

ARTÍCULO ORIGINAL

Diagnóstico molecular en biopsias de sarcoma de Ewing y rhabdomyosarcomas pediátricos: experiencia en el Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez

Molecular diagnosis applied to Ewing's sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma biopsies: experience at the "Dr. Ricardo Gutiérrez" Children's Hospital, Buenos Aires, Argentina

Massone, Carla Antonella^{1,4*}; Colli, Sandra²; García Lombardi, Mercedes³; De Matteo, Elena^{1,2}; Preciado, María Victoria¹.

¹Instituto Multidisciplinario de Investigación en Patologías Pediátricas (IMIPP), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

²División Patología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

³Unidad de Oncología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

⁴Instituto Nacional del Cáncer (INC). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Massone, Carla Antonella. Instituto IMIPP-CONICET-GCBA, División Patología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Gallo 1330 [C1425EFD]. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; carlamassonehp@gmail.com

Resumen Introducción: los tumores de partes blandas representan el 6% de los cánceres pediátricos anuales, según el Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino. Para sarcoma de Ewing (SE) y rhabdomyosarcoma (RMS) se describieron translocaciones cromosómicas específicas, aplicadas a la clasificación molecular, diagnóstico diferencial y/o pronóstico. Objetivos: realizar la clasificación molecular de casos con sospecha diagnóstica de SE y RMS y evaluar el impacto de conservación de biopsias sobre la integridad de ácidos nucleicos. Materiales y métodos: se enrolaron niños menores de 18 años con sospecha de SE y RMS. Se estudiaron biopsias de tumor primario, algunas conservadas a -70°C y otras embebidas en parafina (FFEP) y, además, aspirados de médula ósea. Se extrajo el ARN con 1) *Trizol* y 2) *Recover All Total Nucleic Acid Isolation*. Se realizaron las técnicas de FISH (*fluorescence in situ hybridization*), RT-PCR-secuenciación para *EWS-FLI1* [t(11;22)(q24;q12)]/*EWS-ERG* [t(21;22)(q22;q12)] en SE y *PAX3-FOXO1* [t(2;13)(q35;q14)]/*PAX7-FOXO1* [t(1;13)(p36;q14)] en RMS. Resultados: Se incluyeron pacientes con SE (n = 13) y RMS (n = 4). Se estudiaron 17 biopsias de tumor primario: 7 conservadas a -70°C y 12 FFEP y 2 aspirados de médula ósea. Se detectó por FISH el rearreglo de *EWS1*: 9/13 SE y *FOXO1*: 3/4 RMS. Se amplificó el gen *PGK* por RT-PCR y se obtuvo positivo en 8/12 biopsias FFEP y 7/7 muestras congeladas [5 biopsias y 2 aspirados medulares]; se detectó RT-PCR en SE *EWS-FLI1* en 7/8 muestras [2 tipo 1; 3 tipo 2; 1 tipo 4 y 1 translocación *EWS* exón 7/*FLI1* exón 4]. En RMS se detectó *FOXO1-PAX3* en 1/3 y *FOXO1-PAX7*, en 0/3. En RMS 1/3 se confirmó subtipo embrionario por RT-PCR, en discordancia con FISH. En SE 2/2 se confirmó ausencia de infiltración en médula ósea [MO]. Conclusiones: la biopsia en fresco a -80°C demostró mejor preservación de ARN que la FFEP. La secuenciación permitió identificar los puntos de ruptura y en SE., detectar un rearreglo infrecuente. En RMS la discordancia plantea considerar valores de corte en FISH.

Palabras clave: sarcoma de Ewing, rhabdomyosarcoma alveolar, FISH, *fluorescence in situ hybridization*, transcripts de fusión, RT-PCR, retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa.

Abstract Introduction: In Argentina, soft tissue tumors represent about 6% of the annual pediatric cancer cases (*Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino*). Chromosomal translocations described for Ewing's sarcoma (ES) and rhabdomyosarcoma (RMS) can be applied to molecular classification and differential diagnosis and/or prognosis. Aims: To confirm diagnosis of pediatric ES and RMS by means of molecular classification and to evaluate the impact of the biopsy preservation procedure on the integrity of nucleic acids. Materials and methods: Children younger than 18 years with ES (n=13) and RMS (n=4) were enrolled. Seventeen primary tumor biopsies [7 stored at -70° C and 12 formalin-fixed paraffin-embedded (FFEP)] and two bone marrow aspirates were studied. RNA was isolated by *Trizol* or *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation*. *EWS-FLI1* [t(11;22)(q24;q12)]/*EWS-ERG* [t(21;22)(q22;q12)] in ES and *PAX3-FOXO1* [t(2;13)(q35;q14)]/*PAX7-FOXO1* [t(1;13)(p36;q14)] in RMS were assessed by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and RT-PCR followed by sequencing. Results: The rearrangement of *EWS1* was detected by FISH in 9/13 ES, whereas that of *FOXO1* was detected in 3/4 RMS. *PGK* amplification by RT-PCR was positive in 8/12 FFEP and 7/7 frozen samples [five biopsies and two bone marrow aspirates]. In ES, *EWS-FLI1* was detected by RT-PCR in 7/8 samples [two type 1, three type 2, one type 4 and one *EWS* exon 7/*FLI1* exon 4 translocation]. In RMS, *FOXO1-PAX3* was present in 1/3 and *FOXO1-PAX7* in 0/3 samples. One RMS was diagnosed as embryonic subtype by RT-PCR, but FISH failed to accurately classify the case. In 2/2 samples, the absence of BM infiltration was confirmed. Conclusions: RNA integrity was better conserved in frozen than in FFEP biopsies. Fusion transcripts allowed identifying the break-points and, in ES cases, an uncommon rearrangement was detected. The mismatch in RMS led to reconsider the FISH cut-off value.

Keywords: Ewing's sarcoma, alveolar rhabdomyosarcoma, *in situ* hybridization fluorescence, fusion transcripts, reverse transcriptase polymerase chain reaction

Introducción

La patología oncológica es poco frecuente en la edad pediátrica, sin embargo, es la primera causa de muerte por enfermedad en el grupo etario de 5 a 15 años, por lo cual el desarrollo de estrategias diagnósticas y abordajes terapéuticos de gran especificidad son una necesidad. Según el Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino (ROHA), cada año, alrededor de 1322 niños son diagnosticados con cáncer, con una tasa de incidencia anual de alrededor de 130 casos por millón de niños menores de 15 años. Los diagnósticos más frecuentes son: leucemias (37 %), tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), intraespiniales (19 %) y linfomas (12 %), seguidos por tumores de partes blandas (6 %; dentro de este grupo, un 48 % corresponde a rhabdomyosarcomas -RMS-), neuroblastomas (5,7 %), tumores renales (4,8 %) y óseos (4,7 %; dentro de este grupo, el sarcoma de Ewing (SE) corresponde al 33 %). Del total de niños incluidos en el ROHA, el 74 % fueron registrados por hospitales públicos, 16 %, por centros privados y 10 %, por otras fuentes (registros poblacionales, servicio de patología, certificados de defunción, etc.). El Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez como reflejo de estos datos y como centro de referencia recibe la demanda de atención y de diagnóstico de gran parte de los casos derivados.¹

El SE se presenta como un tumor óseo, en el 80 % de los casos (con mayor incidencia en pelvis, fémur, tibia y costillas), o de partes blandas, en el 10 a 20 % de las ocasiones (predominantemente en pared torácica, glúteos, cavidades pleurales y músculos cervicales), que afecta principalmente a niños, adolescentes y adultos jóvenes con una incidencia de 1,5 casos por millón a nivel global.² El 85 % de los SE clásicos presentan una translocación recurrente t(11;22) (q24;q12), la cual ocasiona la fusión del gen *EWSR1* con el gen *FLI1*. El *EWSR1* codifica una proteína de unión a ARN involucrada en la transcripción del ADN y *FLI1* es miembro de una gran familia de factores de transcripción de ADN que contiene dominios de ETS altamente conservados. Sin embargo, la variabilidad en la ubicación del punto de ruptura lleva la transcripción de ARNs de fusión diversos que se traducen en proteínas quiméricas de diferente tamaño y con actividad anómala. En la mayoría de los casos, el rearrreglo cromosómico se presenta entre los intrones 7 u 8 del gen *EWSR1* y los intrones 5 o 4 del gen *FLI1*, lo cual origina la fusión entre el exón 7 del gen *EWSR1* con el exón 6 del gen *FLI1* (transcripto de fusión tipo 1: 50 % de los casos) o con el exón 5 del gen *FLI1* (transcripto de fusión tipo 2: 27 % de los casos). En la mayoría de los casos restantes no tipo 1/ no tipo 2, la porción *EWSR1* del transcripto se extiende hasta el exón 10. Ocasionalmente, se pueden observar isoformas de fusión más cortas que carecen de los exones 6, 7 y 8 de *FLI1*.^{3,4}

Los genes de fusión generan la transcripción de factores quiméricos aberrantes que alteran la expresión génica. *EWSR1* proporciona un poderoso dominio de activación, que resulta en la alteración de vías de señalización moleculares necesarias para la proliferación y diferenciación celular.⁵ La oncoproteína *EWSR1-FLI1* funciona como un factor de transcripción aberrante, sin embargo, alrededor del 10 % de los SE muestran

translocaciones análogas y genes de fusión que involucran al gen *EWSR1* y a un miembro de la familia de factores de transcripción ETS.

Por otra parte, el RMS es el sarcoma de partes blandas más frecuente. Representa el 5 % de todos los cánceres pediátricos y es el tercer tumor sólido extracraneal más frecuente luego del neuroblastoma y el tumor de Wilms⁶. El rhabdomyosarcoma alveolar (RMSA) y el embrionario (RMSE) constituyen los dos principales subtipos histopatológicos. El RMSE es un tumor de niños pequeños, con una distribución principalmente axial y se presenta en sitios desprovistos de músculo esquelético maduro. El RMSA se presenta comúnmente en tejidos blandos de las extremidades. A pesar de estos perfiles tan diferentes, existen casos complejos de RMSE y RMSA que se superponen tanto clínica como morfológicamente.⁷ Estos datos evidencian que la evaluación morfológica resulta insuficiente para el diagnóstico diferencial de ambas entidades y su correcta clasificación es indispensable para la asignación de riesgo y para seleccionar el régimen terapéutico apropiado, ya que cada uno de ellos tiene un protocolo de quimioterapia diferente. La identificación de las translocaciones recurrentes t(2;13) (q35;q14) y t(1;13) (p36;q14) y sus transcriptos de fusión asociados entre los genes *PAX3-FOXO1* y *PAX7-FOXO1* se observa en el 80 % de los casos de RMSA: en general, *PAX3-FOXO1* se halla en el 60 % de los casos y *PAX7-FOXO1*, en el 20 % restante.^{8,9} Se ha demostrado que el status de fusión *PAX-FOXO1* es un marcador de peor pronóstico de sobrevida libre de eventos (SLE).^{10,12}

La mayoría de los sarcomas se tratan aún según estándares tradicionales¹³; no obstante, los marcadores moleculares vinculados a su patogénesis han allanado el camino para un diagnóstico más preciso, además de proporcionar la oportunidad de explorar otras estrategias terapéuticas.⁵

La identificación de estos marcadores moleculares en la práctica clínica se basa sobre dos técnicas, principalmente: la Hibridación *In Situ* Fluorescente (FISH) y la reacción en Cadena de la Polimerasa a partir de retrotranscripción (RT-PCR); ambas se complementan y constituyen importantes herramientas que permiten definir con precisión las líneas de diferenciación tumoral.¹⁴⁻¹⁶

Los objetivos de este estudio fueron detectar las alteraciones moleculares en SE y RMS mediante la complementación de dos técnicas: FISH con sondas específicas para detectar alteraciones cromosómicas y RT-PCR seguida de secuenciación para la identificación de transcriptos de fusión originados a partir de translocaciones génicas, y, además, evaluar el impacto de la conservación de biopsias sobre la integridad de los ácidos nucleicos.

Materiales y Métodos

Población y muestras en estudio

Se realizó un estudio observacional analítico, de corte transversal. Los criterios de inclusión fueron: la sospecha o diagnóstico confirmado de SE o RMS; edad menor a 18 años y que el paciente no hubiera ya recibido tratamiento previo con radio y/o quimioterapia. Se enrolaron en este estudio sólo aquellos individuos que

Tabla I. Cebadores utilizados para la caracterización de los transcritos de fusión.

Tipo tumor	Translocación	Fusión	Tamaño frag. [pb]	Secuencia cebadores (5´ - 3´)
SE	t(11;22)(q24;q12)	EWSR1/FLI1	tipo 1: 154 tipo 2: 220	EWS-F TCCTACAGCCAAGCTCCAAGTC
			tipo 3: 406 tipo 4: 472	FLI1-R GGCCGTTGCTCTGTATTCTTACTGAT
			tipo 1: 368 tipo 2: 434	EWS-F TCCTACAGCCAAGCTCCAAGTC
			tipo 3: 620 tipo 4: 686	FLI1B-R GTTGGGCTTGCTTTTCCGCTC
RMSA	t(21;22)(q22;q12)	EWSR1/ERG	variable según puntos de ruptura	EWS-F TCCTACAGCCAAGCTCCAAGTC ERG-R GAGAAGGCATATGGCTGGTGG
	t(2;13)(q35;q14)	PAX3- FOXO1	173	PAX3 AGCTATACAGACAGCTTTGT FOXO1 CTCTGGATTGAGCATCCACC
	t(1;13)(p36;q14)	PAX7- FOXO1	163	PAX7 GCTTCTCCAGCTACTCTGAC FOXO1 CTCTGGATTGAGCATCCACC
	PCR anidada	PAX3/7-FOXO1	146/136	FOXO1 semi TCCAGTTCCTTCATTCT

► SE, Sarcoma de Ewing; RMSA, rabdomiosarcoma alveolar; EWSR1, proteína de unión a ARN involucrada en la transcripción del ADN; FLI1, factor de transcripción de la integración de leucemia 1; ERG, gen relacionado con ETS; FOXO1, Forkhead box protein O1; PAX3/7, Paired box 3/7; [pb] pares de base.

Tabla II. Casos de Sarcoma de Ewing estudiados.

Material	FISH	Estudio molecular		Diagnóstico
		PGK	Transcripto de fusión	
P	EWSR1 POS (60 %)	NEG	No se realiza	SE
P	EWSR1 POS (50 %)	NEG	No se realiza	SE
F	EWSR1 POS	POS	EWS-FLI1 tipo 2	SE
P	EWSR1 POS	POS	EWS-FLI1 tipo 1	SE
P	EWSR1 POS (25 %)	POS	EWS-FLI1 tipo 1	SE
F	EWSR1 POS (80 %)	POS	EWS-FLI1 (ex7/ex4)	SE
PAMO	No se realiza	POS	NEG	Sin infiltrado tumoral (SE)
F	EWSR1 POS (80 %)	POS	EWS-FLI1 tipo 4	SE
PAMO	No se realiza	POS	NEG	Sin infiltrado tumoral (SE)
P	EWSR1 POS (90 %)	POS	EWS-FLI1 tipo 2	SE
F	EWSR1 POS	POS	EWS-FLI1 tipo 2	SE
P	EWSR1 NEG	POS	NEG	No SE
P	EWSR1 NEG	POS	NEG	No SE
P	EWSR1 NEG	POS	NEG	No SE
P	EWSR1 NEG	NEG	No se realiza	No SE

► P, tejido fijado en formol e incluido en parafina; F, tejido en fresco conservado a -70°C; PAMO, médula ósea; NEG, negativo; POS, positivo; PGK: fosfogliceroquinasa; SE, Sarcoma de Ewing.

Tabla III. Casos de rhabdomyosarcoma estudiados.

Material	FISH	Estudio molecular		Diagnóstico
		PGK	Transcripto de fusión	
P	FOXO1 POS	POS	FOXO1-PAX3	RMS alveolar
F	FOXO1 POS	POS	NEG	RMS embrionario
P	FOXO1 POS (30 %) amplificación de la señal	POS	NEG	RMS embrionario
P	FOXO1 POS (30 %)	NEG	No se realiza	RMS alveolar

► P, tejido fijado en formol e incluido en parafina; F, tejido en fresco conservado a -70°C; NEG, negativo; POS, positivo; RMS, rhabdomyosarcoma.

presentaron un consentimiento informado o asentimiento, según la edad, siguiendo las recomendaciones del Comité de Ética en Investigación del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.

Se incluyeron en el estudio niños con sospecha clínica y/o histopatológica de SE y RMS. Se estudiaron biopsias de tumor primario: en fresco conservadas en *Trizol*® a -70°C y biopsias fijadas en formol-buffer y embebidas en parafina (FFEP). Además, se incluyeron punciones-aspiraciones de médula ósea (PAMO) de pacientes diagnosticados con SE y con sospecha de infiltración de células neoplásicas en médula ósea, que se conservaron en *Trizol*® a -70°C. Estas muestras de PAMO se procesaron solo para estudios moleculares, pero no citomoleculares, con el objetivo de descartar la infiltración tumoral en la médula ósea (Tablas II y III).

FISH (Fluorescence in situ Hybridization)

El rearreglo de los genes *EWSR1* [OTS *EWSR1* (22q12)] y *FOXO1* [OTS *FOXO1* (13q14)] se detectó con sondas de diseño *break apart* doble color (LIVE-LEXEL *in Vitro Experience*). Se desparafinaron los cortes de biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina con xilol 100 % y se rehidrataron con etanol en concentraciones decrecientes. Se procedió según lo descrito previamente en el trabajo de Colli y colaboradores.¹⁷

Para el análisis, se consideró como positivo cuando al menos un 20 % de los núcleos tumorales mostraron señales separadas por una distancia equivalente de, al menos, el diámetro de 1 a 2 señales.

Análisis de transcriptos de fusión

Se realizó el aislamiento de ARN a partir de biopsias en fresco y biopsias incluidas en parafina. En el caso de las biopsias en fresco, el ARN total se extrajo con *Trizol*® (*Invitrogen*), según instrucciones del fabricante. En el caso de muestras fijadas en formol y embebidas en parafina, se extrajo el ARN con el kit *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (*Ambion*), específico para parafinas. Se procedió según las instrucciones del fabricante, con la única salvedad de que se eluyó en 20 uL para favorecer la concentración del ARN extraído.

La cuantificación del ARN presente en las muestras se realizó determinando la absorbancia a 260 nm en el equipo *Nanodrop One* (*Thermo Scientific*), a partir de 1 µl de la muestra. Se registró, además, la absorbancia a 280 y 230 nm para calcular

los índices de pureza del ácido nucleico extraído [A260/A280 y A260/230], considerándose adecuados valores entre 1,8 y 2.

A partir del ARN, se realizó la reacción de retrotranscripción (RT). Se utilizaron cebadores *random* hexámeros y la enzima transcriptasa reversa *Superscript II* (*Invitrogen*). El ARN extraído se desnaturalizó durante 5 minutos a 70°C en presencia de los hexámeros y la mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 90 minutos con buffer de reacción [MgCl₂], inhibidores de RNasa y la retrotranscriptasa. Finalmente, la mezcla se incubó 5 minutos a 95°C y se guardó a -20°C.

Se verificó en todas las muestras la integridad del ARN extraído mediante la retrotranscripción y la amplificación del gen de la fosfoglicerato quinasa (*PGK*), que se expresa en forma ubicua en las células, con los cebadores PGKfwd (5'CAGTTTG-GAGCTCTCGGAAG3') /PGKrev (5'TGCAAATCCAGGGTGCA GTG3') y se obtuvo un producto de amplificación de 247 pb. Si el ARN de *PGK* se encuentra intacto, se asume que se pueden detectar igualmente los transcriptos de fusión. Además, la amplificación por RT-PCR de *PGK* permitió verificar que la misma correspondiera a ARN y no a ADN contaminante, que da un producto de 600 pb.¹⁸

A partir del ADNc total, se amplificaron por PCR con cebadores específicos los fragmentos correspondientes a los diversos transcriptos de fusión, según se detalla en la tabla I. En la figura 1, se ilustra la puesta a punto de la estrategia de detección de los transcriptos de fusión para SE utilizando la línea celular TC71, que contiene la translocación *EWS-FLI1 tipo 1* (exón 7 de *EWS* con exón 6 de *FLI1*).

En particular, para aumentar la sensibilidad y especificidad, se aplicó una estrategia de RT-PCR anidada para la detección de transcriptos de fusión *PAX3/7-FOXO1*. Todos los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa 2 % teñido con bromuro de etidio.

Los productos obtenidos se purificaron con el reactivo *QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol* (*QIAGEN*). Luego, se secuenciaron de manera automatizada utilizando el reactivo comercial ABI *PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (*Applied Biosystems, USA*) en un equipo *Applied Biosystems 3500*, según instrucciones del fabricante. Se secuenciaron ambas hebras, *forward* y *reverse*, utilizando los mismos cebadores usados para la amplificación inicial (Tabla I). Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el software *BioEdit* y bases de datos de referencia (*Ensembl, Gen-*

Bank NCBI). También se utilizó el programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) disponible en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).¹⁹

Resultados

En el estudio se incluyeron 13 niños con sospecha de SE y 4 con sospecha de RMS. En total se trabajó sobre 17 biopsias de tumor primario, de las cuales 7 fueron conservadas a -70°C y 12 FFEP. Además, se incluyeron 2 aspirados de médula ósea.

Detección de rearrreglos génicos por FISH

Mediante la técnica de FISH se ensayaron 13 biopsias de tumores con sospecha de SE y se detectó el rearrreglo del gen *EWRS1* solo en 9 (Figura 2a). De todos los casos con rearrreglo, dos mostraron patrones diferentes, a saber: uno presentó el rearrreglo con un patrón de señales atípicas y el otro, monosomía del gen *EWRS1* en un 10 % de los núcleos evaluados (Tabla II). Las PAMO no se estudiaron con esta metodología.

Respecto de los casos con sospecha diagnóstica de RMS, a partir de los estudios morfológicos de la biopsia, se evidenció el rearrreglo del gen *FOXO1* en 3/4 biopsias estudiadas, como lo muestra la tabla III (Figura 2b).

Detección de transcritos de fusión por RT-PCR

Como se resume en las tablas II y III, se extrajo ARN de buena calidad para estudios moleculares, según la determinación del gen control *PGK* en 8/12 (67 %) de las biopsias fijadas en formol y embebidas en parafina. Con respecto a las muestras conservadas a -70°C, en las 7 (100 %) muestras ensayadas el ARN extraído fue apto para el estudio molecular por RT-PCR. De estas, 5 correspondían a biopsias de tumores primarios y 2, a PAMO de pacientes con SE y con sospecha de infiltración de células neoplásicas en médula ósea.

Para SE se detectó por RT-PCR el transcripto de fusión *EWS-FLI1* en 7/13 tumores (54 %), de los cuales 2/7 correspondieron al rearrreglo tipo 1 (*EWS* exón 7 con *FLI1* exón 6); 3/7, al tipo 2 (*EWS* exón 7 con *FLI1* exón 5); 1/7 al tipo 4 (*EWS* exón 10 con *FLI1* exón 5) y 1/7, a una translocación inusual que involucra al exón 7 del gen *EWS* con el exón 4 del gen *FLI1*. En la figura 3 se ilustra a modo de ejemplo un electroferograma que muestra esta translocación. Ningún caso presentó translocación *EWS-ERG*. Por otra parte, en las dos muestras de PAMO se confirmó molecularmente la ausencia de infiltración neoplásica observada por histopatología. Cuando se analizaron los casos de RMS, 1/4 resultó no evaluable por técnicas moleculares, ya que la amplificación del gen control, *PGK*, fue negativa. Con respecto a los 3 casos evaluables, en 1/3 se detectó por RT-PCR el transcripto de fusión de los genes *FOXO1-PAX3*, que así confirmó el diagnóstico de RMSA. En otro caso, se confirmó el diagnóstico de RMS embrionario por ausencia de la translocación con ambos métodos, RT-PCR y FISH negativos (fusión negativa). Por último, se observó un resultado discordante en un caso con RT-PCR negativa que por FISH evidenció el rearrreglo de *FOXO1*; en consecuencia, este caso se asumió como RMSE (fusión negativa). Ninguno de los casos estudiados (0/3) evidenció la translocación *FOXO1-PAX7*.

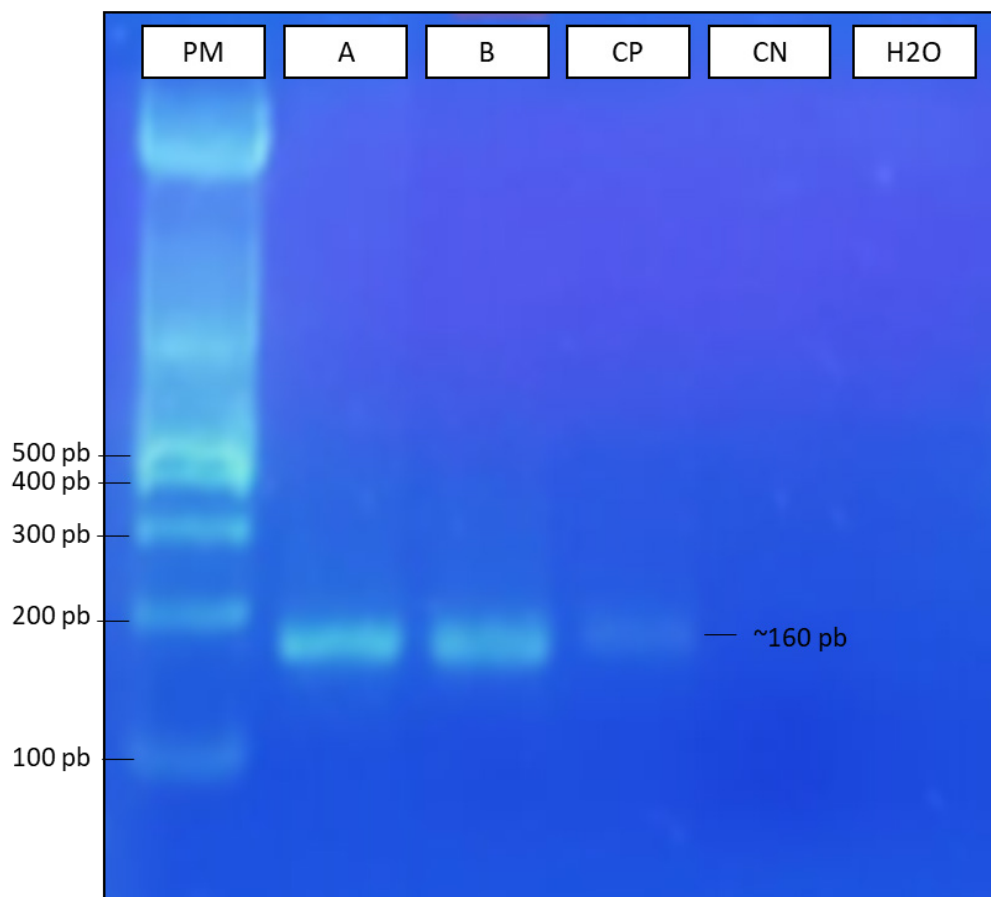
Discusión

Los tumores de la familia de SE y los RMS forman parte del 6% de los casos de cáncer anuales en niños menores de 15 años, según el Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino. La complementación entre diferentes técnicas diagnósticas representa la base de los sistemas de clasificación actuales para estos tumores e incluye entre sus criterios los aspectos clínicos, morfológicos, inmunofenotípicos y genéticos para lograr finalmente un diagnóstico de certeza.²⁰

Los datos aquí presentados son el resultado de la primera experiencia en la detección de mutaciones o alteraciones genéticas en tumores de partes blandas en la población pediátrica que asiste al hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez.

En este estudio se realizaron los diagnósticos mediante dos técnicas: FISH y RT-PCR-secuenciación, sin embargo, no siempre todos los resultados fueron coincidentes. En particular en los tumores de Ewing de esta serie, el abordaje realizado mediante la técnica de FISH nos permitió identificar la translocación del gen *EWRS1*, inclusive en un caso en el que solo un 25 % de núcleos lo presentaba, porcentaje muy cercano al valor de corte por bibliografía. Esta observación fue corroborada por RT-PCR-secuenciación mediante la cual se caracterizó el transcripto de fusión *EWS-FLI1*, lo que pone en evidencia la utilidad de esta técnica molecular para confirmar el diagnóstico, en especial en aquellos casos con valor cercano al corte. Por otra parte, en un caso con diagnóstico morfológico de RMS, se encontró una discrepancia entre FISH y RT-PCR similar a lo descripto por Qian X. y colaboradores.²¹ Mediante la técnica de FISH se evidenció el rearrreglo de *FOXO1* en un 25% de los núcleos, pero el ensayo de RT-PCR resultó negativo para ambos transcritos de fusión *PAX3-FOXO1* y *PAX7-FOXO1*. La discordancia observada llevó a establecer un diagnóstico final de rhabdomyosarcoma embrionario debido a la ausencia del transcripto de fusión. Este resultado discordante plantea diversas situaciones: por un lado, se pueden reconsiderar los valores de corte para la técnica de FISH con respecto al gen *FOXO1*. Por otro lado, dado que se partió de una biopsia incluida en parafina, existe la posibilidad de que el ARN se haya estado parcialmente degradado y esto llevó a una disminución de la sensibilidad de la técnica. Al respecto, es importante tener en cuenta que la reacción de control para el ARN amplificable utilizó como blanco el transcripto del gen *PGK*, correspondiente a una enzima que se expresa a niveles significativamente más altos que los transcritos de fusión *FOXO1*. Esto plantea la posibilidad a futuro de incluir genes reporteros con diferente nivel de expresión del transcripto, según el transcripto de fusión que se quiera diagnosticar.

Por otra parte, es importante señalar que la forma de conservación de la muestra ensayada puede condicionar el resultado obtenido y por ello se debe considerar la calidad de biopsias conservadas en fresco a -70°C vs. FFPE. Se demostró que el ARN obtenido a partir de las biopsias preservadas a -70°C fue de mejor calidad que el de las fijadas en formol e incluidas en parafina en cuanto a la integridad de los ácidos nucleicos. Esto se vio reflejado en la amplificación del gen control *PGK*, elegido especialmente para este tipo de biopsias, ya que en todos los

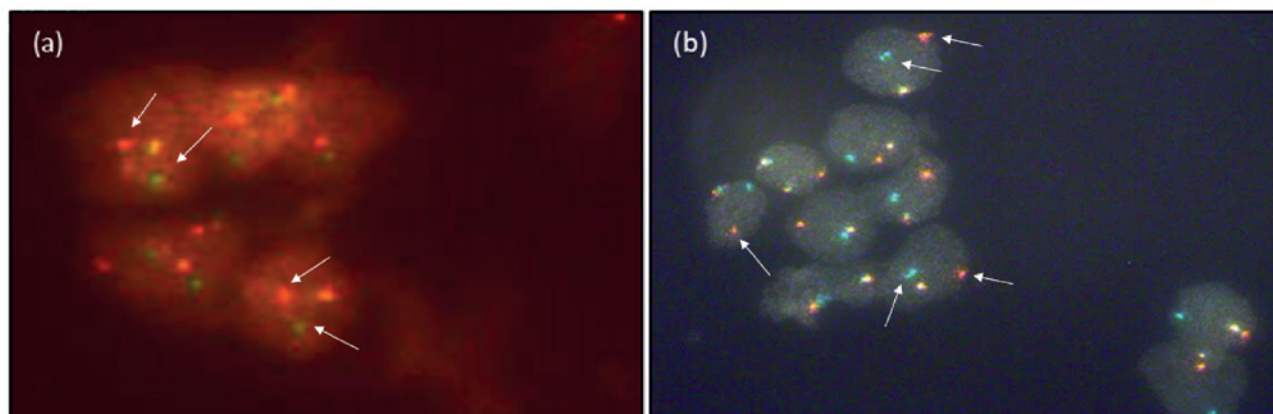
Figura 1. Gel de agarosa 2 % revelado con *GelGreen*.

► PM, marcador de peso molecular 100pb; A y B, Línea celular TC71, las cuales presentan el rearreglo EWS-FLI1 tipo 1 (exón 7 de EWS con exón 6 de FLI1); CP, control positivo; CN, control negativo; H2O, agua.

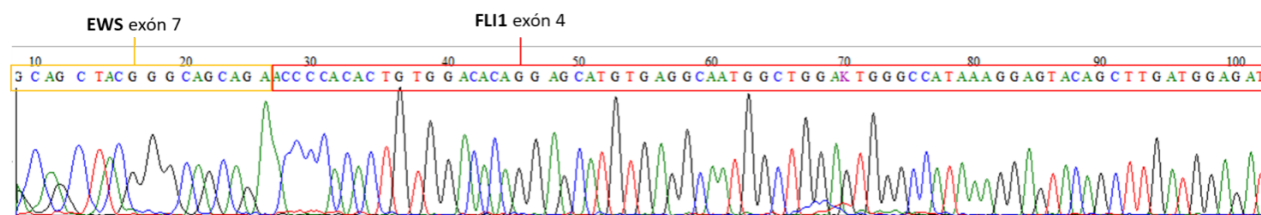
casos en que partimos de material en fresco, se recuperó ARN de calidad, mientras que el ARN recuperado a partir de parafinas fue apto en un 66 %. Otro inconveniente que se puede presentar al ensayar biopsias fijadas es la imposibilidad de detectar transcritos de fusión de mayor longitud, tal como lo describen Bridge y col.²² en su trabajo sobre SE, en aquellas biopsias en las cuales los diversos puntos de translocación del exón *EWS-FLI1* pueden producir transcritos de fusión muy extensos (mayores a 650 pb), dependiendo del sistema de cebadores utilizados, que no se amplifiquen de manera eficiente a partir de tejido fijado y embebido en parafina.

Las dos técnicas aquí utilizadas, FISH y RT-PCR-secuenciación, presentaron ventajas y desventajas diagnósticas. Los ensayos citomoleculares permiten detectar los rearreglos con una sola sonda para un gen específico (por ejemplo, *EWS1* o *FOXO1*) sin la necesidad de conocer el segundo gen de la fusión, lo cual representa una ventaja, dado que permite detectar una alteración genética sin necesidad de conocer el gen con el cual se translocó, pero su sensibilidad es menor que la de las técnicas moleculares. Por su parte, los ensayos de RT-PCR son más sensibles, pero dado que es necesario conocer ambos genes que participan de la fusión, hay que diseñar una estrate-

gia específica para cada punto de ruptura. Esto podría ser un inconveniente, por ejemplo, para el SE, donde el gen *EWS* puede translocarse con numerosos genes candidatos. Por lo tanto, se evidencia la importancia de contar con ambas técnicas complementarias en estos casos para arribar al diagnóstico de certeza y así dirigir los tratamientos de manera óptima. Los casos de SE confirmados fueron incluidos en el protocolo de tratamiento específico Euro EWING 2012.²³ En los casos con diagnóstico de RMS, los estudios moleculares nos permitieron realizar su clasificación molecular para incluir a los pacientes con RMSA con fusión de genes positivo en el grupo de alto riesgo e incorporarlos a un régimen terapéutico más intensivo. Cabe señalar también la importancia de secuenciar los genes de fusión detectados, dado que esto permite la identificación certera de los puntos de ruptura de los genes implicados, ya sea en el caso de los SE o de los RMS. La justificación de la secuenciación surge del hecho de que, si bien se requiere de mayor evidencia, la bibliografía sugiere que conocer el tipo de transcrito de fusión generado podría brindarnos información de pronóstico adicional; y este tipo de información solo está disponible con este método.^{22,24} En esta serie en particular, se detectó un rearreglo génico infrecuente en uno de los SE correspondiente a

Figura 2: Microscopía de fluorescencia (100X).

► [a] Hibridación in situ fluorescente (FISH, Fluorescent in situ hybridization) de un tumor correspondiente a un sarcoma de Ewing con sondas break apart para el gen *EWSR1*, donde se observa la separación de las señales en los núcleos neoplásicos; (b) FISH con sondas break apart donde se muestra el gen *FOXO1* rearrreglado/translocado. Flechas blancas: separación de la señal fluorescente, que indica la presencia del rearreglo del gen contra el que se dirigen las sondas.

Figura 3. Gráfico de una secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) obtenida por electroforesis capilar (electroferograma).

► Secuenciación del transcrito de fusión entre los genes *EWSR1*-*FLI1* del exón 7 con el exón 4, respectivamente, en un caso de SE.

la unión del exón 7 del gen *EWS* con el exón 4 del gen *FLI1*.

En lo referente al SE, otros autores han descrito que el transcrito *EWS-FLI1* tipo 1 fue el que se detectó en la mayoría de los casos²⁴⁻²⁶, sin embargo, en la pequeña serie estudiada, aún no se ha observado esa distribución, por lo cual se propone estudiar un mayor número de casos para evaluar el transcrito predominante en los casos de nuestro centro.

Como conclusión final, destacamos que la evaluación conjunta de los resultados mediante la complementación de los estudios moleculares y citomoleculares con los datos morfológicos e inmunohistoquímicos permitió arribar a los diagnósticos definitivos de los casos estudiados y generó la oportunidad de tratamiento adecuado en los casos prospectivos. Respecto de los tumores que fueron analizados en forma retrospectiva, que fueron oportunamente diagnosticados, su reevaluación nos brindó la posibilidad de revalidar las técnicas empleadas, así como de ampliar la información genética de la enfermedad y correlacionar con la evolución de estos pacientes.

Referencias bibliográficas

1. Moreno F, Dussel V, Orellana L; ROHA network. Childhood cancer in Argentina: Survival 2000-2007. *Cancer Epidemiol.* 2015; 39[4]:505-10.
2. Ewing sarcoma. Grünewald TGP, Cidre-Aranaz F, Surdez D, Tomazou EM, de Álava E. *Ewing sarcoma. Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4(1):5.
3. Barr FG1, Chatten J, D'Cruz CM, Wilson AE, Nauta LE, Nycum LM, et al.

Molecular assays for chromosomal translocations in the diagnosis of pediatric soft tissue sarcomas. *JAMA.* 1995; 273(7):553-7.

4. Llombart-Bosch A, Machado I, Navarro S, Bertoni F, Bacchini P, Alberghini M, et al. Histological heterogeneity of Ewing's sarcoma/PNET: an immunohistochemical analysis of 415 genetically confirmed cases with clinical support. *VirchowsArch.* 2009; 455:397-411.
5. Hameed M. Molecular diagnosis of soft tissue neoplasia: clinical applications and recent advances. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2014; 14(8):961-977.
6. Dasgupta, R.; Fuchs, J.; Rodeberg, D. Rhabdomyosarcoma. *Semin. Pediatr. Surg.* 2016; 25:276-83.
7. Rudzinski ER, Anderson JR, Chi YY, Gastier-Foster JM, Astbury C, Barr FG, et al. Histology, fusion status and outcome in metastatic rhabdomyosarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2016; 63(4): 634-639
8. Arnold MA, Anderson JR, Gastier-Foster JM, Barr FG, Skapek SX, Hawkin DS, et al. Histology, Fusion Status, and outcome in alveolar Rhabdomyosarcoma with Low-Risk Clinical Features: A Report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2016; 63:634-39.
9. Parham DM, Barr FG. Classification of rhabdomyosarcoma and its molecular basis. *Adv Anat Pathol.* 2013; 20(6):387-97.
10. Skapek SX, Anderson J, Barr FG, Bridge JA, Gastier-Foster JM, Parhamet DM et al. PAX-FOXO1 fusion status drives unfavorable outcome for children with rhabdomyosarcoma: a children's oncology group report. *Pediatr Blood Cancer.* 2013; 60(9):1411-17.
11. Le Deley MC, Delattre O, Schaefer KL, Burchill SA, Koehler G, Hogendoorn PC, et al. Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J Clin*

- Oncol. 2010; 28(12):1982-8.
12. Marino-Enriquez A, Fletcher CD. Round cell sarcomas – biologically important refinements in subclassification. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014; 53:493-504.
 13. Borinstein SC, Steppan D, Hayashi M, Loeb DM, Isakoff MS, Binitie O et al. Consensus and controversies regarding the treatment of rhabdomyosarcoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2018; 65(2):e26809.
 14. Bridge JA. The role of cytogenetics and molecular diagnostics in the diagnosis of soft-tissue tumors. *Mod Pathol.* 2014; 27(1):80-97.
 15. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15(6):371-381.
 16. Barr F. Fusion genes in solid tumors: the possibilities and the pitfalls. *Exp Review Mol Diag.* 2016; 16(9):921-23.
 17. Collie S, Furfur L, Room Paparelli E, Maidana M, Martín C, Bordone J, et al. A der(11)t(4;11)(q21;p15) in a T-ALL/LBL patient. *Cancer Genet.* 2016; 209(4):166-70.
 18. Fritsch M, Bridge JA, Schuster AE, Perlman EJ, Argani P. Performance characteristics of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of tumor-specific fusion transcripts from archival tissue. *Pediatric Dev Pathol.* 2002; 6(1):43-53.
 19. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1):D41-D47.
 20. Fletcher C, Unni K, Mertens F. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press [Internet] 2002. Disponible en: <https://aaot.org.ar/docs/pdfs/who-classification.pdf>
 21. Qian X, Jin L, Shearer BM, Ketterling RP, Jalal SM, Lloyd RV. Molecular diagnosis of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by RT-PCR and fluorescence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol.* 2005; 14(1):23-28.
 22. Bridge RS, Rajaram V, Dehner LP, Pfeifer JD, Perry A. Molecular diagnosis of Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in routinely processed tissue: a comparison of two FISH strategies and RT-PCR in malignant round cell tumors. *Modern Pathology.* 2006; 19(1):1-8.
 23. Anderton J, Moroz V, Marec-Bérard P, Gaspar N, Laurence V, Martín-Broto J, et al. International randomised controlled trial for the treatment of newly diagnosed EWING sarcoma family of tumours – EURO EWING 2012 Protocol. *Trials* 2020; 21:96.
 24. Allegretti M, Casini B, Mandoj C, Benini S, Alberti L, Novello M, et al. Precision diagnostics of Ewing's sarcoma by liquid biopsy: circulating EWS-FLI1 fusion transcripts. *Ther Adv Med Oncol.* 2018; 10:1-9.
 25. Gautam U, Srinivasan R, Rajwanshi A, Bansal D, Marwaha RK, Vasishtha RK. Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction as an Ancillary Molecular Technique in the Diagnosis of Small Blue Round Cell Tumors by Fine-Needle Aspiration Cytology. *Am J Clin Pathol.* 2010; 133(4):633-45.
 26. Van Doorninck JA, Ji L, Schaub B, Shimada H, Wing MR, Krailo MD, et al. Current Treatment Protocols Have Eliminated the Prognostic Advantage of Type 1 Fusions in Ewing Sarcoma: A Report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2010; 28(12):1989-94.