Fig.50).

En la muestra obtenida de una recaída, se evidenció una morfología mucho más inmadura, con mayor escasez de marcadores miogénicos.

En la tinción de Hematoxilina-eosina (Fig.52), las células eran más pequeñas, redondas y azuladas que las del diagnóstico, con un citoplasma rosado. MYOD1 se expresaba en todas las membranas citoplasmáticas (Fig51) y de nuevo, el marcador mas característico del SE, el CD99, fue intensamente positivo en la membrana citoplasmática de todas las células. (Fig 53)

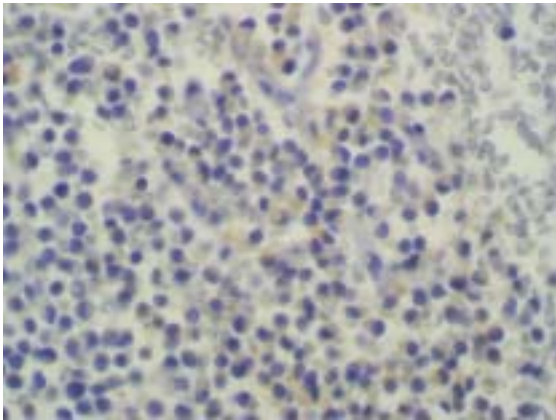


Fig51. MYOD1 positivo en todas las cél.

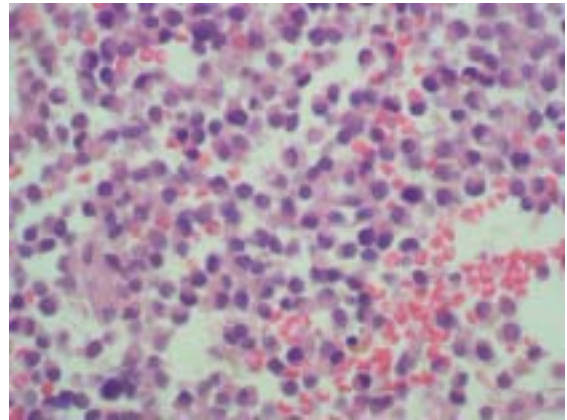


Fig 52. Hematoxilina-eosina

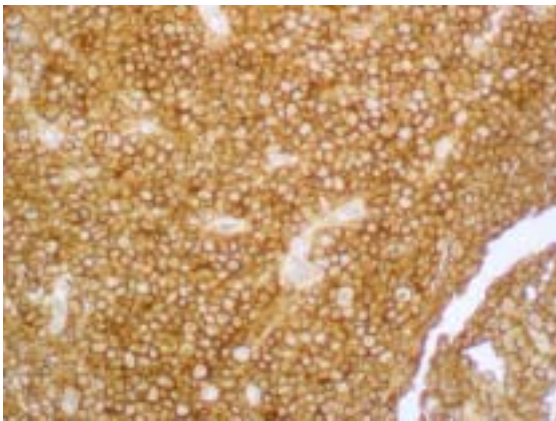


Fig53. CD99 intensamente positivo

Además, la vimentina fue positiva y la actina de músculo liso y estriado fueron negativas.

El diagnóstico definitivo, se realizó gracias a la caracterización molecular del tumor, que expresaba además del producto de fusión PAX3-FKHR, la fusión EWS-Fli1 tipo1. Aunque no se trata del primer caso de sarcoma bifenotípico descrito, este es el primer trabajo donde se analiza la enfermedad mínima residual de un paciente afecto por este tipo de tumor mediante RT-PCR en tiempo real. Se analizaron en sp y mo, los marcadores expresados en el tumor primario. Es decir EWS-Fli1 y los marcadores típicos del RMS alveolar (PAX3-

FKHR, MYOD1 y ACh). Hasta la fecha tan sólo hay en la literatura cuatro trabajos que describen ejemplos de sarcomas bifenotípicos. Sorensen y Shimada, describieron el primer caso de sarcoma bifenotípico en 1995. Se trataba de un tumor con la fusión EWS-Fli1 y rasgos de diferenciación miogénica. Anteriormente se diagnosticaban como formas inmaduras de RMS, basándose únicamente en características morfológicas e inmunohistoquímicas, aunque también se creía que a nivel molecular, eran ectomesenquimomas malignos.⁹²

De Alava, et al 1998, describe el primer caso de expresión conjunta de PAX3-FKHR y EWS-Fli1. Dicho caso es muy similar al caso descrito por nosotros (paciente 16). Se trataba de una paciente con un sarcoma indiferenciado, con inmunorreactividad para la desmina, vimentina, proteína S-100, CD99 y ENS, y ausencia de MYOD1. A nivel molecular además expresaba los dos productos de fusión EWS-Fli1 y PAX3-FKHR.

Tan y Burchill, 2001, describen el primer caso de sarcoma bifenotípico con expresión del producto de fusión EWS-ERG y diferenciación miogénica. En dicho estudio encontraron igual que en nuestro caso, expresión (muy escasa) de MYOD1.

6- ANÁLISIS CONJUNTO DE TODOS LOS PACIENTES: RMS+SE.

DX	SE	SP+	8	5	MO+	9	6
				3			3
		SP-	4	3	MO-	3	1
				1			2
	RMS	SP+	7	4	MO+	11	7
				3			4
		SP-	8	4	MO-	4	0
				4			4
FINAL TRT	SE	SP+	5	4	MO+	2	2
				1			0
		SP-	6	3	MO-	3	1
				3			2
	RMS	SP+	3	2	MO+	1	1
				1			0
		SP-	4	1	MO-	2	0
				3			2
SEGUI MIENTO	SE	SP+	10	7			
				3			
		SP-	2	1			
	1						
	RMS	SP+	9	6			
				3			
SP-		6	0				
	6						

Fig.54. Tabla de resultados SE y RMS agrupados según la fase de la enfermedad (Dco, Final TRT, Seguimiento)

DX	SE+RMS	SP+	15	9 (60%)	MO+	20	13 (65%)
				6 (40%)			7 (35%)
		SP-	12	6 (50%)	MO-	7	1 (16%)
				6 (50%)			5 (83%)
FINAL DEL TRT	SE+RMS	SP+	8	6 (75%)	MO+	3	3 (100%)
				2 (25%)			0
		SP-	11	4 (40%)	MO-	5	1 (20%)
				7 (63%)			4 (80%)
SEGUIMIENTO	SE+RMS	SP+	19	13 (68%)			
				6 (31%)			
		SP-	9	1 (11%)			
				8 (88%)			

Fig.55. Tabla de análisis conjunto de todos pacientes afectados de RMS y SE. Los números de color rojo indican los pacientes que murieron por progresión de la enfermedad y en azul los que permanecen en remisión completa. Uno de los pacientes se ha desglosado en dos, al analizar cada episodio de recaída de forma independiente.

6.1- ANALISIS DE SUPERVIVENCIA.

Se analiza la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global de los pacientes afectos de RMS y SE que presentan una expresión positiva o negativa de los diferentes marcadores específicos, en diferentes momentos de la enfermedad:

- SP y MO al diagnóstico.
- SP y MO al final del tratamiento.
- SP y MO durante el seguimiento.

En cada uno de estos análisis se comprueba si hay diferencias ($p < 0.05$) en la evolución clínica, entre el grupo de pacientes con SP/MO positiva y el grupo con SP/MO negativa.

En todas las tablas, el tiempo es expresado en meses y los censurados (censored), corresponden a aquellos pacientes positivos o negativos, que no han presentado el evento analizado (muerte o recaída).

6.1.1-Análisis de Supervivencia Libre de Enfermedad según SP al diagnóstico

Factor SP.DCO = NEGATIVA

Number of Cases:	12	Censored:	3	(25.00%)	Events:	9
	Survival Time		Standard Error		95% Confidence Interval	
Mean:	34		11		(12,55)	
(Limited to	108)					
Median:	15		3		(10,20)	

Factor SP.DCO = POSITIVA

Number of Cases:	15	Censored:	5	(33.33%)	Events:	10
	Survival Time		Standard Error		95% Confidence Interval	
Mean:	37		9		(19,55)	
(Limited to	88)					
Median:	15		3		(10,20)	

	Total	Number Events	Number Censored	Percent Censored
SPDX	0	12	9	25.00
SPDX	1	15	10	33.33
Overall	27	19	8	29.63
Test Statistics for Equality of Survival Distributions for SPD				
	Statistic	df	Significance	
Log Rank	.01	1	.9174	

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, en la supervivencia libre de enfermedad, entre los dos grupos de pacientes SP.DCO positiva y SP.DCO negativa.

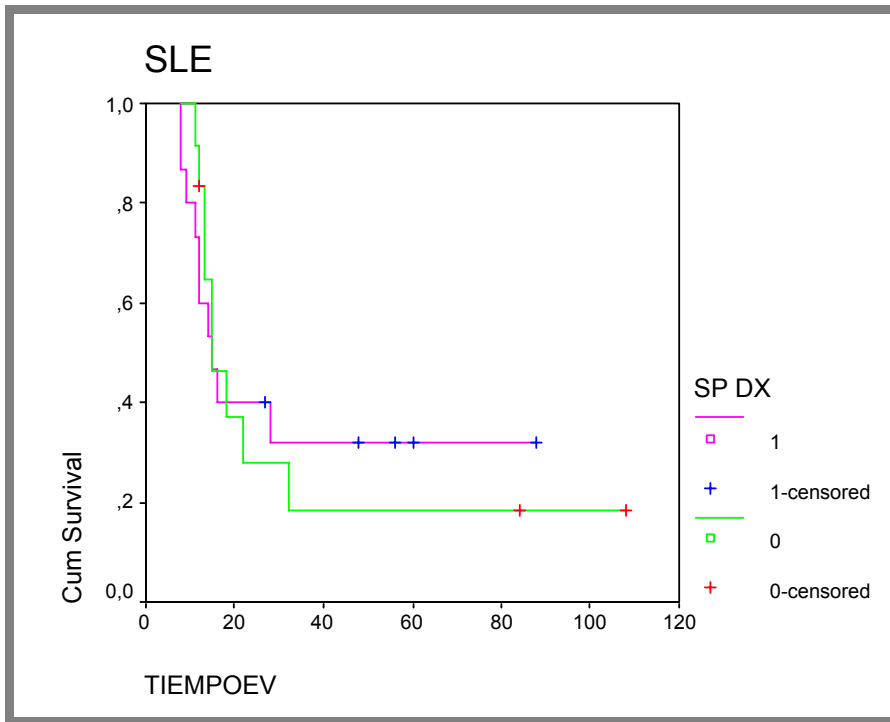


Fig. 56. Gráfica supervivencia libre de enfermedad en el análisis de SP al diagnóstico

6.1.2-Análisis de Supervivencia Global según la SP al diagnóstico

Factor SPDX = NEGATIVA

Number of Cases:	12	Censored:	6	(50.00%)	Events:	6
	Survival Time		Standard Error		95% Confidence Interval	
Mean:	63		13		(38, 87)	
(Limited to	108)					
Median:	33		.		(.,.)	

Factor SPDX = POSITIVA

Number of Cases:	15	Censored:	6	(40.00%)	Events:	9
	Survival Time		Standard Error		95% Confidence Interval	
Mean:	44		9		(26, 62)	
(Limited to	88)					
Median:	24		9		(7, 41)	

		Total	Number Events	Number Censored	Percent Censored
SPDX	0	12	6	6	50.00
SPDX	1	15	9	6	40.00
Overall		27	15	12	44.44
Test Statistics for Equality of Survival Distributions for SPDX					
	Statistic	df	Significance		
Log Rank	.80	1	.3708		

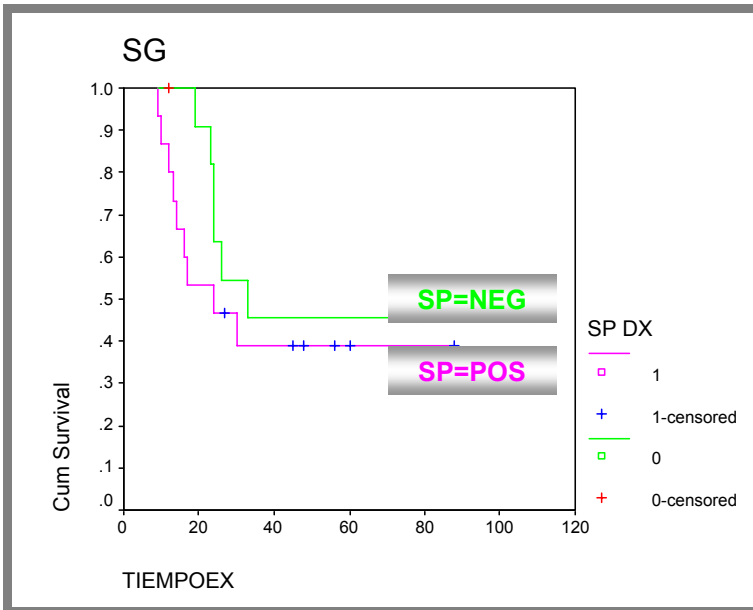


Fig. 57. Gráfica e Supervivencia global analizando la SP Al diagnóstico.

No se han encontrado diferencias en la supervivencia global entre los grupos de pacientes con SP positiva y SP negativa al diagnóstico.

6.1.3- Análisis de Supervivencia Libre de Enfermedad según la MO al diagnóstico

Factor MO.DCO = NEGATIVA

Number of Cases:	8	Censored:	4	(50.00%)	Events:	4
	Survival Time	Standard Error	95% Confidence Interval			
Mean:	58	16	(26,90)			
(Limited to	108)					
Median:	30	10	(9,51)			

Factor MO.DCO = POSITIVA

Number of Cases:	20	Censored:	4	(20.00%)	Events:	16
	Survival Time	Standard Error	95% Confidence Interval			
Mean:	26	5	(6,37)			
(Limited to	72)					
Median:	14	1	(11,17)			

	Total	Number Events	Number Censored	Percent Censored
MODX 0	7	3	4	57.14
MODX 1	20	16	4	20.00
Overall	27	19	8	29.63
Test Statistics for Equality of Survival Distributions for MODX				
	Statistic	df	Significance	
Log Rank	2.34	1	.1260	

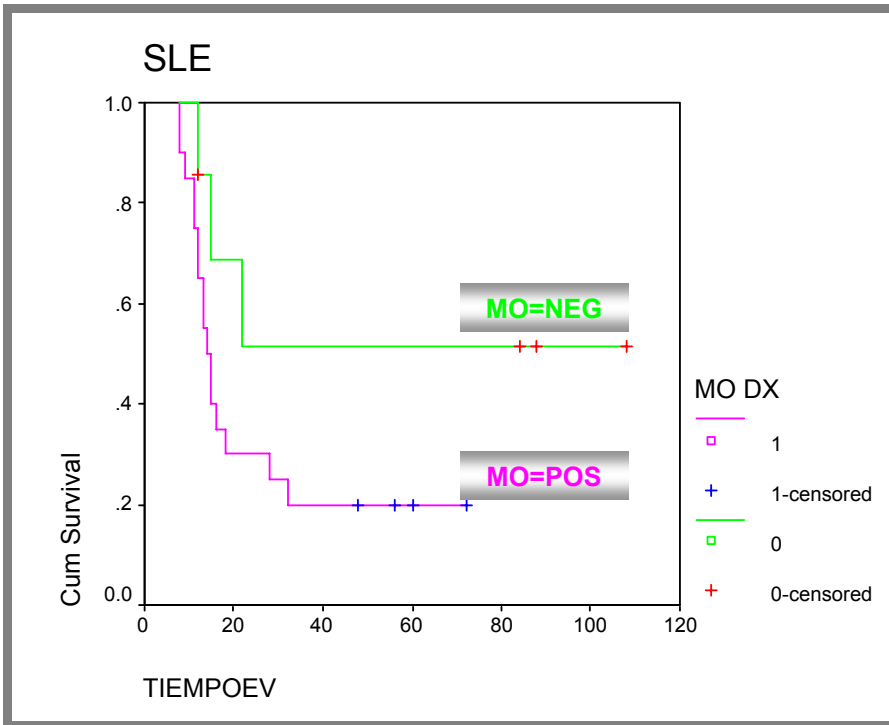


Fig. 58. Gráfica de la Supervivencia Libre de Enfermedad analizando la MO al diagnóstico.

A pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas, de SLE, entre los dos grupos (MO.DCO=pos y MO.DCO=neg.), si que se observan resultados más pobres, (recaídas), en el grupo con MO positiva al diagnóstico (20% versus 57%, log rank 0.12).

6.1.4- Análisis de Supervivencia Global según la MO al diagnóstico
Factor MO.DCO= NEGATIVA

Number of Cases:	7	Censored:	5	(71.43%)	Events:	2
	Survival Time		Standard Error		95% Confidence Interval	
Mean:	80		16		(48,112)	
(Limited to	108)					
Median:	.		.		(.,.)	

Factor MO.DCO = POSITIVA

Number of Cases:	20	Censored:	7	(35.00%)	Events:	13
	Survival Time		Standard Error		95% Confidence Interval	
Mean:	43		7		(28, 58)	
(Limited to	88)					
Median:	24		5		(14,34)	

		Total	Number Events	Number Censored	Percent Censored
MODX	0	7	2	5	71.43
MODX	1	20	13	7	35.00
Overall		27	15	12	44.44
Test Statistics for Equality of Survival Distributions for MODX					
	Statistic	df	Significance		
Log Rank	1.89	1	.1696		

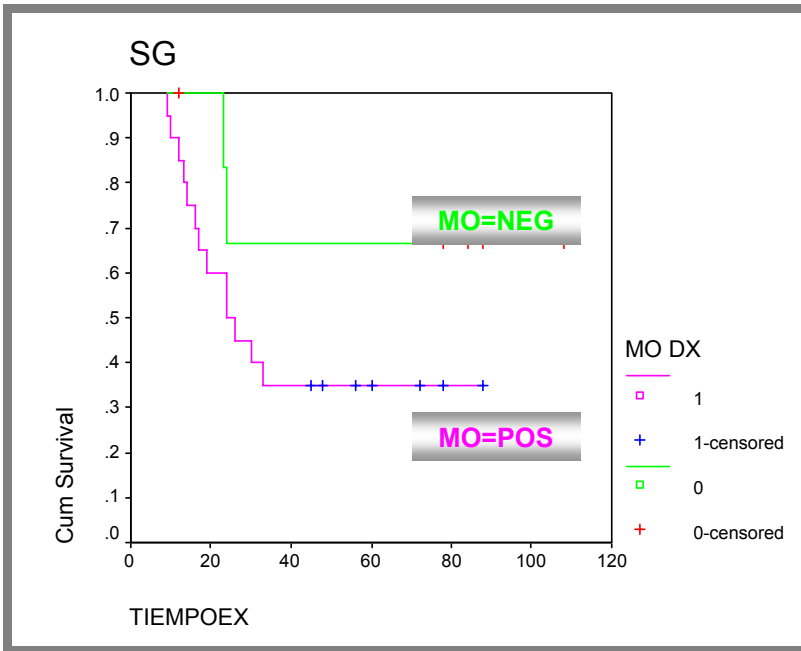


Fig.59- Gráfica e Supervivencia global analizando la MO al diagnóstico.

La supervivencia global de los pacientes con MO positiva al diagnóstico, fue del 35%, mientras que los pacientes con MO negativa fueron del 71%. Esta diferencia no fue significativa (log rank 0.16)

6.1.5- Análisis de Supervivencia Libre de Enfermedad según la SP al final del tratamiento

Factor SP.FINAL.TRT = NEGATIVA

Number of Cases:	11	Censored:	5	(45.45%)	Events:	6
	Survival Time		Standard Error		95% Confidence Interval	
Mean:	53		14		(25,81)	
(Limited to	108)					
Median:	22		5		(11,33)	

Factor SP.FINAL.TRT = POSITIVA

Number of Cases:	8	Censored:	2	(25.00%)	Events:	6
	Survival Time		Standard Error		95% Confidence Interval	
Mean:	31		9		(14, 49)	
(Limited to	72)					
Median:	18		11		(0,40)	

		Total	Number Events	Number Censored	Percent Censored
SPFINAL	0	11	6	5	45.45
SPFINAL	1	8	6	2	25.00
Overall		19	12	7	36.84
Test Statistics for Equality of Survival Distributions for SPFINAL					
	Statistic	df	Significance		
Log Rank	.38	1	.5390		

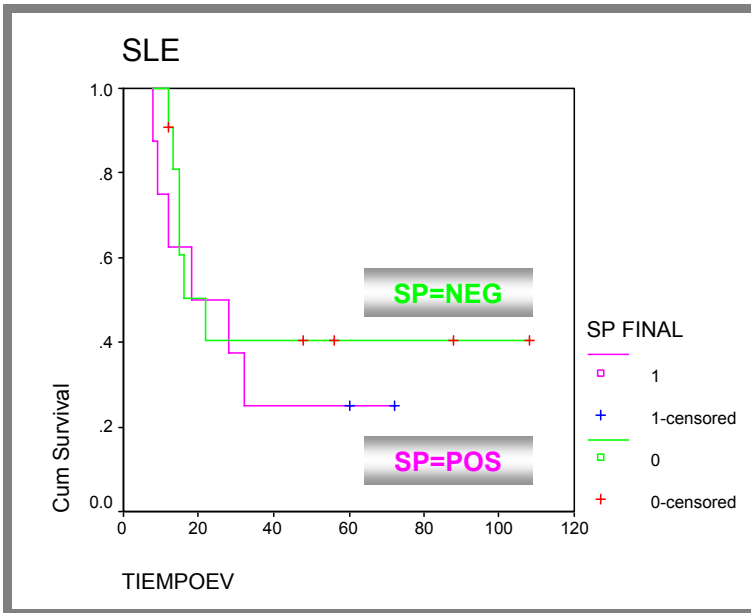


Fig. 60. Gráfica e Supervivencia libre de enfermedad analizando la SP al final del tratamiento.

La supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con SP positiva al final del tratamiento fue del 25%, mientras que los pacientes con SP negativa al final de tratamiento, fue del 45%. Esta diferencia no fue significativa

6.1.6- Análisis de Supervivencia Global según la SP al final del trt

Factor SP.FINAL.TRT =NEGATIVA

Number of Cases:	11	Censored:	7	(63.64%)	Events:	4
	Survival Time		Standard Error		95% Confidence Interval	
Mean:	74		13		(47,100)	
(Limited to	108)					
Median:	.		.		(.,.)	

Factor SP.FINAL.TRT = POSITIVA

Number of Cases:	8	Censored:	2	(25.00%)	Events:	6
	Survival Time		Standard Error		95% Confidence Interval	
Mean:	34		8		(18, 50)	
(Limited to	72)					
Median:	24		8		(9, 39)	

		Total	Number Events	Number Censored	Percent Censored
SPFINAL	0	11	4	7	63.64
SPFINAL	1	8	6	2	25.00
Overall		19	10	9	47.37
Test Statistics for Equality of Survival Distributions for SPFINAL					
	Statistic	df	Significance		
Log Rank	2.06	1	.1516		

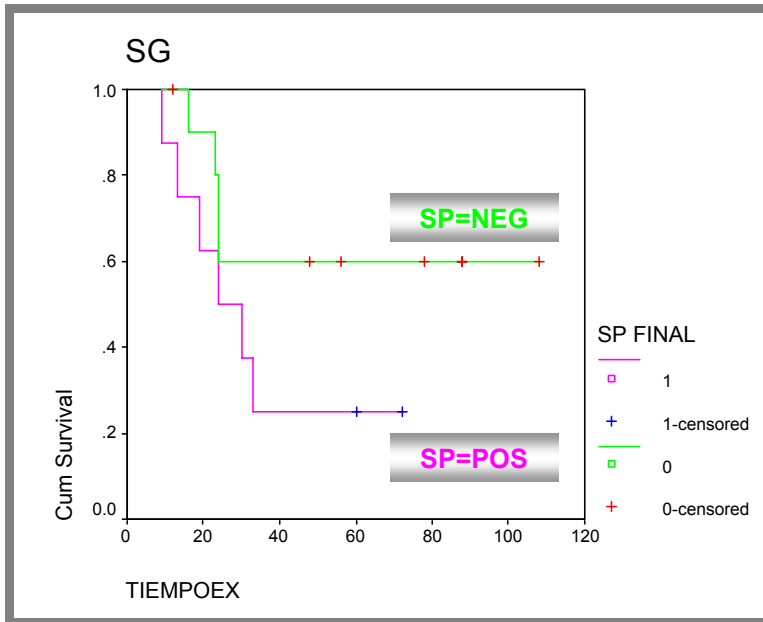


Fig.61. Gráfica e Supervivencia global analizando la SP al final del tratamiento.

La supervivencia global de los pacientes con SP positiva al final del tratamiento fue del 25%, mientras que los pacientes con SP negativa al final de tratamiento, fue del 63%. Esta diferencia no fue significativa.

6.1.7- Análisis de Supervivencia Libre de Enfermedad según la SP durante el seguimiento

Factor SP.SEGUIMIENTO = NEGATIVA

Number of Cases:	9	Censored:	6	(66.67%)	Events:	3
	Survival Time	Standard Error	95% Confidence Interval			
Mean:	73	16	(41,105)			
(Limited to	108)					
Median:.		.	(. . .)			

Factor SP.SEGUIMIENTO = POSITIVA

Number of Cases:	19	Censored:	4	(21.05%)	Events:	15
	Survival Time	Standard Error	95% Confidence Interval			
Mean:	30	7	(17, 43)			
(Limited to	84)					
Median:	15	1	(12,18)			

		Total	Number Events	Number Censored	Percent Censored
SPSEGUIM	0	9	3	6	66.67
SPSEGUIM	1	19	15	4	21.05
Overall		28	18	10	35.71
Test Statistics for Equality of Survival Distributions for SPSEGUIM					
	Statistic	df	Significance		
Log Rank	3.18	1	.0746		

Entre los pacientes con SP positiva y SP negativa durante el seguimiento, se encontraron diferencias en la evolución clínica muy próximas a la significación estadística. Esto es, una SLE del 21% para el grupo “positivo” y del 66%, para el grupo “negativo”. (log rank 0.07)

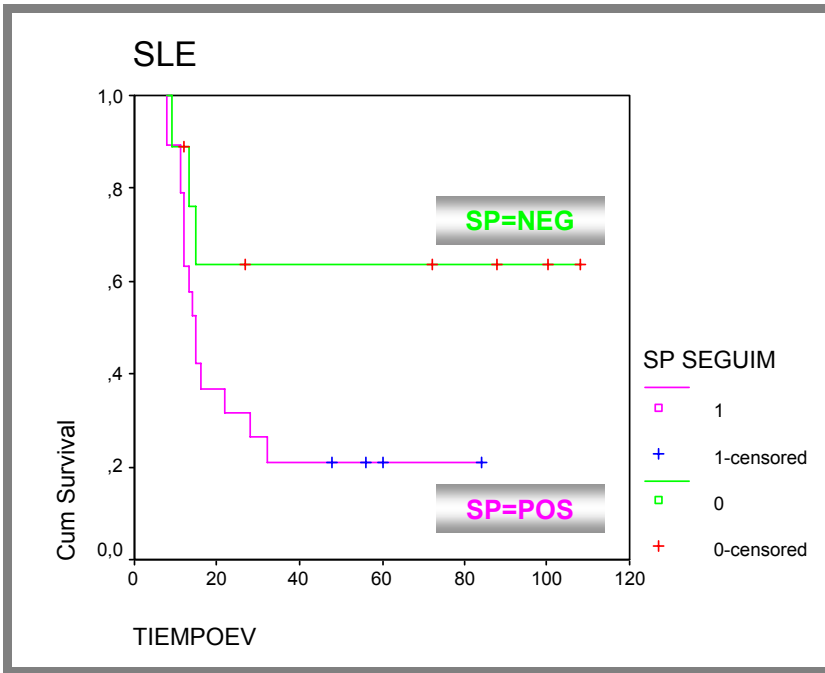


Fig. 62. Gráfica e Supervivencia Libre de enfermedad analizando la SP durante el seguimiento.

6.1.8- Análisis de Supervivencia global según la SP durante el seguimiento

Factor SP.SEGUIMIENTO = 0

Number of Cases:	9	Censored:	8	(88.89%)	Events:	1
Survival Time	Standard Error	95% Confidence Interval				
Mean:	97	10	(77, 117)			
(Limited to 108)						
Median:.						(. . .)

Factor SP.SEGUIMIENTO = 1

Number of Cases:	19	Censored:	6	(31.58%)	Events:	13
Survival Time	Standard Error	95% Confidence Interval				
Mean:	41	7	(27, 54)			
(Limited to 84)						
Median:	24	2	(21, 27)			

		Total	Number Events	Number Censored	Percent Censored
SPSEGUIM	0	9	1	8	88.89
SPSEGUIM	1	19	13	6	31.58
Overall		28	14	14	50.00
Test Statistics for Equality of Survival Distributions for SPSEGUIM					
	Statistic	df	Significance		
Log Rank	5.07	1	.0243		

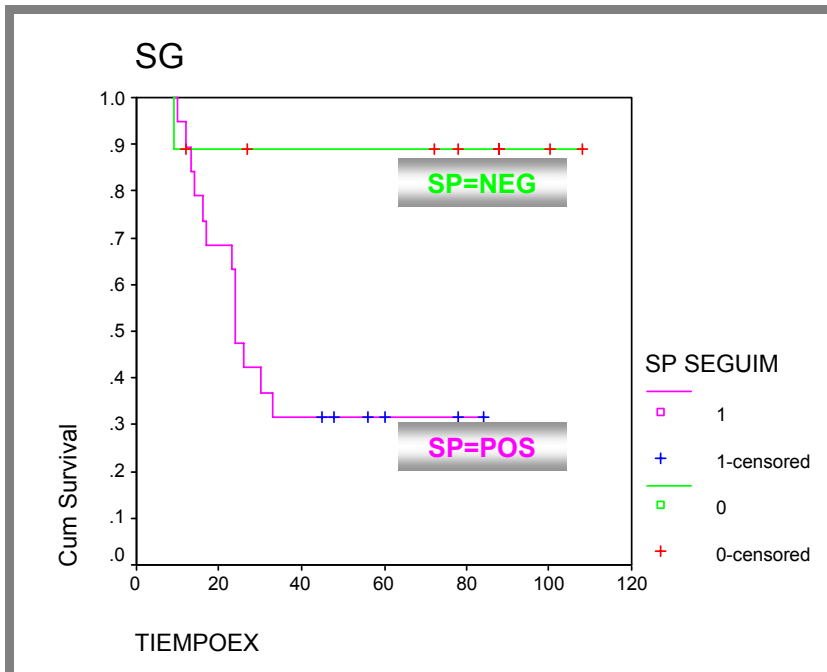


Fig.63. Gráfica e Supervivencia Global analizando la SP durante el seguimiento.

Se encontraron diferencias significativas en la supervivencia global, entre los pacientes con SP positivas durante el seguimiento y los que las tenían negativas.

Además, también se han encontrado diferencias en la evolución entre los pacientes que presentaban enfermedad micrometastásica al final del tratamiento, aunque la muestra sea muy reducida. Los 3 pacientes con MO positiva recayeron y fallecieron por progresión de la enfermedad y sólo uno de los 5 con MO negativa falleció.

Por tanto, la persistencia de enfermedad microcirculante y micrometastásica durante el seguimiento, se relaciona con una evolución más desfavorable, que se traduce con una SLE y SG menor.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En las dos últimas décadas, el avance más importante, alcanzado en el RMS y SE, ha sido el descubrimiento de los productos de fusión específicos de cada tumor y su utilización en el diagnóstico molecular mediante RT-PCR. Además, dicha técnica, tiene un potencial uso en el estadiaje de los pacientes, con un fin futuro de instaurar el tratamiento más adecuado.⁸³

A pesar de ello, sigue siendo imprescindible integrar el diagnóstico patológico, el clínico y de imagen, con el diagnóstico molecular. Un ejemplo muy claro quedaría resumido en el sarcoma bifenotípico. Éste se trata de un sarcoma extremadamente infrecuente, en el que coexisten marcadores con diferenciación muscular y neural. Generalmente expresan genes de fusión EWS-ETS con marcadores musculares o neurales, aunque también se han descrito expresión de genes PAX3/7-FKHR y de neuroblastomas.⁴¹⁻⁴³⁻⁴⁴ Así, por ejemplo, la presencia del producto de fusión EWS-ETS no es suficiente para el diagnóstico de SE.

A modo de ejemplo, el caso del sarcoma bifenotípico presentado (paciente nº16), inicialmente se diagnosticó como un RMSa, atendiendo exclusivamente a sus características morfológicas. A ese nivel, destacaba la escasa expresión de marcadores miogénicos, como MYOD1 y ausencia de desmina. Además se evidenció en análisis histoquímicos posteriores, que expresaba intensamente, el marcador CD99 en todas las células (marcador típico del SE). Posteriormente, en una muestra tumoral obtenida de una recaída, se evidenció aún más la escasez de marcadores miogénicos, la morfología en ese momento era mucho más inmadura. El diagnóstico definitivo se realizó gracias a la caracterización molecular del tumor, que expresaba además del producto de fusión PAX3-FKHR, la fusión EWS-Fli tipo1. Aunque no se trata del primer caso de sarcoma bifenotípico descrito (hay sólo 4 casos descritos hasta la fecha), este es el primer trabajo donde se analiza la enfermedad mínima residual de un paciente afecto por este tipo de tumor mediante RT-PCR en tiempo real. Se analizaron en sp y mo los marcadores expresados en el tumor primario. Es decir, EWS-Fli1 y los marcadores típicos del RMS alveolar (PAX3-FKHR, MYOD1 y RACH). La

expresión de los marcadores sigue una correlación casi absoluta, y tan solo hay discordancia en el número de células tumorales detectadas según el tipo de marcador empleado. Esto podría explicarse por la diferencia de sensibilidad de las diferentes técnicas (discretamente inferior en la detección de EWS-Fli1), o bien en el cambio evolutivo de expresión de los distintos marcadores durante la progresión de la enfermedad. Resulta asombrosa la correlación de los marcadores PAX3-FKHR y EWS-Fli1, de orígenes aparentemente tan dispares, con la evolución de la enfermedad. Además tanto MYOD1, como PAX3-FKHR y EWS Fli1 incrementaron su valor meses antes de la recaída clínica. Este caso demuestra que el seguimiento de la EMR mediante PCR, tiene resultados francamente fiables, sobretodo si disponemos de más de un marcador para realizar la monitorización.

A pesar de los tratamientos más intensivos que incluyen transplante de progenitores hematopoyéticos (TASPE), el RMS y el SE en estadios avanzados, siguen teniendo un pronóstico infausto. La posibilidad de detección de células tumorales residuales circulantes en sangre periférica (enf. microcirculante) o en médula ósea (enf. micrometastásica), puede ser de gran utilidad clínica.

La presencia de enfermedad microcirculante en leucemias y linfomas, tiene una importancia pronóstica muy conocida, y se conocen de forma precisa los valores y el momento de la enfermedad que comportan peor pronóstico.⁷⁶⁻⁷⁷ En el caso de los tumores sólidos, hay pocos datos definitivos de la importancia pronóstica de la enfermedad micrometastásica y microcirculante.

La enfermedad metastásica es uno de los factores de peor pronóstico en los RMS y SE. La detección en SP y MO de los productos de fusión específicos se han descrito ampliamente por diferentes autores.^{52, 53, 83} La médula ósea es un lugar de diseminación frecuente y la detección de células tumorales mediante técnicas basadas en la RT-PCR aumentan la sensibilidad enormemente respecto a los métodos meramente morfológicos.^{70,71, 78}

La detección de esta enfermedad mínima residual puede abordarse mediante diferentes estrategias, dependiendo del marcador que se exprese en el tumor primario. En nuestro estudio se han utilizado dos ensayos de PCR, la cualitativa y la cuantitativa o (en tiempo real), para la detección de los marcadores específicos de tumor (EWS-Fli1, EWS-ERG, PAX3-FKHR y PAX7/FKHR) y para los específicos de tejido (MYOD1 y RACH).⁸⁸

En nuestro trabajo publicado recientemente⁸⁸, se describe que en la PCR cuantitativa fue posible detectar 10 células tumorales entre 10^7 CMN en el caso de PAX3/7-FKHR, y de 100 células en 10^7 CMN en los casos de EWS-Fli1. La detección de EWS-ERG fue pobre y tan sólo se detectaba señal a partir de 10.000 cel tumorales x 10^7 CMN. Por otro lado, la especificidad de este método con estos marcadores fue muy alta.

Dado que la mayoría de RMS expresan las proteínas de regulación miogénica nucleares, MYOD1 y Miogenina, estos se han utilizado para la detección de la enfermedad mínima residual en los RMSa y RMSe.⁷⁴

En una serie de 35 casos de RMS se detectó el transcrito en casi todos los RMS y en ninguno de los tumores no-RMS. (Francella E, Rosolen A, 1998)⁸⁴. Estos mismos autores en un trabajo más reciente confirman los resultados, esta vez utilizando en algunas muestras la RT-PCR cuantitativa. Sin embargo en algunos estudios se ha referido la expresión de MYOD1 en tumores no-RMS³⁸.

74

En nuestro trabajo, basado en la RT-PCR cuantitativa, hemos encontrado una sensibilidad mayor de MYOD1 y RACH comparándolo con la expresión PAX3/7-FKHR y EWS-Fli1 aunque niveles muy bajos de expresión de MYOD1 en SP de donante sano. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado recientemente por Rosolen 2006.^{75,88}

El análisis de la subunidades alfa y gamma del RACH se basó en los trabajos previos descritos por Gattenlöhner et al³⁸. La base de la expresión del receptor de ACh en el RMS se basa en las similitudes que posee con el músculo fetal. En el músculo fetal, el receptor nicotínico de ACh contiene las subunidades α y γ , mientras que el músculo adulto cambia la subunidad γ por la

ε. En los RMS la expresión de γ se conserva de forma similar al músculo fetal. Mediante la utilización de una PCR dúplex, dichos autores describieron la presencia de ratios $\alpha / \gamma < 1$ en RMS, permitiendo la diferenciación con otros tumores. Además los mismos autores encontraron algunos SE y T Wilms con ratios α / γ similares a los RMS. Ellos suponían que era debido a la presencia de músculo denervado o a tumores con una cierta diferenciación rabdomiomatosa. En nuestro estudio encontramos expresión de ambas subunidades α y γ en todos los RMS analizados (22), aunque γ no siempre se expresaba más que α , concretamente un 63% tenían una ratio $\alpha/\gamma > 1$. Además se analizaron 13 tumores no-RMS, de los cuales 5 eran Neuroblastomas y 8 eran S.Ewing. Diez de los 13 (76.9%) expresaban más gamma que alfa (ratio $\alpha/\gamma < 1$). Estos resultados difieren sensiblemente a lo descrito por Gattenöhner, sobre todo en lo que refiere a la especificidad, porque los tumores tipo NBL carecen de diferenciación miogénica y en cambio algunos expresaban γ intensamente. Sin embargo, esto no limita la utilidad del RACH en el seguimiento del RMS, porque si bien no parece ser tan específico de los tumores RMS, no se expresa en absoluto en las muestras de SP de controles sanos.

En nuestro trabajo hemos analizado las muestras además, mediante PCR cuantitativa. La sensibilidad del ensayo fue parecida a la obtenida para MYOD1, (entre 1 y 10 cel. tumorales $\times 10^7$ CMN) pero además con ausencia de expresión en las muestras de donantes sanos. Sin embargo, y probablemente debido a las características de los cebadores escogidos, a concentraciones celulares superiores a 10^3 , se llegaba a una fase *plateau*, imposibilitando cuantificar exactamente concentraciones mayores.

La utilización del valor ΔCt (Ct gen problema – Ct TBP), como valor operativo en la interpretación y análisis de los resultados, permite comparar el valor ΔCt de la muestra problema y extrapolarla a un determinado número de células tumorales diluidas en 10^7 CMN. Este método de análisis, a nuestro modo de ver, resulta más preciso e intuitivo que la utilización aislada del valor Ct , como proponen algunos autores⁷⁵, porque ΔCt incluye una normalización previa con un gen constitucional (TBP en nuestro caso), lo que añadiría al análisis una idea

de la cantidad de expresión del gen problema con respecto a la expresión de un gen normal.

En los RMSs hemos detectado, mediante RT-PCR en tiempo real, afectación en médula ósea al diagnóstico en el 63% de los casos. Sólo 2 muestras fueron positivas desde el punto de vista citológico. Ambos pacientes tenían afectación cortical y metástasis pulmonares. Este aumento en la detección de las micrometástasis se ha descrito anteriormente en el SE (Peter et al 1995, Fagnou 2003)^{47, 52} y en el Neuroblastoma (Cheung et al 2003, Pession et al 2003)^{85, 86}. Pero en el caso del RMS se desconoce el impacto pronóstico de la enfermedad micrometastásica. Athale et al ⁸⁷, describe 3 pacientes con MO positiva únicamente por RT-PCR. Todos ellos tenían metástasis a distancia. Kelly, et al⁷⁸ describió 2 pacientes más con metástasis en MO, sólo detectados por RT-PCR, que también fallecieron ambos por progresión de la enfermedad.

Nosotros no encontramos diferencias en el pronóstico entre los pacientes positivos y negativos, aunque cabe subrayar que 10 de los 11 pacientes con MO positivas (90%) presentaron una recaída local o metastásica, y el 79% de ellos fallecieron por progresión de la enfermedad. Los 3 pacientes con MO negativa están todos ellos libres de enfermedad hasta el momento (mediana de seguimiento de 80m). Además los pacientes con micrometástasis en MO (detectados sólo por RT-PCR), fueron clínicamente asignados como localizados y tratados en concordancia.⁸⁸

En el trabajo publicado recientemente por Sartori y Rosolen, 2006,⁷⁵ analizan la EMR, mediante RT-PCR cuantitativa una serie de 40 RMS utilizando como marcadores MYOD1, miogenina y PAX3/7-FKHR (en el caso de ser RMSa). Ellos incrementan la sensibilidad de MYOD1 hasta 3 log los resultados descritos por autores anteriores ³⁸, Defienden además, la especificidad de MYOD1, al obtener resultados concordantes el resto de marcadores utilizados (miogenina y PAX3/7-FKHR). Dichos autores observan un hecho igualmente observado en nuestro estudio⁸⁸, y es que la utilización de PCR en tiempo real incrementa el nivel de detección (positivización de muestras que resultaron negativas por PCR cualitativa). Esto sugiere que la presencia de enfermedad

micrometastásica comporta un riesgo mayor a presentar enfermedad diseminada. De todos modos, resulta imperativo realizar un estudio más amplio y multicéntrico para establecer con claridad la importancia pronóstica de la enfermedad micrometastásica.

La detección de enfermedad microcirculante al diagnóstico se demostró en 43% de los RMS. Seis de ellos (85%) recayeron y 4 (66%) de ellos murieron por progresión de la enfermedad. Por otro lado, de los 8 pacientes con SP negativas al diagnóstico, 4 fallecieron. La presencia de enfermedad microcirculante al diagnóstico es un hecho frecuente y ampliamente descrito en otros tumores como el neuroblastoma y el SE ^{52, 69}. Nosotros no encontramos ninguna correlación entre la presencia de células tumorales al diagnóstico y la evolución, coincidiendo con lo descrito previamente en el SE por Avigad et al, Fagnou et al y en el RMS por Thomson et al. ^{52, 70, 71}

En el caso del SE, fue más frecuente encontrar enfermedad microcirculante al diagnóstico (66%), si bien 7 de los 8 presentaban fases avanzadas de la enfermedad (enfermedad metastásica). Estos datos coinciden con lo descrito para el caso del Neuroblastoma (Burchill et al. 2001) y el Rbdomiosarcoma (Thomson et al). ⁶⁹⁻⁷¹. No encontramos ninguna relación entre la presencia o ausencia células microcirculante y la evolución clínica, hecho que coincide otra vez plenamente con lo descrito por otros autores. ⁷⁰

Por otro lado, la persistencia o reaparición de enfermedad microcirculante se relacionó con un peor pronóstico, comparándolo con aquellos pacientes que permanecían constantemente con SP negativas durante el seguimiento. Debido al tamaño de la muestra no es posible analizar el impacto de la enfermedad microcirculante comparándolo con otros factores pronósticos del RMS.

En el caso del SE, detectamos con más frecuencia (83%) enfermedad microcirculante durante el seguimiento. El 58% presentaron recaídas y murieron por progresión de la enfermedad. Los tres pacientes que continúan en RC a pesar de presentar enfermedad microcirculante detectada por PCR en tiempo

real mucho tiempo después de finalizar el tratamiento, presentaban curiosamente muestras negativas mediante RT-PCR cualitativa. Dicha discordancia es explicable porque la PCR en tiempo real posee mayor sensibilidad que la PCR “convencional” (aumento de un logaritmo el umbral de detección). Este hecho fue descrito en nuestro trabajo recientemente publicado⁸⁸ y también observado por Sartori F. et al ⁷⁵, en la expresión de MYOD1 en el RMS.

En el RMS se detectó un índice de infiltración de MO al diagnóstico del 63%. El 90% de los pacientes con MO positivas (por RT-PCR), presentaron recaída (local o metastásica) y de ellos el 79% fallecieron por progresión de la enfermedad. En cambio, de los 4 pacientes con MO negativas al diagnóstico, uno presentó una recaída local, pero los tres están actualmente libres de enfermedad y en RC.

En el caso del SE, la presencia de enfermedad micrometastásica al diagnóstico, fue mayor (75%) que en el caso del RMS, pero acompañada de una tasa de eventos menor (66% de los pacientes con MO positiva al diagnóstico, fallecieron). Además, los pacientes que a pesar de presentar MO positiva al diagnóstico siguen en RC, mantuvieron una enfermedad microcirculante persistente (por PCR cuantitativa) durante parte del seguimiento.

En nuestro estudio, a pesar de describir y estudiar individualmente cada marcador y cada paciente, hemos hecho el análisis de supervivencia conjunto incluyendo los pacientes afectados de SE, RMSa y RMSe, con el fin de aumentar la consistencia. A pesar de tratarse de tumores morfológicamente distintos, tienen (excepto el RMSe) aparentemente, una tendencia similar a la diseminación metastásica. De esta forma se pretende analizar el papel de la presencia de células circulantes en la evolución posterior, independientemente de las características intrínsecas de cada tumor, con la finalidad de determinar el valor real de de la enfermedad microcirculante en los tumores sólidos.

Se han encontrado diferencias significativas en la supervivencia global entre los pacientes con SP positivas durante el seguimiento y los que las tenían

negativas. Además, también se han encontrado diferencias en la evolución entre los pacientes que presentaban enfermedad micrometastásica al final del tratamiento, aunque la muestra sea muy reducida. Los 3 pacientes con MO positiva recayeron y fallecieron por progresión de la enfermedad, y sólo uno de los 5 con MO negativa falleció. Fagnou et al, 1998,⁵⁷ ya sugirieron que la presencia de micrometástasis en MO parece indicar el riesgo a presentar metástasis a distancia, y por tanto sería un indicador de enfermedad diseminada.

En el presente estudio, en cambio, y a diferencia de lo descrito por varios autores^{47, 52, 87, 78}, tanto en el RMS como en el SE, no encontramos diferencias en la supervivencia global, entre los pacientes con MO al diagnóstico positiva y negativa. Este resultado podría tener diferentes interpretaciones:

Una sería, la limitación y posible sesgo debido al tamaño de la muestra, siendo imperativo en el futuro crear un registro a nivel internacional, para reclutar el mayor número de casos posibles.

Otra explicación, ya insinuada en nuestro trabajo publicado (Gallego, Llorc et al 2006)⁸⁸ y por Sartori y Rosolen 2006, es que todos los estudios descritos hasta la fecha en los que se apuntaba el valor pronóstico desfavorable de la enfermedad micrometastásica se basaban en métodos cualitativos de PCR. Esto sugiere que al utilizar nosotros un método más sensible se produciría un aumento de prevalencia de la enfermedad micrometastásica, que no siempre comportaría un mal pronóstico. Esta observación parece más aplicable al SE, ya que parece presentar más enfermedad micrometastásica y microcirculante persistente.

A modo de resumen, concluiríamos que, la persistencia de enfermedad microcirculante y micrometastásica durante el seguimiento, se relaciona con una evolución más desfavorable, que se traduce con una SLE y SG menor.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1- La detección de de la enfermedad residual mínima en el RMS y el SE, mediante RT-PCR en tiempo real, es factible y reproducible.
- 2- La sensibilidad de la RT-PCR en tiempo real es superior a la PCR “convencional” (cualitativa).
- 3- La utilización de múltiples marcadores para la monitorización de la enfermedad mínima residual, permite aumentar la fiabilidad de los resultados, disminuyendo así los falsos positivos.
- 4- El análisis de la expresión de MYOD1 mediante PCR en tiempo real, es el método más sensible de todos los analizados en el estudio.
- 5- El análisis mediante RT-PCR de la expresión de EWS-Fli1, PAX3/7-FKHR, MYOD1 y ACh en MO, permite incrementar la sensibilidad respecto a la citología convencional.
- 6- La RT-PCR en tiempo real permite una cuantificación relativa de la presencia de células tumorales. Al utilizar como valores de referencia las muestras de *spiking* para cada marcador y realizando el cálculo mediante el Δ CT se pueden cuantificar las muestras problema. De esta forma, se asigna para un valor Δ CT determinado, el equivalente en células tumorales $\times 10^7$ células mononucleadas.
- 7- La detección de células tumorales circulantes al diagnóstico, mediante RT-PCR, es frecuente en el RMS y el SE, sin que este hecho tenga ningún valor pronóstico.
8. La enfermedad micrometastásica en MO al diagnóstico y al final del tratamiento, se relaciona con una evolución más desfavorable. Es necesario investigar con mayor profundidad, el verdadero valor pronóstico de las micrometástasis en MO de aquellas muestras consideradas negativas mediante citología.

9- Los pacientes con persistencia o reaparición de células tumorales circulantes, durante el seguimiento, tienen un factor de mal pronóstico.

10- Durante el seguimiento, la reaparición de células tumorales (positivización), puede predecir una recaída.

11- La cuantificación de la EMR puede contribuir al cálculo estimado del riesgo de recaída de un paciente individual.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, et al. NCI. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995. National Cancer institute.
2. Maurer HM, Beltangady M, Gehan EA, et al. The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-I. A final report. *Cancer*. 1988; 61:209–20.
3. Arndt CA, Crist WM. Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence. *NEngl J Med* 1999; 341:342–52.
4. Pappo AS, Shapiro DN, Crist WM, Maurer HM. Biology and therapy of pediatric rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 1995; 13:2123–39.
5. Horn Jr RC, Enterline HT. Rhabdomyosarcoma: a clinicopathological study and classification of 39 cases. *Cancer* 1958; 11:181–99.
6. Parham DM, Webber B, Holt H, Williams WK, Maurer H. Immunohistochemical study of childhood rhabdomyosarcomas and related neoplasms. Results of an Intergroup Rhabdomyosarcoma study project. *Cancer* 1991; 67:3072–80.
7. Cessna MH, Zhou H, Perkins SL, et al. Are myogenin and MYOD1 expression specific for rhabdomyosarcoma? A study of 150 cases, with emphasis on spindle cell mimics. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(9):1150–7.
8. Newton WA Jr, Gehan EA, Webber BL, Marsden HB et al. Classification of Rhabdomyosarcomas and related sarcomas: pathologic aspects and proposal for a new classification-and Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. 1995. *Cancer* 76: 1073-1085.
9. Goulding M., Sterrer S, Fleming J. et al. Analisis of Pax 3 gene in the mouse mutant splotch. *Genomics* 17: 335-363.
10. Mansouri A., Stoykova A, Torres M, Gruss P, 1996. Disgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7^{-/-} mutant mice. *Development* 122:831-838.
11. Datsun G, Lamar Eolivier M, Goulding M. 1996. Pax3 is necessary for migration but not for differentiation of limb muscle precursors in the mouse. *Development* 122:1017-1027.
12. Sabourin L, Rudnicki MA, 2000. The molecular regulation of myogenesis. *Cingenet*. 57, 16-25.

13. Kinga K Tomczak, Voichita D Marianescu, Marco F Ramoni et al. Dec 2003. Expresión profiling and identification novel genes involved in myogenic differentiation. The FASEB journal express article 10.1096.
14. Li FP, Fraumeni JR, Manfredi JJ. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a family cancer syndrome. J Natl Cancer Inst. 1969; 43: 1365-73.
15. Li FP, Fraumeni JR, Mulvihill JT, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. Cancer Res. 1988; 48: 5358-62.
16. Sorensen PHB, Lynch Qualman SJ., et al. PAX3-FKHR and PAX1-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma. A report from children oncology group. J Clin Oncology 2002; 20:2672-9.
17. Meddeb M, Valent A, Danglot G, Nguyen VC, et al. 1996. MDM2 amplification in a primary alveolar rhabdomyosarcoma displaying a t(2;13)(q32;q14) Genet Cell Genet 73 :325-330.
18. Steilen-Gimbel H, Rembenguer K, Graf N, Steudel WI et al. 1996. A novel site of amplification on chromosome 1p32-33 in rhabdomyosarcoma revealed by comparative genomic hybridation. Hum Genet 97:87-90.
19. Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G. 1997. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. EMBO J. 16: 2985-2995.
20. Khan J, Simon R, Bittner M, et al. 1998. Gene expression profiling of alveolar rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays. Cancer Res 58:5009-5013.
21. Kumar S, Perlman E, Harris CA, et al. Myogenin is a specific marker for rhabdomyosarcoma: and immunohistochemical study in paraffin-embedded tissues. Mod Pathol 2000; 13:988-93.
22. Kodet R, Newton WA, Hamoudi A, et al. 1993. Childhood rhabdomyosarcoma with anaplasia (pleomorphic) features: a report of the intergroup rhabdomyosarcoma study. Am J. Surg. Pathol. 17, 443-453.
23. Sheer CJ, Mammalian C1 cyclins. Cell 73, 1059-1065.
24. Ragazzini P, Gamberi G, Pazaglia L, et al. Amplification of CDK4, MDM2, SAS and GLI genes in leiomyosarcoma, alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. Histol Histopathol. 2004. 19: 401-411.
25. Besnard-Guerin C, Newsham I, Winqvist R, et al. 1996. A common region loss of heterozygosity in Wilms tumor and embryonal rhabdomyosarcoma

- distal to the D11S988 locus on chromosome 11p15.5. *Hum Genet.* 97:163-170.
26. Visser M, Sijmons C, Bras J. Allelotype of pediatric rhabdomyosarcoma. *Oncogene.* 1997. 15: 1309-1014.
 27. Scrabble H, Cavenee W, Ghavimi F, et al. 1989. A model for embryonal rhabdomyosarcoma tumorigenesis that involves genomic imprinting. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989. 86: 7480.
 28. Shapiro DN, Jones BG, Shapiro LH. 1994. Antisense-mediated reduction in insulin-like growth factor-I receptor expression suppresses the malignant phenotype of a human alveolar rhabdomyosarcoma. *J Clin Invest* 94: 1235-1242.
 29. Sabbioni S, Barbanti-Brodano G, Groce CM. 1997. GOK: a gene at 11p15 involved in rhabdomyosarcoma and rhabdoid tumor development. *Cancer Res* 57:4493-4497.
 30. Anderson J, Gordon A, Pritchard-Jones et al. 1999. Genes, chromosomes and rhabdomyosarcoma. *Genes, Chrom Cancer.* 26:275-285.
 31. Carpentieri DF, Nichols MDK, Chou PM, et al. The expression of WT1 in the differentiation of Rhabdomyosarcoma from other pediatric small round blue cell tumors. *Mod Pathol* 2002. 15 (10): 1080-1086.
 32. Roninson IB, 1991. Molecular and cellular biology of multidrug resistance in tumor cells. New York. Plenum Press.
 33. Oda Y, Schneider-Stock R, Van de Graaf W, et al. 1996. Expresión of multidrug resistance-associated protein gene in human soft-tissue sarcomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 122:161-165.
 34. Gallego S, Llorca A, Parareda A, et al. 2004. Expresión of multidrug resistance-1 and multidrug resistance associated protein genes in pediatric rhabdomyosarcoma. *Onco Rep.* 11:179-183.
 35. Wang Q, Beck WT. 1998. Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild type p53. *Cancer Res.* 58:5762-5769.
 36. Changeux JP. Functional organization of the nicotinic acetylcholine receptor. *CR Acad Sci III.* 1992; 314 (Suppl 9); 89-94.
 37. Gattenlöhner S, Müller-Hemerlink HK, Marx A. Polymerase chain reaction-based diagnosis of Rhabdomyosarcomas: Comparison of fetal type

- Acetylcholine Receptor subunits and myogenin. *Diag. Mol Pathol.* 1998. 7(3): 129-134.
38. Gattenlöhner S, Dokhorn-Dworniczak B, et al. A comparison of MYOD1 and fetal Acetylcholine Receptor expression in childhood tumors and normal tissues. Implications for the molecular diagnosis of minimal residual disease in Rhabdomyosarcomas. *J Mol Diag* 1999. 1: 23-31.
39. Sorensen P, Lynch JC, Qualman SJ, et al. Pax3-FKHR and Pax7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar Rhabdomyosarcoma: A report from the children's Oncology group. *J Clin Oncol.* 2002. Vol 20, 11 (June 1), 2002: pp 2672-2679.
40. Fitzgerald J, Scherr A, Barr F. 2000. Structural analysis of Pax 7 rearrangements in alveolar Rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet Citogenet.* 117: 37-40.
41. Sorensen P, Shimada H, Liu XF et al. Biphenotypic sarcomas with myogenic and neural differentiation express the Ewing's Sarcoma EWS-Fli1 fusion gene. *Cancer Res.* 1995. 55: 1385-1392.
42. Tan S, Burchill S, Brownhill SC, et al. Small round cell tumor with biphenotypic differentiation and variant of t(21;22)(q22;q12). 2001. *Pediatr Dev Pathol.* 4; 391-396.
43. Thorner P, Squire J, Chilton-Mac Neil S, et al. 1996. Is the EWS-Fli transcript specific for Ewing Sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor? A report of four cases showing these transcripts in a wider range of tumor types. *Am J Pathol.* 148:1125-1138.
44. Burchill SA, Wheeldon J, Culinane C, et al. 1997. Ews-Fli fusion transcripts identified in patients with typical neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 33 : 239 :243.
45. Sorensen P, Triche TJ. 1996. Gene fusions encoding chimaeric transcription factors in solid tumors. *Seminars Cancer Biol.* 7:3-14.
46. Urano F, Umezawa A, Hong V, et al. A novel chimera gene between EWS and EIA-F, encoding the adenovirus enhancing-binding protein, in extraosseous Ewing's sarcoma. 1996. *Biochem Biophys Res Commun.* 219: 608-612.
47. Peter M, Couturier J, Pacquement H, et al. 1997. A new member of ETS family fused to EWS in Ewing's tumors. *Oncogene.* 15 : 1159-1164.

48. Hattinger CM, Rumper S, Strhl, et al. 1999. Prognostic impact of deletions at 1p36 and numerical aberrations in Ewing tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 24: 243-254.
49. Knezevich S, Henson G, Mathers J, et al. 1998. Absence of detectable EWS-Fli1 expression after therapy-induced neural differentiation in Ewing Sarcoma. *Human Pathol*. Vol 29, N°3 (March 1998).289-294.
50. Rorie C, Thomas V, Chen P, et al. 2004. The EWS-Fli1 fusion gene switches the differentiation program of Neuroblastomas to Ewing Sarcoma/Peripheral Primitive Neuroectodermal tumors. *Cancer res*. Feb (15). 64:1266-1277.
51. Collini P, Mezzelani A, Modena P, et al. 2001. Evidence of Neural differentiation in a case of post-therapy Primitive Neuroectodermal tumor/Ewing Sarcoma Of Bone. *The American J of Surg Pathol*. 27(8): 1161-1166.
52. Fagnou C, Michon J, Peter M, et al. 1998. Presence of tumor cells in bone marrow but not in blood is associated with adverse prognosis in patients with Ewing's tumor. *J Clin Oncol*.16: 1707-1711.
53. Schleiermacher G, Peter M, Oberlin O, et al. 2003. Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumor cells in localized Ewing tumor. *JCO*. 21:85-91.
54. Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, et al 1996. Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk Groups of Ewing tumor patients?. *JCO*. 14:1245-1251.
55. de Alava, Kawai A, Healy JH, et al. 1998. EWS-Fli fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's Sarcoma. *JCO*. 16:1248-1255.
56. de Alava E, Lozano MD, Patino A et al. 1998. Ewing family tumors: potential prognostic value of reverse-transcriptase polymerase chain reaction detection of minimal residual disease in peripheral blood samples. *Diag Mol Pathol*. 7: 152-157.
57. Avigad S, Cohen I, Zilberstein J, et al. 2004. The potential of Molecular detection in nonmetastatic Ewing Family of tumors. *Cancer*. 100: 1053-1058.
58. Delattre O, Zucman J, Melot T, et al. 1994. The Ewing family of tumours : a subgroup of small round cell tumours defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med*. 331: 294-299.

59. Zucman J, Melot T, Desmaze C, et al. 1993. Combinatorial generation of variable fusion proteins in peripheral primitive neuroectodermal tumors. *EMBO J.* 12:4481-4487.
60. Sorensen PHB, Lessnick SL, Lopez-Terrada D. 1994. A second Ewing's Sarcoma translocation, t(21;22) fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nature Genet.* 6:146-151.
61. Delattre O, Zuckman J, Plougastel B. 1992. Gene fusion with an ETS domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature.* 359: 162-165.
62. Merino M, Navid F, Christensen B, et al. 2001. Immunomagnetic purging of Ewing's Sarcoma from blood and Bone Marrow: Quantification by Real Time Polymerase Chain Reaction. *JCO.* Vol 19, N° 16 (August 15), 2001:3649-3659.
63. Chomczynski P, Sacchi N. 1987 Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* Apr; 162(1): 156-159.
64. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, second edition, 1989.
65. Cox RA. The use of guanidium chloride in the isolation of nucleic acid. *Methods Enzymol*, 1968, 12: 120-129.
66. Ausubel FM, eds., *Current Protocols in molecular Biology* 2, 11.5.1, 1989.
67. May, 1993
68. Lee LG, Connell CR, Bloch W. 1993. *Nucleic Acids Res.* Aug 1; 21(16):3761-6.
69. Burchill SA, Lewis IJ, Abrams KR, et al. (2001) Circulating neuroblastoma cells detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction for Tyrosine Hydroxylase mRNA are an independent poor prognostic indicator in stage 4 neuroblastoma in children over 1 year. *J Clin Oncol* 19:1795-1801
70. Avigad S, Cohen IJ, Zilberstein J, Liberzon E, Goshen Y, Ash S, Meller I, Kollender Y, Issakov J, Zaizov R, Yaniv I (2004) The predictive potential of molecular detection in the nonmetastatic Ewing family of tumors. *Cancer* 100:1053-1058
71. Thomson B, Hawkins D, Felgenhauer J, Radich (1999) RT-PCR evaluation of peripheral blood, bone marrow and peripheral blood stem cells in children

- and adolescents undergoing VACIME chemotherapy for Ewing's sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma. *Bone Marrow Transplantation* 24:527-533
72. Sebire, Malone M. Myogenine and MYOD1 expression in paediatric rhabdomyosarcomas. *J Clin Pathol.* 2003; 56:412-416.
73. Cui S, Hano H, Harada T, Takai S, Masui F, Ushigome S. Evaluation of new monoclonal anti MYOD1 and anti-myogenin antibodies for the diagnosis of rhabdomyosarcoma. *Pathol Int.* 1999; 49: 62-68.
74. Michelagnoli MP, Burchill SA, Cullinane C, et al. Myogenine a more specific target for RT-PCR detection of rhabdomyosarcoma than MYOD1. *Med Ped Oncol.* 2003; 40:1-8.
75. Sartori F, Alaggio R, Zanazzo G, Garaenta A, Di Cataldo A, Carli M, Rosolen A. Results of a Prospective minimal disseminated disease study in human Rhabdomyosarcoma using three different molecular markers. *Cancer.* 2006; 1766-1775.
76. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukaemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995, 85(6): 1416-1434.
77. Campana D, Neale GA, Coustan-Smith E, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia: the Sant Jude experience. *Leukaemia* 2001, 15(2):278-279.
78. Kelly K, Wormer R, Barr F. Minimal disease detection in patients with alveolar Rhabdomyosarcoma using RT-PCR method. *Cancer* 1996;15:1320.
79. Gallego S, Llorca A, Parareda A, et al. Evaluation of fusion products in peripheral blood, bone marrow and peripheral blood stem cells in children with alveolar rhabdomyosarcoma and Ewing sarcoma by RT-PCR. *Med Pediatr Oncol* 2001, 37:172.
80. Naito N, Kawai A, et al. A reverse transcriptase-PCR assay in the diagnosis of Soft tissue Sarcomas. *Cancer* 2000, 89:1992-1997.
81. Vorobyov, E, Mertsalov, I, Dockhorn-Dworniczak B, Horst J. The genomic organization and the full coding region of the human Pax7 gene. *Genomics* 1997. 45(1) 168-174. 1-10.
82. Obata K, Hiraga H, Nojima T, Yoshida M, Abe S. Molecular characterization of the genomic breakpoint junction in a t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. *Cancer* 1999, 25(1) 6-15.

83. Burchill S. Ewing Sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities. *J.Clin. Pathol.* 2002, 96-102.
84. Sartori F, Rosolen A.; Detection of the MYOD1 transcript in Rhabdomyosarcoma cell lines and tumor samples by reverse transcription polymerase chain reaction. *Am J.Pathol.* 1999. 152:577-83.
85. Cheung IY, Lo Piccolo MS, Kushner BH, Cheung NK. Early molecular response of bone marrow disease to biologic therapy is highly prognostic in Neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 21: 3853-58.
86. Pession A, Libri V, Sartini R, Conforti R, Magrini E, Bernardi L, Fronza R, Olivetto E, Prete A, Tonelli R, Paolucci G. Real time RT-PCR of tyrosine hydroxylase to detect bone marrow involvement in advanced neuroblastoma. *Oncol Rep.* 2003, 10; 357-62.
87. Athale U, Shurtleff S, Jenkins J, Poquette C, Tan M, Downing J, Pappo A . Use of reverse transcriptase polymerase chain reaction for diagnosis and staging of alveolar rhabdomyosarcoma, Ewing sarcoma family tumors, and desmoplastic small round cell tumor. 2001. *J.Pediatr.Hematol Oncol.* 23:99-104.
88. Gallego S, Llorca A, Roma J, Sábado C, Gros L, Sánchez de Toledo J. Detection of bone marrow micrometastasis and microcirculating disease in Rhabdomyosarcoma by Real-Time-RT-PCR Assay. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006 Jun; 132(6):356-362. 2006.
89. Rosoff PM, Hatcher S, West DC. Biphenotypic sarcoma with characteristics of both a Ewing sarcoma and a desmoplastic small round cell tumor. *Med Pediatr Oncol.* 2000 Jun; 34(6): 407-12.
90. Tan SY, Burchill S, Brownhill SC, Gerrard MP, Watmore A, Wagner BE, Variend S. Small round cell tumor with biphenotypic differentiation and variant of t(21;22)(q22;q12). *Pediatr Dev Pathol.* 2001 Jul-Aug;4(4):391-6.
91. de Alava E, Lozano MD, Sola I, Panizo A, Idoate MA, Martínez-Isla C, Forteza J, Sierrasesumaga L, Pardo-Mindan FJ. Molecular features in a biphenotypic small cell sarcoma with neuroectodermal and muscle differentiation. *Hum Pathol.* 1998 Feb; 29(2):181-4.
92. Sorensen PH, Shimada H, Liu XF, Lim JF, Thomas G, Triche TJ. EWS/FLI1 Biphenotypic sarcomas with myogenic and neural differentiation express the Ewing's sarcoma fusion gene. *Cancer Res.* 1995 Mar 15; 55(6): 1385-92.