DE LA PATOLOGÍA ESTRUCTURAL A LA PATOLOGÍA MOLECULAR: UN MODELO EN EL SARCOMA DE EWING

ACADÉMICO RECIPIENDARIO
PROF. ANTONIO LLOMBART BOSCH*

Deseo que mis primeras palabras sean para agradecer al Consejo de Administración y al Presidente de esta histórica Academia Nacional de Medicina, el *Académico Juan M. Ghirlanda,* a su Vicepresidente *Académico José A. Navia* así como a su Secretario General *Académico Roberto N. Pradier,* por mi designación como Académico Correspondiente Extranjero. Honor reservado a pocos privilegiados del mundo de la ciencia médica entre los cuales, opinan Uds. con extrema generosidad, se encontraría mi persona. Son para mí unos momentos históricos y excepcionales que engrandecen mi currículo científico en mi ya largo acontecer dentro de la medicina. Estas gracias deseo hacerlas extensivas a todos los académicos de número de esta Academia Nacional que dieron soporte a la propuesta del Dr. Rómulo Cabrini y a la decisiva ayuda ofrecida por mi entrañable colega y fraternal amigo Dr. Eduardo Santini Araujo, destacada figura de la Patología en Argentina, en América Latina, y prestigioso miembro de la Academia Internacional de Patología.

Es un placer para mí traerles a Uds. el saludo afectuoso y cordial de la Real Academia de Medicina y Ciencias Afines de la Comunidad Valenciana que tengo el honor de presidir como parte del Instituto de España, institución que acoge a todas las Reales Academias de España que gozan del patrocinio de la Corona y de su Majestad el Rey de España Don Juan Carlos I.

La creación de la Real Academia de Medicina por orden real del

* Universidad de Valencia, España.

Rey Fernando VII dada en 1831 estuvo precedida por la Academia Médica Matritense desde 1734, que había sido reconocida mediante Real Decreto de Felipe V. Esta misma Cédula Real sirvió para dar cuerpo legal a numerosos círculos médicos distribuidos por el territorio español que también tenían una larga tradición científica como la Sevillana, Gaditana y Cartagenera que también se reunían bajo el nombre de *tertulias médicas*. El nacimiento de la Real Academia de Medicina de Valencia es de esta misma época y gracias a la misma Cédula Real, constituyéndose junto con otras 17 Reales Academias de Medicina repartidas por todo el territorio nacional.

La tradición histórica de nuestras academias nos hermana lo mismo que la comunidad de objetivos e intereses que antes hemos señalado. Pero también compartimos la historia a través del devenir que la ciencia y la política han servido para unir nuestras dos naciones. Es aquí donde vuelven a encontrarse la ciencia médica española y la argentina a través de personalidades científicas que por razones, hoy felizmente superadas, condicionaron acoger a investigados españoles emigrados como consecuencia de la trágica contienda civil que asoló a España en el siglo pasado.

Por ello en este momento es un deber gustoso el rendir homenaje a la personalidad científica que estableció estos puentes de continuidad entre ambas naciones y prestigió la “Escuela Histológica Española” en Buenos Aires. Me refiero al que fue también académico de esta Academia Nacional el insigne Dr. Pío del Río Hortega, científico distinguido y avanzado de la Neurohistología y Neuropatología a la que contribuyó a desarrollar gracias a sus importantes descubrimientos tanto en España como aquí en Argentina donde pasó sus últimos años y murió.

BREVE ANÁLISIS DE LA ESCUELA HISTOLÓGICA ESPAÑOLA Y DE LA FIGURA DE PÍO DEL RÍO HORTEGA Y SU ESCUELA EN ESPAÑA Y ARGENTINA.

José María López Piñero, destacado investigador de la historia de las ciencias de España y de la medicina valenciana, recientemente fallecido, ha sido uno de los investigadores más profundos y exhaustivos de la vida y aportaciones científicas de Don Pío a través de numerosas publicaciones y libros. También ha contribuido la Prof. María Luz Terrada Ferrandis, su esposa, documentalista e históloga de profesión a divulgar la vida y obra de este científico así como a dar

a conocer la historia de la llamada Escuela Histológica Española a la cual voy a hacer referencia por ser miembro de la misma en lo que ha sido llamada la 5ª generación.

¿Cuáles pueden considerarse las anteriores generaciones que han fundamentado las ciencias micrográficas en mi país hasta el siglo XXI?

- La primera generación y sus antecedentes históricos cabría concretarlos en las figuras de Aureliano Maestre de San Juan (1828-1890), Luis Simarro y Eduardo García Sala (1845-1922), entre cuyos discípulos se encuentra Santiago Ramón y Cajal.

- La segunda generación estaría formada por las grandes figuras de Nicolás Achúcarro (1880-1918), Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) y sus discípulos más inmediatos entre los que se encuentra Pío del Río Hortega (1882-1945).

- La tercera generación correspondería a los discípulos directos de estos tres maestros destacándose Francisco Tello, Fernando de Castro, Ricardo Martínez Pérez, Antonio Llombart Rodríguez, Julián Sánchez Lucas, J. Manuel Ortiz Picón así como los histólogos españoles emigrados a América discípulos de Pío del Río Hortega y de Santiago Ramón y Cajal como Lorente de No, Isaac Costero, junto con un grupo de histólogos y patólogos españoles de la posguerra entre los que debemos destacar a Luis Zamorano, Agustín Bullón, César Aguirre Viani, Ángel Valle.

- La cuarta generación sigue presente en la actualidad; corresponde a la histología y la patología de la segunda mitad del siglo XX en España mereciendo destacarse su plena incorporación a la patología europea e internacional. En ella nos ubicamos nosotros y otros hepatólogos e histólogos de mi generación como Horacio Oliva, Félix Contreras Rubio, Alberto Anaya, Francisco Martínez Tello, Augusto Moragas Redecilla, Juan Domingo Toledo Ugarte. Esta lista, sin lugar a dudas, podría ser mucho más extensa y exhaustiva. Pido excusas por la omisión del nombre de muchos distinguidos compañeros.

- Hoy se abren las puertas de las ciencias micrográficas en la Es-

paña del siglo XXI conjugando lo que es la histología tradicional con la histopatología así como la ingeniería tisular, la biología molecular y la biología de sistemas para enfrentarse ante una nueva visión más global y unitaria ante los nuevos retos de la enfermedad y de su control en una sociedad universal.

Quisiera en estos momentos recordar de modo particular la figura de Pío del Río Hortega a modo de homenaje para quien también supo impulsar la histología en este país y como recuerdo del que fue maestro admirado del también mi maestro y padre.

DE LA PATOLOGÍA ESTRUCTURAL A LA PATOLOGÍA MOLECULAR: UN MODELO EN EL SARCOMA DE EWING

La existencia de un grupo distintivo de neoplasias de células redondas de hueso y partes blandas altamente malignas fue reconocida desde el siglo pasado. Este grupo de tumores de células redondas y pequeñas (***TCRP***) comprenden un conjunto heterogéneo de neoplasias pobremente diferenciadas formadas por células pequeñas, redondas u ovales con alto índice nuclear-citoplasmático, núcleos redondos con cromatina dispersa o agrupada y nucléolo poco evidente.

En el año 1921, James Ewing, Profesor de Patología de la Universidad de Cornell, USA, describió estas características histológicas en un tumor que denominó *endotelioma difuso de hueso*. Charles Oberling, en París, en el año 1928, denominó la neoplasia como “Sarcoma de Ewing”, lo cual no estuvo relacionado con la célula de origen, células del mesénquima multipotencial de la médula ósea que poseían la capacidad de generar estos tumores a través de una diferenciación endotelial. El tumor fue motivo de fuerte controversia en los años 1930-1940 por cuanto Willis (1940) defendió la posibilidad de que en realidad el ***SE*** no fuera sino la expresión local de la metástasis de un neuroblastoma oculto, basándose no sólo en su heterogeneidad histológica sino también en su presencia multiorgánica así como en su extrema semejanza con los neuroblastomas indiferenciados de la infancia. Arthur Purdy Stout en New York (1944), utilizando cultivos de tejidos, defendería la independencia biológica del ***SE*** y su diferencia frente a los neuroblastomas en contra del criterio de Willis.

En los años ‘50, Fritz Schajowicz publicó en Argentina una serie

de trabajos relacionados con este tumor así como con los entonces denominados por J. Stewart *Sarcomas reticulares de la médula ósea* (retículosarcomas de hueso), señalando como atributo fundamental de los mismos su alto grado de indiferenciación (Sarcoma de células redondas pequeñas) y la presencia de abundante glucógeno citoplásmico detectable mediante el carmín de Best o el ácido periódico de Schiff (PAS) y siendo sensible a la diastasa.

La evolución histogenética en el concepto del Sarcoma de Ewing puede resumirse de la siguiente forma:

I. El Sarcoma de Ewing es un endotelioma de hueso (1920-1921). II. El Sarcoma de Ewing es un sarcoma mesenquimal de hueso (1940). III. El Sarcoma de Ewing es un sarcoma primitivo de hueso y partes blandas (1970). IV. El Sarcoma de Ewing está relacionado con los tumores neuroepiteliales periféricos pero no con los neuroblastomas (1980). V. El Sarcoma de Ewing pertenece a la familia de tumores neuroectodérmicos primitivos localizados en hueso, partes blandas y órganos viscerales (1990). VI. El Sarcoma de Ewing y los tumores neuroectodérmicos primitivos ***(PNET)*** pertenecen a la familia de tumores del Sarcoma de Ewing ***(TFSE)*** porque poseen un perfil inmunohistoquímico y citogenético específico y similar (2000).

La evaluación morfológica en el Sarcoma de Ewing ha permitido clasificar estos tumores en varios grupos histológicos que muestran características diferentes. Existen numerosas publicaciones que describen la evolución morfológica en el diagnóstico del ***SE*** y tradicionalmente estos tumores se han subdividido en Sarcoma de Ewing convencional, Sarcoma de Ewing con diferenciación neuroectodérmica, Sarcoma de Ewing atípico con células grandes y Sarcoma de Ewing atípicos con cambios endoteliales. La **microscopia electrónica** ha aportado contribuciones importantes en el estudio de estos sarcomas confirmando la mayoría de los hallazgos histológicos y ayudando a comprender su histogénesis.

La técnica de inmunohistoquímica *(IHQ)* ofrece datos importantes que facilitan un diagnóstico más rápido de estos tumores. Los marcadores de diferenciación neuroectodérmica pueden ser positivos en los ***TFSE*** especialmente en el ***PNET*** y los más empleados han sido la enolasa neuroespecífica (ENS), el HNK-1, los neurofilamentos y las proteínas S100 y PGP 9.5. Otro marcador neuroectodérmico muy usado desde

los inicios del empleo de la ***IHQ*** en el diagnóstico de los ***TFSE*** fue el Leu-7 (HNK-1). El receptor Trk A es frecuente en los ***PNET*** mientras el Trk B y C se expresan predominantemente en los Ewing convencionales sin diferenciación neuroectodérmica. Los dos anticuerpos mayoritariamente usados en los ***TFSE*** son el HBA-71 (CD99) y el 12E7. Ambos anticuerpos tienen similitud en la capacidad de detección del producto del gen MIC2 una glicoproteína de membrana inicialmente descripta por Levy y col. El HBA-71 es el más ampliamente usado siendo positivo en más del 95% de los ***TFSE***. Posteriormente aparecieron nuevos anticuerpos como el Fli-1. Resumiendo el CD99 y el CD57 junto con los marcadores neurales ENS, S-100, NF y PGP 9.5 continúan ofreciendo suficiente soporte para este diagnóstico. A ello nosotros hemos unido recientemente la Caveolina-1 presente también en cerca del 98% de estos tumores.

Asimismo ha sido estudiada la expresión de diversos marcadores relacionados con el ciclo celular. Los marcadores IHQ más analizados incluyen Ki-67, p16, p53 y p21. La expresión del Ki-67 es variable estando relacionada la alta expresión de este marcador con mal pronóstico. Generalmente existe una buena correlación entre la presencia IHQ de la proteína y las alteraciones a nivel genómico existiendo una intensa tinción nuclear en los tumores con mutaciones.

En un trabajo reciente -Machado con nosotros- hemos descripto cómo la expresión IHQ de Ezrina representa un factor de buen pronóstico independiente. También la vía NOCHT (NOCHT1, 2, 3, 4, 5, HES1) se ha estudiado por nuestro grupo y se ha descripto que la inhibición de la señal NOCHT induce diferenciación neural.

Reordenaciones genéticas

Actualmente, los sarcomas pueden ser subdivididos en diferentes grupos en dependencia de los hallazgos genéticos o moleculares que presenten e incluyen:

1. *Sarcomas con translocaciones cromosómicas recíprocas específicas:* Los genes ***EWSR1*** y ***FUS*** están involucrados en muchas de las translocaciones que caracterizan algunos sarcomas sobre todo ***TFSE***. Probablemente el efecto de los genes ***EWSR1*** y ***FUS*** es muy similar cuando están involucrados en una translocación cromosómica. La oncoproteína híbrida que se forma como consecuencia de la translocación actúa como un factor de transcripción aberrante que afecta los patrones de expre-

sión génica iniciando la formación tumoral. Los genes blanco del producto de fusión ***EWSR1/ETS*** pueden estimular la proliferación celular, evadir la inhibición del crecimiento, evitar la senescencia, escapar de la apoptosis o inducir angiogénesis, invasión y metástasis.

2. *Sarcomas con mutaciones somáticas específicas:* CD117/Kit en tumor del estroma gastrointestinal y hSNF5/INI1 en los tumores rabdoides.

3. *Sarcomas con amplificaciones más o menos específicos:* *CDK4* y *MDMD2* en los liposarcomas aunque pueden ocurrir en condrosarcomas y osteosarcomas. *NMYC* neuroblastoma.

4. *Sarcomas con cariotipos complejos no específicos:* Tumores que muestran cariotipos complejos que carecen de aberraciones genéticas específicas (osteosarcomas, condrosarcomas).

De manera resumida podemos plantear la evolución de las técnicas diagnósticas aplicadas en el estudio de los *TFSE* de la siguiente forma:

1. Aplicación de técnicas convencionales histológicas: H&E.
2. Histoquímica convencional: PAS, Carmín de Best.
3. Microscopia electrónica.
4. Inmunohistoquímica: marcadores mesenquimales, neurales, epiteliales y otros.
5. Cultivos celulares.
6. Xenotrasplante de tumores.
7. Estudios citogenéticos convencionales: translocaciones cromosómicas principales.
8. FISH.
9. Biología molecular: reordenamiento genético y tipos de genes de fusión.

Principios básicos en el tratamiento de los SE/*TFSE*

Aunque se diagnostican como enfermedad no metastásica, clínicamente se considera que es una enfermedad diseminada. Esto es así porque el 80-90% de los pacientes que se someten a tratamiento locorregional exclusivo presentarán enfermedad a distancia. Como los

TFSE son sensibles a la quimioterapia, se ha estudiado el impacto de la adición de regímenes de poliquimioterapia a tratamientos locorregionales eficaces. El resultado ha sido un incremento en la supervivencia, lo que refuerza la hipótesis de que esta enfermedad está diseminada en la mayoría de los pacientes de presentación localizada.

Actualmente, en pacientes con enfermedad localizada, las tasas de supervivencia a 5 y 10 años son del 70 y 50%, respectivamente. Asimismo, en la mayoría de los casos consigue una reducción de la masa tumoral que permite un mejor control locorregional con tratamientos menos mutilantes.

Termino

Es evidente que el modelo descripto es una muestra palpable de la moderna patología y de cómo la conjunción de la estructura con la función, a través de la genética molecular, ha abierto las puertas de una moderna medicina en el siglo XXI.

RESUMEN

Deseo que mis primeras palabras sean para agradecer al Consejo de Administración y al Presidente de esta histórica Academia Nacional de Medicina, *Académico Juan M. Ghirlanda,* al Vicepresidente, *Académico José A. Navia*, así como a su Secretario General, *Académico Roberto N. Pradier*, por mi designación como Académico Correspondiente Extranjero. Honor reservado a pocos privilegiados del mundo de la ciencia médica entre los cuales, opinan Uds. con extrema generosidad, se encontraría mi persona. Son para mí unos momentos históricos y excepcionales que engrandecen mi currículo científico en mi ya largo acontecer dentro de la medicina. Estas gracias deseo hacerlas extensivas a todos los Académicos de Número de esta Academia Nacional que dieron soporte a la propuesta del Dr. Rómulo Cabrini y a la decisiva ayuda ofrecida por mi entrañable colega y fraternal amigo Dr. Eduardo Santini Araujo, destacada figura de la Patología en Argentina, en América Latina, y prestigioso miembro de la Academia Internacional de Patología.

La tradición histórica de nuestras Academias nos hermana lo mismo que la comunidad de objetivos e intereses. Pero también compartimos la historia a través de los devenires que la ciencia y la política han servido para unir nuestras dos naciones. Es aquí donde vuelven a encontrarse la ciencia médica española y la argentina a través de personalidades científicas que por razones, hoy felizmente superadas, condicionaron acoger a investigados españoles emigrados como consecuencia de la trágica

contienda civil que asoló España en el siglo pasado.

Por ello, en este momento, es un deber gustoso el rendir homenaje a la personalidad científica que estableció estos puentes de continuidad entre ambas naciones y prestigió la "Escuela Histológica Española" en Buenos Aires. Me refiero al que también fue académico de esta Academia Nacional, el insigne Dr. Pío del Río Hortega, científico distinguido y avanzado de la Neurohistología y Neuropatología a la que contribuyó a desarrollar gracias a sus importantes descubrimientos.

DE LA PATOLOGÍA ESTRUCTURAL A LA PATOLOGÍA MOLECULAR: UN MODELO EN EL SARCOMA DE EWING

La existencia de un grupo distintivo de neoplasias de células redondas de hueso y partes blandas altamente malignas fue reconocida desde el siglo pasado. Este grupo de tumores de células redondas y pequeñas comprenden un conjunto heterogéneo de neoplasias pobremente diferenciadas formadas por células pequeñas, redondas u ovales con alto índice nuclear-citoplasmático, núcleos redondos con cromatina dispersa o agrupada y nucléolo poco evidente. En el año 1921, James Ewing, Profesor de Patología de la Universidad de Cornell, USA, describió estas características histológicas en un tumor que denominó *endotelioma difuso de hueso*. Charles Oberling, en París, en el año 1928, denominó la neoplasia como S*arcoma de Ewing.*

De manera resumida podemos plantear la evolución de las técnicas diagnósticas aplicadas en el estudio de la siguiente forma: 1) Aplicación de técnicas convencionales histológicas: H&E. 2) Histoquímica convencional: PAS, Carmín de Best. 3) Microscopia electrónica. 4) Inmunohistoquímica: marcadores mesenquimales, neurales, epiteliales y otros. 5) Cultivos celulares. 6) Xenotrasplante de tumores. 7) Estudios citogenéticos convencionales: translocaciones cromosómicas principales. 8) FISH. 9) Biología molecular: reordenamiento genético y tipos de genes de fusión.

Se presenta una visión global de los distintos aspectos de la morfología, ultra estructura inmunohistoquímica, genética convencional y molecular así como nuevas aproximaciones a la terapéutica de este tumor óseo.