



Tesis doctoral:

Empar Mayordomo Aranda

**Estudio de la heterogeneidad fenotípica del
Sarcoma de Ewing en xenotrasplantes**

Directores de Tesis:

Antonio Llombart Bosch e Isidro Machado Puerto

Tutor:

Samuel Navarro Fos

Departamento de Patología

Facultad de Medicina y Cirugía

Universitat de València

Junio 2018

D. Antonio Llombart-Bosch, Catedrático emérito del Departamento. de Patología de la Universitat de València y D. Isidro Machado Puerto Médico Adjunto del Servicio de Anatomía Patológica del Instituto Valenciano de Oncología. Así como D. Amparo Ruiz Saurí, Titular del Departamento de Patología de la Universitat de València.

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada "**Estudio de la heterogeneidad fenotípica del sarcoma de Ewing en xenotrasplantes**", corresponde al trabajo realizado bajo su dirección y tutorización por Dña. **Empar Mayordomo Aranda**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado 3139 en Patología de la Universitat de València.

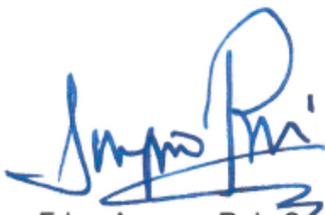
Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 18 de Junio de 2018.



Directores: Fdo. Antonio Llombart-Bosch



Isidro Machado-Puerto



Tutora: Fdo. Amparo Ruiz Saurí

A Marc y Carla por ser mi motivación, mi ilusión y energía.

Por enseñarme a ser madre y disfrutar cada segundo.

Agradecimientos

A Àngels, por ser la mejor hermana y amiga.

A mis padres, Empar y Carles, por ser y estar.

Al Prof. Llombart, que ha sabido transmitirme su pasión, incansable dedicación y conocimientos, en anatomía patológica.

A Isidro, por su bondad y compañerismo. Por todos los buenos momentos disfrutados aprendiendo.

A Laura Martínez por su ayuda en el trabajo técnico y por hacer más amenas las tardes de trabajo.

A José García, por su cuidado y mantenimiento del animalario.

A José Benavent y Victòria Fornés por el trabajo Biostatístico.

Al Rubencio Ilustrador, por su visión artística del trabajo, plasmada en la portada.

A los compañeros que he tenido en mi vida laboral, que me han visto y ayudado a crecer y me han dedicado tiempo, ganas y conocimiento. Algunos de ellos, ya amigos.

A mis amig@s, por hacer mi vida más divertida e interesante.

BECAS DE APOYO A LA TESIS

Esta Tesis recibió el apoyo de las siguientes Becas:

- Beca de la Unión Europea PROTHETS FP6" (Contrato número: 503036) Título: Prognosis and therapeutic targets of Ewing's family of tumors.

Período: 2005-2008

- Beca de la Unión Europea EuroBoNet (Contrato número: 018814)

Título: European Network to Promote Research into Uncommon Cancers in Adults and Children: Pathology, Biology and Genetics of Bone Tumors.

Período: 2005-2010

- Beca de la Asociación Española contra el Cáncer (AECC, Junta Asociada de Valencia) en el Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Período: 2011-2012

- Ayuda financiera para dar soporte al trabajo técnico y al material fungible empleado de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología.

Periodo: 2006-2012

INDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Morfología	3
1.1.1. Microscopía óptica	3
a Sarcoma de Ewing convencional o clásico	4
b PNET	4
c Ewing atípico	4
1.1.2. Ultraestructura	7
1.2. Inmunofenotipo	8
1.2.1. Marcadores diagnósticos neuroectodérmicos	8
1.2.2. Marcadores neuroendocrinos	14
1.2.3. Marcadores neuroendocrinos	14
1.2.4. Marcadores biológicos	14
a Factores reguladores de la apoptosis	15
b Factores de migración celular	18
c Factores de proliferación celular	19
1.2.5. Vías de señalización	22
1.2.6. Reparación del ADN	27
1.2.7. Marcadores del ciclo celular	29
1.2.8. Genes reguladores de la expresión génica	33
1.3. Características clínicas	37
1.4. Biología molecular	38
1.5. Xenotransplantes	39
1.6. Micromatrices de tejidos	40
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
2.1. Hipótesis	45
2.2. Objetivos	45
2.2.1. Objetivo general	45

2.2.2. Objetivos específicos	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1. Materiales	49
3.1.1. Casos	49
3.1.2. Datos clínicos de los pacientes	49
a Edad	49
b Evolución inicial	49
c Tamaño tumoral y localización	50
3.1.3. Método de obtención de la muestra	50
3.1.4. Tratamiento	50
3.2. Métodos	53
3.2.1. Xenotransplantes	53
3.2.2. Biología tumoral en los xenotransplantes	55
3.2.3. Microscopía óptica	56
3.2.4. Micromatrices de tejido (TMA)	56
3.2.5. Técnica inmunohistoquímica	58
3.2.6. Valoración de la inmunohistoquímica	63
3.2.7. Biología molecular	64
3.2.8. Estudio de expresión <i>in silico</i>	64
3.2.9. Tratamiento estadístico de los datos	64
4. RESULTADOS	69
4.1. Caracterización <i>in vivo</i> una serie de TFSE, tanto en su forma original como a lo largo de los pases una vez xenotransplantados, para detectar posibles cambios en la morfología.	71
4.2. Validación de una plataforma experimental animal y estudiar la biología tumoral en ratones atómicos.	73
4.3. Estudio de la presencia de metástasis realizando el estudio autopsico de cada uno de los animales.	79

4.4. Estudiar los principales marcadores inmunohistoquímicos disponibles para el diagnóstico de los TFSE, así como su robustez en los distintos subtipos histológicos y a lo largo de los pases.	79
4.5. Estudio de la expresión de marcadores biológicos en nuestra serie.	87
4.6. Evaluación de las diferencias de expresión en tumores inicialmente localizados y metastásicos para detectar posibles diferencias fenotípicas que justifiquen una distinta agresividad clínica entre ambos.	97
4.7. Evaluación del cambio de expresión de los marcadores en los pases.	104
4.8. Detección der cambios en el fenotipo de un tumor con respecto a su metástasis.	108
4.9. Validación <i>in silico</i> de marcadores diferencialmente expresados en distintas formas clínicas de SE o con variación a lo largo de los pases.	113
5. DISCUSIÓN	123
6. CONCLUSIONES	151
7. BIBLIOGRAFÍA	155

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ABP: Avidina-biotina-peroxidasa

AKT: Proteína quinasa B

Chr: cromosoma

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

ERBB: familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico que incluye a Her1 (EGFR, ERBB1), Her2 (Neu, ERBB2), Her3 (ERBB3) y Her4 (ERBB4).

EMA: Antígeno epitelial de membrana

FAS: CD95

FISH: Hibridización *in situ* fluorescente

FOXO1: Factor de transcripción 1 de la familia *Forkhead box O*

GFAP: Proteína ácida gliofibrilar

GIST: Sarcoma del estroma gastrointestinal

HE: Tinción de hematoxilina y eosina

IGF: Factor de crecimiento dependiente de la insulina

IGF1R: Receptor del factor de crecimiento insulínico de tipo 1

IHQ: Inmunohistoquímica

JNK: c-Jun N-terminal quinasa

miRNA: micro ácido ribonucleico

MMII: Miembros inferiores

mTOR: Diana de la rapamicina en mamíferos

mARN: Ácido ribonucleico mensajero

NF: Neurofilamentos

NSE: Enolasa neuronal específica

PAS: Del inglés Periodic Acid Schiff, tinción para glúcidos

pAKT: Forma fosforilada de AKT

PARP1: Poli (ADP-ribosa) polimerasa

PDX: Xenotrasplantes derivados de pacientes

PI3K: Fosfoinositol 3 quinasa

PNET: Tumor neuroectodérmico primitivo

RT-PCR: Reacción en cadena de polimerasa con retrotranscriptasa
inversa

SE: Sarcoma de Ewing

SG: Supervivencia global

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

TCRA: Tumores de células redondas azules

TFSE: Tumores de la Familia del Sarcoma de Ewing

TNF: Factor de necrosis tumoral

TCRA: Tumor de células redondas azules

TRAIL: Ligando inductor de la apoptosis vía TNF

1. INTRODUCCIÓN

Los Tumores de la Familia del Sarcoma de Ewing (TFSE) son neoplasias malignas de hueso y de partes blandas, poco frecuentes (entre el 6-8% de los tumores malignos primarios de hueso) y que afectan principalmente a pacientes en edad de crecimiento, adolescentes y adultos jóvenes (1, 2). El término engloba a tres tumores que durante años han sido considerados por separado por su morfología característica, pero que forman un espectro morfológico, de biología e histogénesis comunes (3). Dichos tumores son los Sarcomas de Ewing clásicos, los atípicos y los tumores neuroectodérmicos primitivos periféricos (PNET).

1.1.- Morfología

1.1.1.- Microscopía óptica

Desde el punto de vista macroscópico son tumores de coloración pardo-grisácea, de bordes infiltrativos y destructivos que muestran áreas de necrosis y hemorragia (1). En la actualidad su examen macroscópico queda limitado a los tumores postratamiento neoadyuvante, presentando un espectro morfológico variable en función de la respuesta al mismo. De este modo es posible observar necrosis, hemorragia, tumor viable e incluso áreas de licuefacción.

Desde el punto de vista histológico son neoplasias constituidos por células pequeñas de núcleos densos que en la HE presentan una coloración azulada, mostrando una disposición estructural homogénea y difusa, con variable número de mitosis y de necrosis. Las células presentan escaso citoplasma, pudiendo ser éste eosinófilo o claro, debido a la presencia de glucógeno PAS+. El núcleo es redondeado de cromatina grumosa y nucléolos poco evidentes. Se ha descrito una subpoblación celular acompañante de

menor tamaño con características similares pero de aspecto más oscuro (4) que puede contribuir a reconocer dicha neoplasia. Estas características son típicas del sarcoma de Ewing clásico, si bien se han descrito diversas variaciones en la morfología y en la actualidad se consideran tres subtipos histológicos:

a.- Sarcoma de Ewing convencional o clásico: Las células muestran patrón de crecimiento difuso, focalmente perivascular; así como pleomorfismo leve y escasas mitosis (3).

b.- PNET: Las células se disponen formando pseudorosetas de tipo Homer-Wright, con luz central y proyecciones citoplasmáticas en las mismas (5).

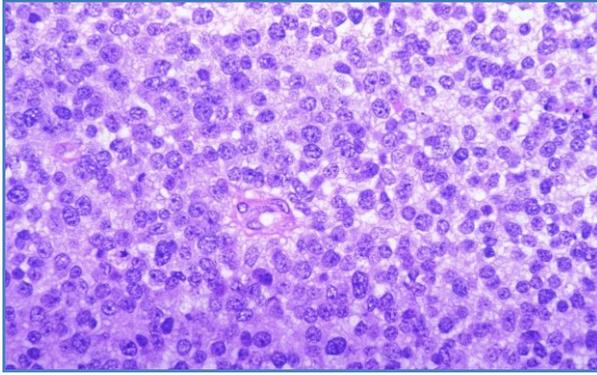
c.- Ewing atípico: engloba todas aquellas variantes morfológicas no encuadrables dentro del Ewing clásico o del PNET (6). Se trata por tanto del **SE de células grandes**, variante de mayor atipia celular y mayor tamaño de las células, con similar inmunofenotipo. **SE con áreas vasculares, hemangiopericíticas, o hemangioendotelial:** las células tumorales focalmente delimitan espacios, en cuyo interior se observan eritrocitos y un material eosinófilo acelular correspondiente a plasma, sin presencia de membrana basal (7). **SE desmoplásico** referido al patrón invasivo del SE en que existe abundante depósito intersticial hialino secundario. No está considerado una variante histológica pero sí un patrón histológico a tener en cuenta para un diagnóstico apropiado (3). **SE adamantinoma-like** está caracterizado por la disposición focal de las células en empalizada con una membrana alrededor. El subtipo **SE “like-sarcoma sinovial”** es aquel tumor en que existe presencia de >50% de morfología fusiforme de las células (4)

Hay que tener en cuenta que tanto la variante clásica, como la atípica pueden mostrar un citoplasma predominantemente claro, con abundante glucógeno dando una figura de **SE de células claras** o un predominio (>50%) de células elongadas, **SE con células fusiformes**.

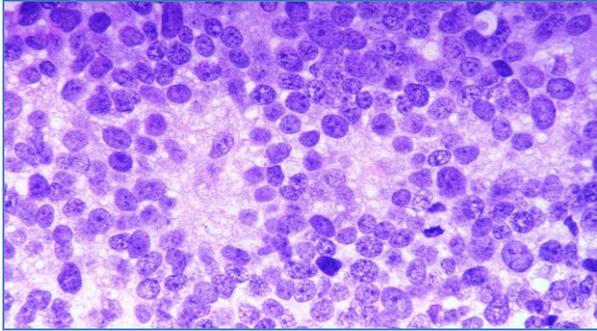
La característica genética del SE es la translocación recíproca t (11; 22) (q24; q12), resultando en la fusión de los genes *EWSR1* y *FLI1*, identificados en el 90% de los casos (8). La segunda anomalía molecular más común es la t (21; 22) (q22; q12), que fusiona los genes *EWSR1* y *ERG* presente en el 5% de los casos (9). Solo un pequeño porcentaje de SE muestra fusiones de *EWSR1* con otros miembros de la familia de factores de transcripción (ETS), como *ETV1* (7p22) (10), *E1A-F* (17q21) (11) y *FEV* (2q35 - 36) (12).

Además de estas anomalías genéticas bien definidas y relativamente comunes, se han informado fusiones menos frecuentes, ya sea con *EWSR1* fusionado a genes que no son ETS (13-16) o *FUS* sustituyendo a *EWSR1* en sus fusiones con factores de transcripción ETS (17-21).

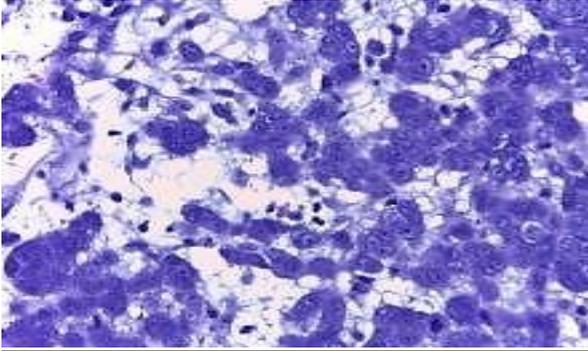
Además, se ha descrito una pequeña serie de tumores con células redondas pequeñas de núcleos azules que morfológicamente sugieren SE pero que genéticamente no lo son, son los llamados en un pasado reciente, sarcomas Ewing-*like*. En ellos las células son discretamente de mayor tamaño, ovales y más claras y en ocasiones el lugar de aparición es más frecuente en partes blandas aunque también se localizan en hueso. Son los sarcomas genéticamente llamados: *CIC/DUX4* (22), *CIC/FOXO1* (23) y *BCOR/CCNB3* (24).



Ewing Clásico



PNET



Ewing atípico

Figura 1.- Patrones morfológicos de los TFSE. Tinción de hematoxilina-eosina de Ewing clásico y PNET a 100 aumentos y Ewing atípico a 200 aumentos, mostrando células redondas pequeñas azules, presencia de pseudorosetas y una morfología más inusual con células de mayor tamaño, respectivamente.

1.1.2.- Ultraestructura

La microscopía electrónica pone de manifiesto las características morfológicas del tumor, con desmosomas incompletos entre las células, que se pierden debido a invaginaciones de la superficie celular. Así mismo, se detecta la ocasional presencia de filamentos intermedios; que justificarían la expresión inmunohistoquímica de marcadores epiteliales y de moléculas de adhesión celular (4). La presencia de desmosomas maduros, es rara.

El citoplasma celular es poco activo en la variante clásica, conteniendo grandes depósitos de glucógeno; mientras que en la variante atípica la cantidad de organelas es mayor y el contenido en glucógeno menor. Muestran núcleos redondeados centrales, con 1 ó 2 nucleolos poco aparentes (25).

En el subtipo PNET se encuentran rasgos evidentes de diferenciación neuroectodérmica como gránulos neurosecretorios, proyecciones celulares de tipo neural con neurotúbulos, terminaciones sinápticas ocasionales, material de lámina basal y diferenciación schwanniana (26).

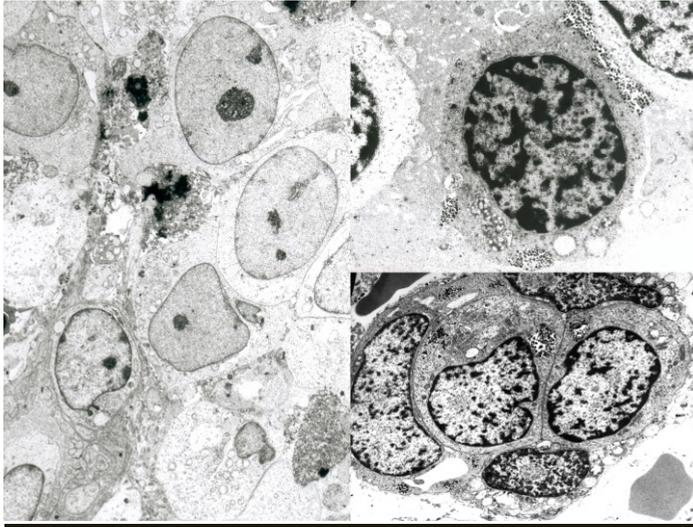


Figura 2.- Ultraestructura del Sarcoma de Ewing. Ausencia de diferenciación en las células, con un citoplasma con pocas organelas, junto a aisladas células en apoptosis a la izquierda. A la derecha aislados gránulos neurosecretorios y depósitos de glucógeno.

1.2.- Inmunofenotipo

El diagnóstico de los TFSE es en ocasiones complicado por su baja frecuencia, su morfología indiferenciada, su localización y el amplio abanico de diagnósticos diferenciales con tumores que pueden presentar células pequeñas redondas, azules. Es necesario por tanto, para su diagnóstico, no sólo una morfología característica sino un panel amplio de marcadores inmunohistoquímicos y estudio molecular. En la actualidad no existe un anticuerpo específico de TFSE aunque se han postulado como los más característicos: CD99, CAV-1, FLI1, HNK1 y ERG (el subtipo c-terminal) (27)

1.2.1.- Marcadores diagnósticos

El anticuerpo más utilizado para el diagnóstico del SE es el anti-**CD99** (HBA-71), con la tinción característica de membrana

(aunque puede teñir el citoplasma) que es positivo en el 95% de los casos. Fue descrito por Fellingner y colaboradores (28) y no es específico de los TFSE; siendo también positivo (aunque de forma más débil y principalmente de citoplasma) en los principales diagnósticos diferenciales (29), como es el caso de leucemia linfoblástica aguda (30), rhabdomyosarcomas, sarcoma sinovial (31), tumores rabdoideos y osteosarcomas de células pequeñas (32); así como en los sarcomas Ewing-like (33). Se ha visto involucrado en la capacidad de invasión de los tumores, en la disminución de la supervivencia y en la falta de diferenciación de las células del tumor (34). Se ha postulado como diana terapéutica, dado que su bloqueo provoca la muerte de las células in vivo mediante la desestructuración de MDM2 y la reactivación de p53 (35).

El antígeno **FLI1** tuvo un inicio prometedor, pero resultó menos específico y sensible que el CD99; de tal forma que los TFSE lo expresan en el núcleo pero no de forma constante, ni en exclusividad (29, 36). Otras neoplasias como son el sarcoma sinovial (31), los linfomas (30) el tumor rabdoide y los tumores vasculares también lo expresan (37).

HNK-1(CD57) es un marcador de diferenciación neural con expresión variable en los TFSE (3, 29). La inmunotinción con este marcador es generalmente citoplásmica y en ocasiones con acentuación paranuclear (tinción tipo Golgi). Al igual que ocurre con FLI1, este marcador carece de especificidad y además su sensibilidad es bastante variable (30, 31, 37).

La **caveolina 1 (CAV1)** es una proteína de membrana que participa en múltiples funciones celulares, entre ellas la carcinogénesis (38, 39). En los TFSE esta proteína se ha descrito

estrechamente relacionada con el gen de fusión *EWSR1/FLI1* (40). El gen que la codifica *CAV1* ha sido descrito anteriormente como uno de estos genes diana en el SE, implicado en la promoción de la proliferación celular (41), la angiogénesis (42), la aparición de metástasis (43) y de resistencia a la quimioterapia (44). La expresión de la proteína es citoplásmica y está sobreexpresada en una alta proporción de casos y por tanto se considera un marcador de utilidad en el diagnóstico de estas neoplasias (3)

Cuando se combinan los 4 anticuerpos descritos anteriormente (CD99, FLI1, HNK1 y CAV1) prácticamente se cubre el espectro diagnóstico de más del 99% de los TFSE genéticamente confirmados (3) . La combinación de los mismos, por tanto, junto a un panel básico de diagnóstico diferencial, que debe incluir necesariamente CD45, CKAE1-3 y marcadores musculares, es crucial en la rutina diagnóstica; independientemente de la variedad histológica (convencional, PNET, atípico) o del estadio clínico (6) . Pueden presentar positividad a otros marcadores que aun sin ser específicos, resulta de ayuda conocerlos ante un diagnóstico de sospecha. Se enumeran a continuación:

Neuroectodérmicos

La translocación que caracteriza a los TFSE, es la que determina una diferenciación neural, que se ve truncada por la expresión de CD99 (45). Dicha diferenciación, aunque truncada, se conserva de forma residual y variable en las células. De tal forma que podemos observar expresión de enolasa neuronal específica (NSE) (28), neurofilamentos (NF) (26), HNK1 (29), así como de las proteínas S100 y PGP 9.5 en los TFSE (46). La expresión de **NSE** no es exclusiva de los PNET (47), aunque sí es mayor cuando existe

evidencia morfológica de diferenciación neuroectodérmica (como en las pseudorosetas de Homer-Wright), su expresión está presente en todas las variedades morfológicas de los TFSE, pudiendo perderse en las variantes más indiferenciadas (28, 46).

La positividad para Leu7 (**HNK1**), como ya se ha comentado, es característica de los TFSE aunque no exclusiva. Se observa en las áreas de diferenciación neuroectodérmica, con positividad focal (3).

La **PGP 9.5** es positiva en el citoplasma de la mayoría de TFSE (46). Los **NF** son positivos fundamentalmente en los PNET (26), siendo la positividad para **S100** y **GFAP**, aislada y fundamentalmente presente en las áreas de diferenciación neuroectodérmica (29). No se ha estudiado, en cambio, si dichos marcadores se modifican en la evolución de la neoplasia o son diferentes entre los distintos subgrupos histológicos, pudiendo provocar un diagnóstico erróneo.

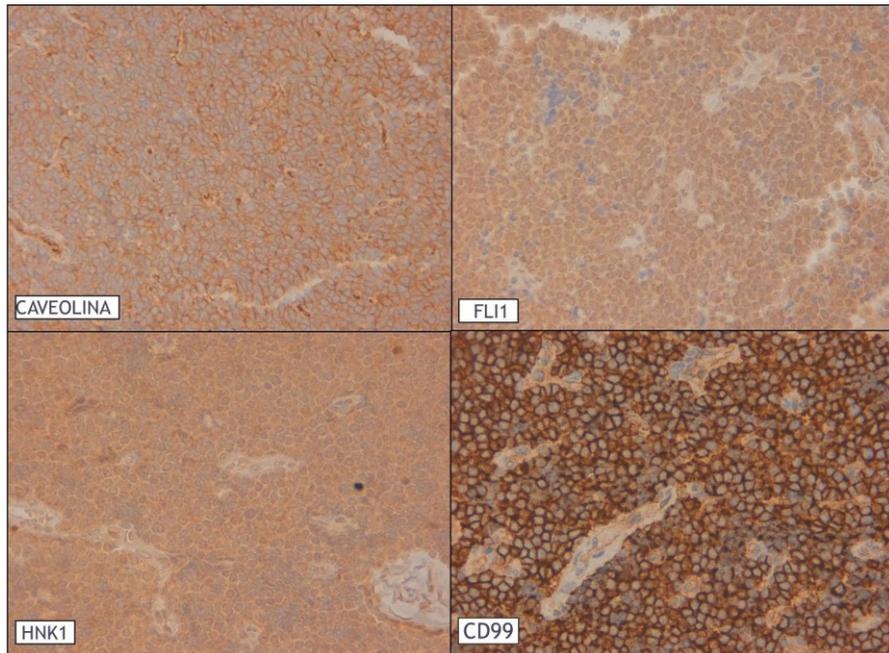


Figura 3.- Marcadores inmunohistoquímicos diagnósticos en los TFSE. Intensa y difusa expresión citoplásmica de caveolina y HNK1, nuclear de FLI1 e intensa y característicamente de membrana de CD99.

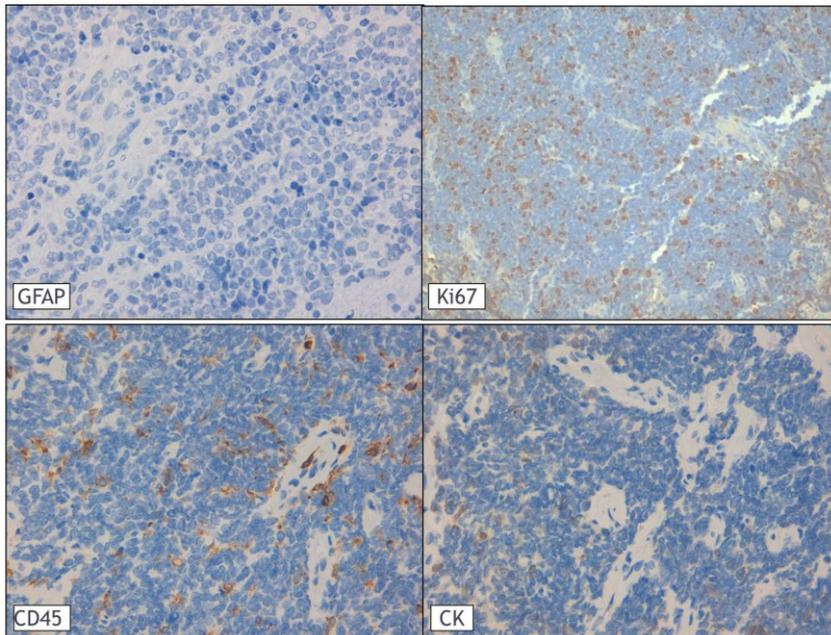


Figura 4.- Marcadores inmunohistoquímicos adicionales en el diagnóstico de los TFSE. GFAP es la proteína gliofibrilar ácida negativa en los TFSE. Ki67 es un índice proliferativo que marca los núcleos de las células que están activas en el ciclo celular; siendo de aproximadamente del 15%, en este caso. CD45 es el antígeno leucocitario común que tiñe el componente inflamatorio asociado al tumor, pero no las células tumorales. CK es una citoqueratina de amplio espectro (CkAE1-3) negativa en la mayoría de estos tumores.

1.2.2.- Marcadores neuroendocrinos

Existe expresión de marcadores neuroendocrinos (**cromogranina-A**, **sinaptofisina** y **CD56**) en los TFSE, aunque es focal e inespecífica (48). Dichos marcadores muestran positividad citoplásmica, siendo la sinaptofisina la más estable (3).

1.2.3.- Marcadores epiteliales

Entre el 20% y el 40% de los TFSE, según las series, pueden expresar marcadores epiteliales (49-52), fundamentalmente los que presentan una morfología atípica (53). La citoqueratina de amplio espectro (CKAE1-3) es la más comúnmente utilizada en la bibliografía, así como CAM 5.2 (51), E-cadherina (52), CEA policlonal, EMA, CK8 / 18 y CK34 β 12 (53). El estudio comparativo de éstos marcadores en tumores originales y sus metástasis, así como su evolución en el tiempo, no ha sido estudiado todavía.

1.2.4.- Marcadores biológicos

Existen numerosas vías de señalización alteradas en el sarcoma de Ewing, que se pueden agrupar en dos mecanismos principales que controlan la proliferación y muerte celular controlada o apoptosis. Por un lado la pérdida de factores que inhiben la proliferación por distintas vías (por ejemplo *CDKN2A* (p16) y *TP53*) y por otro, la sobreexpresión de receptores de membrana, con función tirosinquinasa, que dan lugar a su activación constitutiva resultando en la proliferación descontrolada de estos sarcomas. Los principales

son cKIT e IGF1R (54). Conocer estas vías de señalización resulta clave para avanzar en el tratamiento de estas neoplasias.

a.-Factores reguladores de la apoptosis

Las principales moléculas implicadas en el mecanismo de anti-apoptosis en los TFSE son CD117, factor de células madres (SCF), CD95 (FAS), CD95L (FASL), **BCL2**, **caspa** 8 y el receptor del factor de crecimiento insulínico 1 (**IGF1R**).

BCL2

Es un protooncogen que da nombre a una familia de proteínas implicadas en el proceso de muerte celular controlada o apoptosis (55) y su expresión está alterada en la mayoría de tumores. En condiciones normales BCL2 se une e inhibe a proteínas proapoptóticas que facilitan la apertura de poros mitocondriales y regulan la activación de caspasas, como BAX, BAK, BID, BAD, BIM, BIK, BLK y PUMA. El equilibrio de estas interacciones modula la permeabilidad de la membrana mitocondrial facilitando o inhibiendo la apoptosis. En condiciones de estrés celular o daño al ADN, la sobreexpresión de BAX por TP53 desplaza el equilibrio hacia la apoptosis (56). En diversos tumores, como el sarcoma de Ewing, la sobreexpresión de BCL2 reduce la permeabilidad de la membrana mitocondrial, inhibe la apoptosis y las células sobreviven y crecen descontroladamente (57). Las formas en que se puede alterar la expresión de BCL2 son variables, una de ellas es mediante la expresión aberrante de diversos miRNA, producto de la presencia de alteraciones cromosómicas, o mediante el efecto de la propia quimioterapia y radioterapia (57).

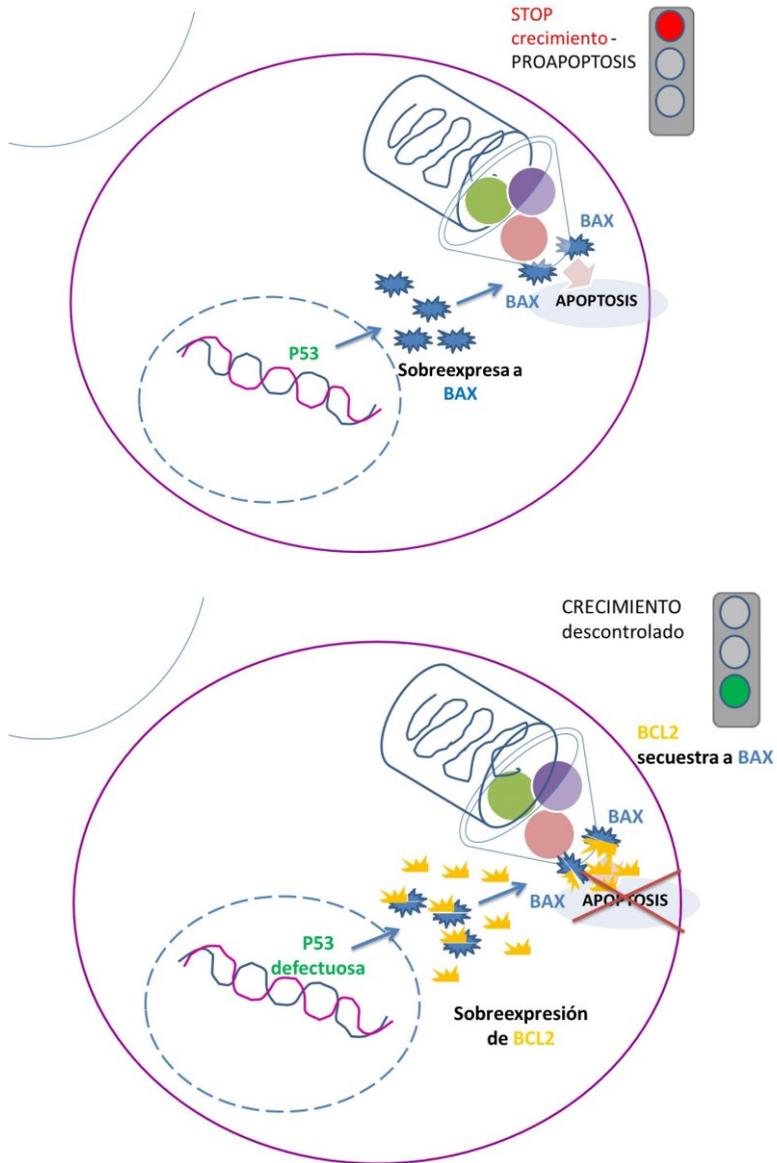


Figura 5.- Efecto antiapoptótico de BCL2. Se observa cómo la sobreexpresión de BCL2 (en amarillo) secuestra a BAX (en azul) que es incapaz de formar el poro en las mitocondrias y mediar la apoptosis. Este mecanismo está favorecido por la escasa expresión de BAX debido a defectos y deficiencias de p53, frecuente en muchos de estos tumores (58).

Caspasa 8

La caspasa 8 es un miembro de la familia de las caspasas, unas proteínas, que participan en la vía extrínseca de la apoptosis dentro del dominio de señalización inductor de muerte (DISC, death-induced signalling domain) (59) . La vía extrínseca de la apoptosis implica receptores de la superficie celular, como son el factor de necrosis tumoral (TNF), el ligando inductor de la apoptosis vía TNF (TRAIL) y el CD95 (Fas) (60). La unión de los receptores de muerte celular DR4 o DR5 con TRAIL, resulta en el reclutamiento del complejo de señalización inducido por la muerte (DISC), que incluye la proteína adaptadora FADD y proteínas iniciadoras caspasa-8 o -10 (59, 61) .

Debido a la selectividad potencial de TRAIL para las células cancerosas, ha habido un interés significativo en buscar tratamientos que bloqueen a los receptores (62, 63) ERBB y efectores de TRAIL (64, 65). Existe un tratamiento, Conatumumab que in vitro, induce activación rápida de DR5 y la apoptosis en el SE (66). Dicha sensibilidad se correlaciona con la expresión de la caspasa-8 en el tumor.

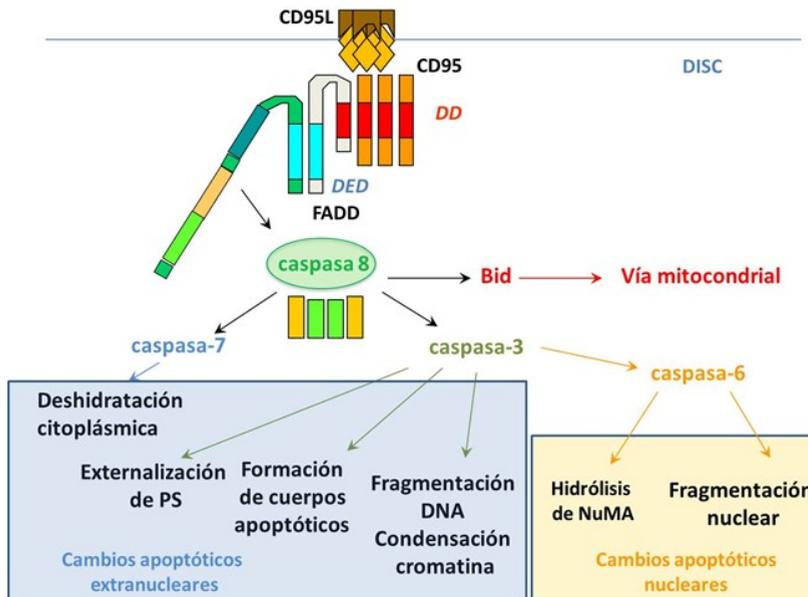


Figura 6.- Vía extrínseca de la apoptosis, con el papel central de caspasa 8 en la iniciación de los cambios tanto nucleares, como extranucleares.

b.- Factores de migración celular

Ezrina es una proteína de unión entre la membrana y el citoesqueleto que ha sido relacionada con las metástasis y un pronóstico desfavorable en sarcomas de alto grado, como osteosarcomas, los sarcomas de Ewing metastásicos y los sarcomas indiferenciados de alto grado (67). La expresión de ezrina fue descrita inicialmente en neoplasias óseas malignas, como marcador de utilidad en el diagnóstico diferencial entre osteosarcomas y condrosarcomas que resulta en ocasiones complicado (68, 69). La expresión de Ezrina en los TFSE se perfila como un factor independiente de buen pronóstico, de tal forma que los tumores con mayor expresión, muestran mejor pronóstico (70).

c.- Factores de proliferación celular

Marcadores relacionados con la vía NOTCH

La vía NOTCH es una vía de activación celular compleja que ha sido descrita tanto en tejidos normales, como en neoplasias. La función que tiene NOTCH en cada célula es diferente y específica, de forma que en unas puede actuar inhibiendo la diferenciación celular (71) y promoviendo la tumorigénesis y en otras como supresor tumoral (72). Los receptores NOTCH (NOTCH1-4) son proteínas transmembrana implicadas en la interacción célula-célula y son activadas por la γ -secretasa, una proteasa específica que procesa la porción citoplásmica de Notch permitiendo su traslocación al núcleo (73). Dicha activación puede ser detectada inmunohistoquímicamente. En los TFSE, se han descrito efectos diversos de la vía NOTCH. Se ha descrito que la translocación *EWSR1-FLI1* silencia esta vía mediante el bloqueo de JAG1, uno de los ligandos de NOTCH (72, 74). Por tanto, si se bloquea *EWSR1/FLI1*, se reactiva la vía de NOTCH dando lugar a la transcripción y expresión de sus efectores HEY y HES. HEY es un factor de transcripción que reprime a la deacetilasa SIRT1, resultando en la activación por acetilación de p53 y la supresión tumoral mediante la transcripción del inhibidor del ciclo celular p21, entre otros. Por otro lado, la inhibición de NOTCH induce diferenciación neural (72, 75). No obstante, su papel diagnóstico y/o pronóstico en sarcoma de Ewing es desconocido.

SIRT1 o sirtuina1 es una proteína que ha sido relacionada en múltiples funciones del organismo, como el envejecimiento, el estrés,

la diferenciación y la progresión en el ciclo celular, entre otras (76). Su forma activa está localizada en el núcleo celular, aunque su expresión citoplásmica en los sarcomas, ha sido definida como característica de diferenciación muscular (77). En los TFSE, se ha observado positividad variable, con una mayor expresión en aquellos casos metastásicos de inicio y en las metástasis con respecto a sus tumores originales (78).

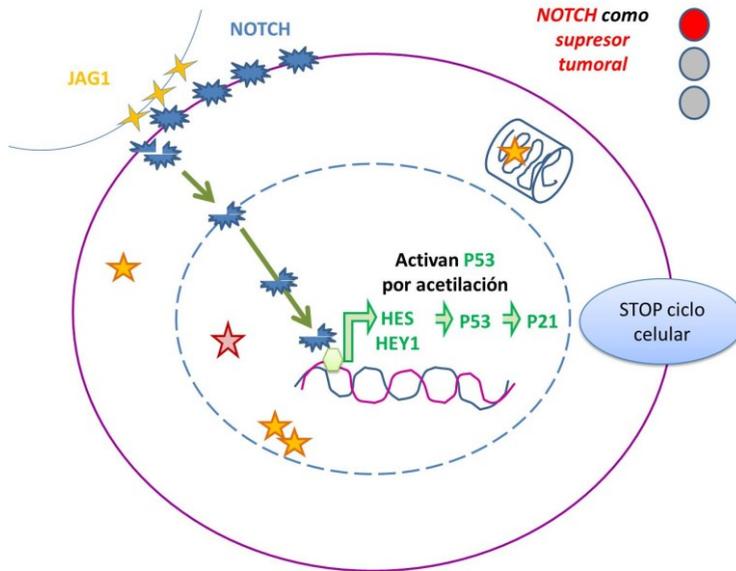
SIRT1 interviene junto con LSD1 en el control de la expresión de determinados genes entre ellos HEY, participando en la inactivación de p53. (78). Su inactivación ofrece, por tanto opciones terapéuticas en esos tumores (79)

LSD1 (KDM1A)

Del inglés *Lysin-specific demethylase*, fue la primera proteína desmetiladora de histonas que se descubrió (80, 81). La metilación de las histonas, es un mecanismo de modificación de la estructura de la cromatina que regula dinámicamente los procesos celulares incluyendo transcripción y estabilidad genómica. Hasta 2004, se desconocía la capacidad celular de revertir la metilación de histonas. Sin embargo, con el descubrimiento de la primera histona desmetilasa, la específica de lisina 1 (LSD1) (80) se desafió esta noción y se probó que la metilación de la lisina se regula dinámicamente. La forma activa de LSD1 aparte de desmetilar histonas, desmetila otras proteínas como p53 y E2F1, concretamente la desmetilación de p53 en K370me1/2 (82) y la desmetilación y estabilización de E2F1 en K185 (83), regulando de forma activa el ciclo celular y la apoptosis,

Recientemente se han identificado inhibidores de LSD1 que podrían actuar como potenciales dianas terapéuticas. HCI-2509 es

un potente inhibidor de LSD1 que permite modificar todos los perfiles transcripcionales promovidos por *EWSR1-FLI* y *EWSR1-ERG* y retrasar significativamente la tumorigénesis *in vivo* (84). LSD1 es por tanto crítico en el mantenimiento del ADN, en la migración, invasión y diferenciación celulares.



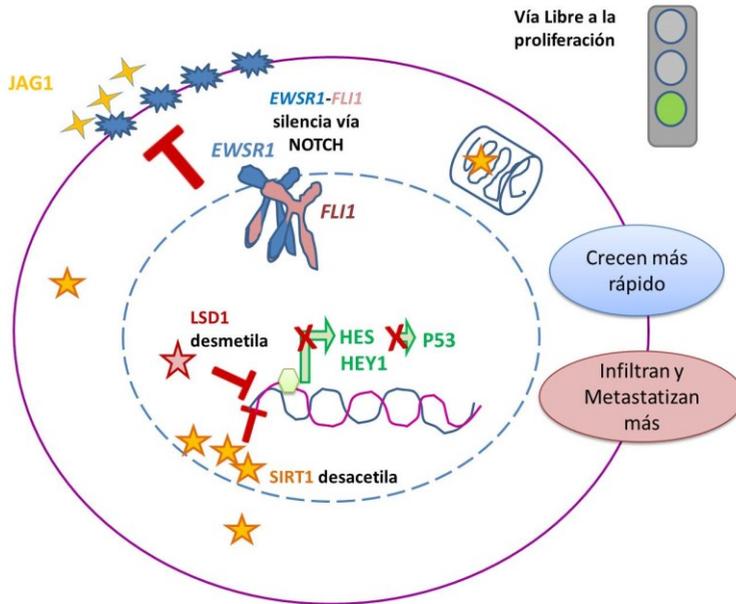


Figura 7.- Vía de Señalización NOTCH. En la figura se representa cómo se anula la vía NOTCH en los TFSE por la translocación *EWSR1-FLI1*. A la vez que *SIRT1* y *LSD1* bloquean la transcripción de *HEY1*, inactivando indirectamente la función de *p53*.

1.2.5.- Vías de Señalización

AKT y mTOR

La vía de señalización IGF1-R/PI3K/AKT/mTOR es una de las principales en el SE, que regula múltiples funciones celulares manteniendo la proliferación celular, previniendo la apoptosis y aumentando la angiogénesis (85). Además, la producción de IGF1 por el estroma ha sido relacionada con la interacción de las células tumorales con el ambiente, aumentando su capacidad de invasión y metástasis.

El bloqueo de esta vía de señales ha ampliado el abanico de opciones terapéuticas en el SE (86-89). Pueden ser estudiadas por inmunohistoquímica (85) lo que ha permitido determinar su valor

pronóstico. Su estudio en distintos subtipos de SE, así como la evolución de esta vía en el tiempo puede resultar de interés a la hora de ajustar el tratamiento.

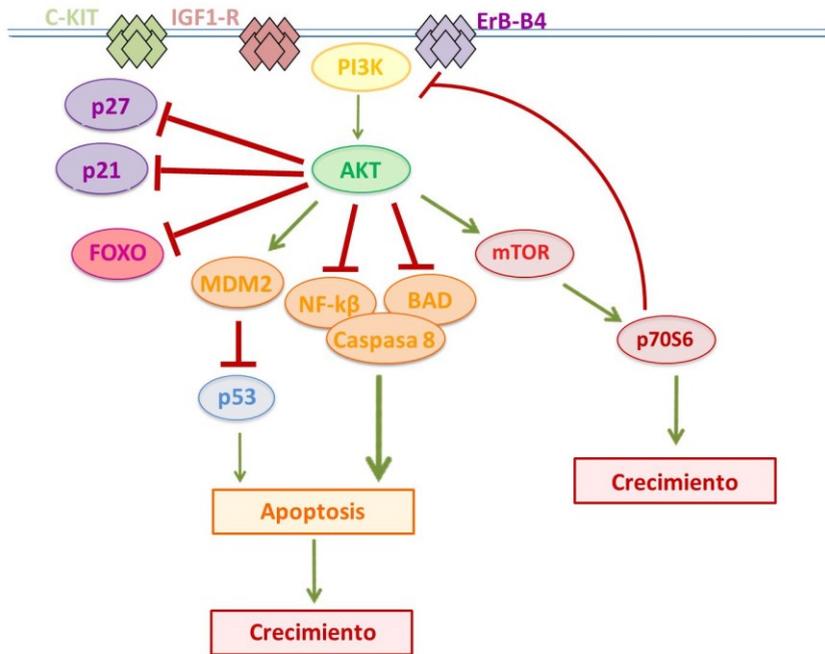


Figura 8.- Vía de Señalización de AKT. En la figura se representa cómo participa AKT promoviendo la proliferación en el SE. La activación de AKT es estimulada por C-KIT, IGF1-R y ERBB4. Sus efectores a los que activa, se indican en flechas verdes y a los que bloquea en líneas rojas.

NF-κB

Es un factor de transcripción que se encuentra en prácticamente todas las células regulando múltiples efectos pleiotrópicos como la inflamación, diferenciación, crecimiento, apoptosis así como la génesis tumoral. Se mantiene en el citoplasma debido a su interacción con factores que lo inhiben (I-kappa-B). La

fosforilación de estos factores les lleva a su degradación por el proteasoma y a la liberación de NF- κ B, traslocándose al núcleo en donde transcribe a los genes que regula (90).

En el SE participa en la resistencia de las células tumorales a los tratamientos anti-TNF. La activación de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK) por TNF α tiene un efecto proapoptótico que es inhibido por la activación concomitante de NF- κ B (91). Por tanto, la inhibición de la activación de NF- κ B (i.e. con inhibidores del proteasoma como bortezomib) reduce la supervivencia celular y aumenta la sensibilidad de las células a los tratamientos citostáticos (92). El Bortezomib como inhibidor de la NF- κ B ha sido utilizado con éxito en el Mieloma Múltiple (93, 94).

NF κ B participa de la falta de diferenciación en las células del SE, de tal forma que bloqueando CD99, se inhibe la actividad de NF κ B y las células no se diferencian (95).

ERBB4

Es un receptor de membrana de la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que interviene en la interacción celular y su sobreexpresión activa una de las principales vías de señalización en el SE, la vía de PI3K-AKT, favoreciendo la invasión y la metástasis (96). Dicho fenómeno ha sido estudiado tanto *in vivo*, como *in vitro* en líneas celulares de SE (97). La sobreexpresión de ERBB4 favorece la invasión y el crecimiento y su bloqueo, reduce significativamente la aparición de metástasis *in vivo*, lo que sería de utilidad en la prevención de metástasis y permitiría un mejor control de la enfermedad. Su expresión no ha sido evaluada hasta la fecha, ni comparada entre distintos subtipos de TFSE, ni entre tumores originales, recidivas y metástasis.

FOXO1

FOXO1 pertenece al grupo de factores de transcripción *Forkhead box O* (98). Se ha descrito como un gen supresor tumoral, promoviendo la apoptosis y bloqueando la actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (99) . La fusión *EWSR1-FLI1* interfiere en la expresión de algunos genes, entre ellos FOXO1 (100) , de manera que reduce su expresión y por tanto reduce la apoptosis. Se ha visto que el bloqueo de *EWS-FLI1* con RNA de interferencia (siRNA) aumenta la expresión de FOXO1 y disminuye la proliferación de las células (101) La inhibición de la expresión de *EWSR1-FLI1* bloquea el ciclo celular mediante la sobreexpresión de FOXO1, la reducción en la expresión de ciclina D (102) y la pérdida de fosforilación de RB (101) . Existe en el SE otras vías de inactivación de FOXO 1, a nivel proteico, por la degradación de la proteína en el núcleo. Esta degradación está favorecida por una vía PI3K/AKT activa y por la desacetilasas como SIRT1, ambas vías activas en los SE tal y como hemos podido comprobar y ha sido publicado.

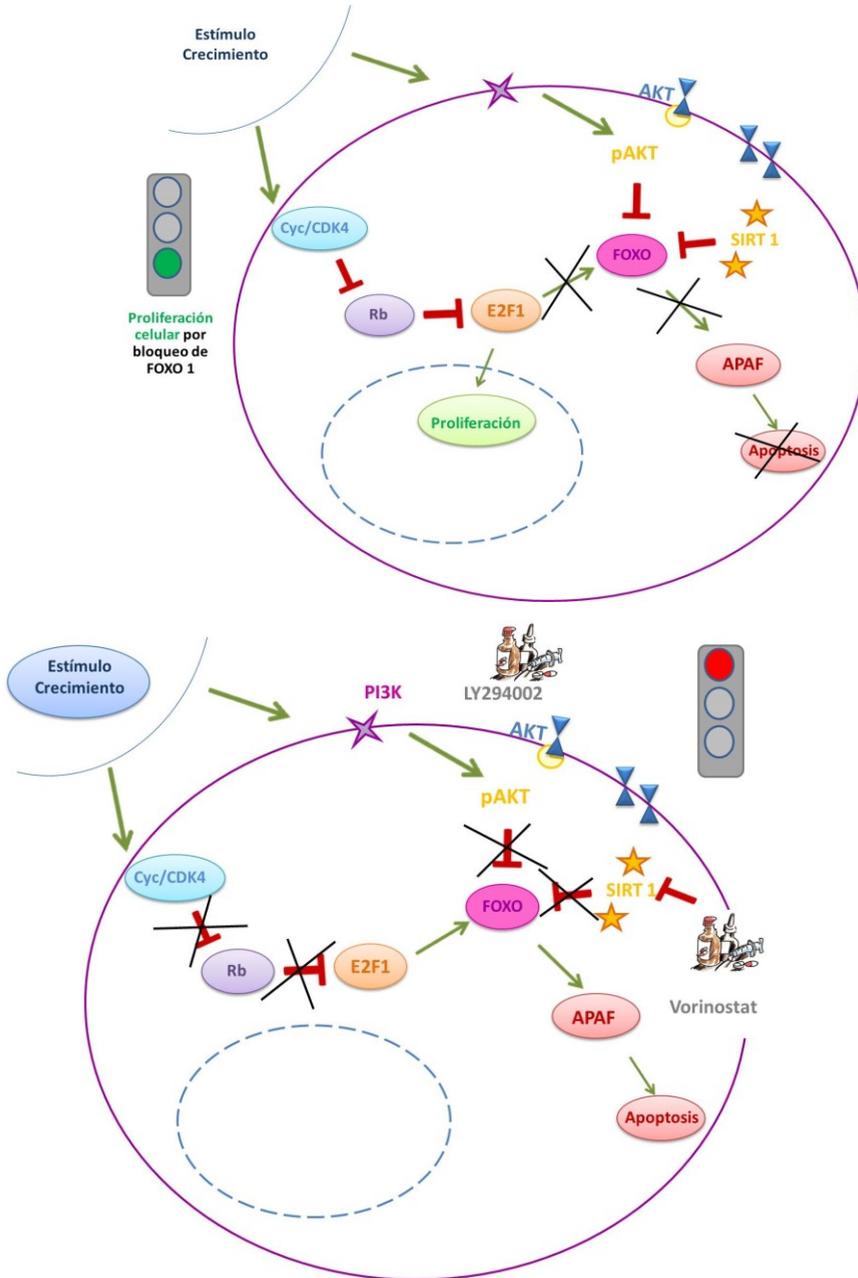


Figura 9.- Efecto de FOXO en las células. En la figura superior, el bloqueo de FOXO inhibe la apoptosis y las células proliferan. Si se deja de bloquear mediante tratamientos que inhiben PI3K o SIRT1, se favorece la apoptosis.

1.2.6.- Reparación del ADN

PARP1

Debe su nombre a su actividad enzimática poli (ADP-ribosa) polimerasa, enzima reguladora implicada en la transcripción y reparación del ADN (103). Se ha estudiado tanto en neoplasias sólidas, fundamentalmente en el cáncer de mama BRCA1 mutado (104) y triple negativos (105), como en el cáncer de próstata (106), en el neuroblastoma (107), en gliomas (108), melanomas (109) y en el sarcoma de Ewing (109-112).

El daño al ADN ocurre diariamente de manera natural por el metabolismo mitocondrial (formación de especies reactivas de oxígeno en la cadena de transporte de electrones), fallos en la replicación del ADN, exposición a radiación UV y a agentes químicos nocivos, etc (113). Existen diversas vías de reparación del ADN. La reparación del ADN a través de mecanismos que implican roturas de la doble cadena del ADN, como la recombinación homóloga, está muy inhibida en los carcinomas sólidos con mutación en BCRA1 o en BCRA2. Estas células compensan el déficit de reparación del ADN mediante la sobreactivación de PARP, cuya capacidad de reparación del ADN ocurre a través de la rotura simple de una sola cadena (104). Los inhibidores de PARP bloquean este mecanismo y favorecen que, de una manera selectiva, la célula cancerosa entre en apoptosis al no poder reparar el ADN de ninguna de las maneras (110). En el SE, el defecto es diferente (111). No se ha visto un defecto de reparación en el ADN, sino una hipersensibilidad a los complejos ADN-PARP que impiden a la célula entrar en apoptosis. Mediante ensayos de inmunoprecipitación se ha demostrado en cultivos celulares la interacción entre las proteínas de fusión *EWSR1-FLI1* y *EWSR1-ERG* con PARP1 (110). De esta forma, las células que

expresan estas proteínas quiméricas muestran un reducido crecimiento cuando son tratadas con Olaparib (potente inhibidor de PARP1 y PARP2); algo que no ocurre en las líneas celulares de osteosarcoma (SAOS-2) ni de rhabdomyosarcoma (A-204). Existe un aumento de roturas de ADN en los TFSE debido a la fusión *EWSR1-FLI1*, algo que se potencia utilizando los inhibidores de PARP, reduciendo así la supervivencia celular y por tanto, el crecimiento celular y la capacidad de invasión y metástasis de dichas células. Olaparib asociado a la quimioterapia convencional utilizada en el SE, como la Temozolomida, reduce significativamente el crecimiento tumoral in vitro, frente a cualquiera de los dos de forma aislada. De hecho, este tratamiento ha sido ya utilizado en segunda línea en casos altamente agresivos demostrándose como potenciador del efecto de la quimioterapia aislada (114).

SA2

Las cohesinas son un complejo de proteínas encargadas de la unión y separación de las cromátides hermanas en la mitosis, a la vez que participan organizando la interfase (115). Se han descrito Smc1, Smc3, Rad21/Sccl y los antígenos estromales 1 (SA1) y 2 (SA2). Concretamente SA2 participa en la separación de los centrómeros (116). La subunidad SA2 es de 3-10 veces más abundante que la cohesina SA1 en humanos (116, 117). Se ha descrito que la inactivación de SA2 provoca aneuploidía en el cáncer humano (118). Recientemente se ha estudiado el papel de SA2 en cáncer de mama, observándose que la disminución de la inmunexpresión se asocia con enfermedad mamaria maligna y un curso particularmente desfavorable (119). En los TFSE se ha estudiado el estado mutacional de SA2 y su correlación con la expresión inmunohistoquímica de la proteína (120). El estudio revela

que cuando existe mutación del gen la proteína no se expresa, hecho que ocurre fundamentalmente en tumores de estadios avanzados. La expresión de la proteína en el tiempo y en distintas situaciones clínicas no ha sido estudiada.

1.2.7.- Marcadores de ciclo celular

Desde un punto de vista genético, como ya hemos visto con anterioridad, los TFSE se caracterizan por translocaciones recíprocas que involucran factores de transcripción ETS, siendo *EWS-FLI1* y *EWS-ERG* los más comunes (8, 121). *EWS-FLI1* funciona como un factor de transcripción aberrante que regula procesos cruciales como el crecimiento celular, la apoptosis y la diferenciación a través de la inducción o represión de genes diana específicos (122). Se ha demostrado que la expresión forzada de *EWS-FLI1* en células madre mesenquimales humanas, es suficiente para transformar células e inducir un perfil de expresión génica similar al observado en células EWS (123). El panorama genómico de EWS, que ha sido explorado recientemente por tres grupos diferentes a través de múltiples métodos de secuenciación masiva (NGS) (120, 124, 125) ha demostrado que la tasa de mutación somática en EWS es baja. Aparte de las ganancias ya conocidas del número de copias en los cromosomas completos 8, 12 y el brazo q de chr 1 y la pérdida en el brazo largo de chr 16 y el locus *CDKN2A* en chr 9p 14, 15, no se han informado mutaciones somáticas recurrentes en EWS, con la excepción de TP53 (5%-20%) y el miembro de la familia del complejo de cohesina *STAG2* (15-21%) (120, 124, 125). Estas alteraciones influyen en el pronóstico del paciente y sirven como biomarcadores

potenciales para la estratificación del riesgo del paciente (126, 127), no obstante su valor terapéutico es limitado.

p53

La pérdida del control del ciclo celular es un paso crítico en el desarrollo de una neoplasia y consiste en una serie de pasos regulados que gobiernan la proliferación celular. Está controlado por las ciclinas quinasas (CDK) que fosforilan la proteína del retinoblastoma (Rb), un gen supresor tumoral clásico y clave en el punto de control G1 / S. Esto permite que la replicación del ADN continúe. Los inhibidores de CDK, como son p16INK4A, p21 y p27 actúan como frenos en la progresión a través del ciclo celular (128).

La proteína p53 está codificada por el gen *TP53* (considerado el guardián del genoma) y es la responsable de impedir el crecimiento celular e inducir apoptosis. TP53 está alterado entre el 5% y el 20% de los TFSE según las series; tanto en forma de mutación puntual, como de delección (126, 129) y su pérdida de función ha sido definida como una de las responsables de la progresión de estas neoplasias (129-131). No obstante, p53 no se considera un marcador pronóstico estable, dado que los resultados en las series han sido contradictorios (58, 125, 130, 132); no demostrándose diferencias significativas en las grandes series, entre presencia o no de mutación y evolución clínica adversa (58, 132). Igualmente, no se ha observado una correlación directa entre la sobreexpresión de la proteína, detectada por inmunohistoquímica y su alteración molecular, detectada por secuenciación de ADN (58); por lo que la utilidad y aplicación de dichos resultados para definir pronóstico está en entredicho. Se ha observado mayor expresión en los PNET que en el resto de subtipos morfológicos de los TFSE (132)

, hallazgos no relacionados con un peor comportamiento clínico. Hasta la fecha no se ha estudiado el cambio de expresión y/o de estatus mutacional en el tiempo; así como tampoco la persistencia o cambio de dicho estado en las recidivas o metástasis con respecto al tumor original.

Ki67

El índice de proliferación Ki67 (o MIB-1) es un marcador que define las células que están en forma activa en ciclo y se están replicando. El índice proliferativo Ki67 en los sarcomas no ha logrado sustituir al conteo de mitosis por 50 campos en la práctica diaria, ni en las clasificaciones, ni en las gradaciones internacionales (1). No obstante, resulta orientativo y de utilidad en el diagnóstico de los tumores (128). En los TFSE se ha descrito una expresión variable e irregular según las series (132, 133); a la vez que se ha definido como factor pronóstico independiente en los casos de SE inicialmente localizado, de supervivencia libre de enfermedad (SLE) y de supervivencia global (SG). Así mismo, se ha asociado a factor pronóstico los subtipos de fusión entre los genes *EWSR1* y los distintos factores de transcripción de la familia de ETS. La fusión tipo 1 que une el exón 7 del gen *EWSR1* con el exón 6 del gen *FLI* es, la más frecuente y la de mejor pronóstico, asociándose a un menor grado de expresión de Ki67 (134).

Sigue sin definirse en la actualidad un porcentaje de expresión de Ki67 que prediga qué casos van a ir peor y sea de utilidad en el diagnóstico diario.

p27

p27 es una proteína codificada por el gen con su mismo nombre encargada de bloquear distintas CDKs y detener el ciclo celular (135), por lo que ha sido considerada como el producto de un gen supresor tumoral. En el sarcoma de Ewing p27 está bloqueada por 2 motivos principales, por un lado por la represión transcripcional que ejerce el oncogen *EWSR1-FLI1* en su expresión (136) y por otro, por su secuestro en el citoplasma por la activación de AKT (137). De tal forma que la inhibición de CDKs es reducida y se facilita la progresión a lo largo del ciclo celular (138). Por tanto, la baja expresión de p27 es de peor pronóstico (138) y la sobreexpresión de buen pronóstico (85). La expresión y función de p27 en la evolución clínica del sarcoma de Ewing así como en sus distintos espectros morfológicos no ha sido estudiado hasta la fecha.

YB-1

La proteína de unión Y-Box 1 (YB-1) está codificada por el gen *YBX1* y participa en la transcripción del ADN, en el procesamiento del ARN y en la traducción del mismo (139, 140). YB-1 juega un papel importante como oncogen en la invasión celular y en la resistencia a la quimioterapia (141, 142); así como activando aquellos genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima, como los factores de transcripción Snail y Twist (141) y activando la vía AKT/ mTOR y por tanto, con la capacidad infiltrativa de estas neoplasias (143)). En los sarcomas se ha demostrado que la expresión de YB-1, tanto en cultivos celulares como en xenotrasplantes, se relaciona con una mayor capacidad metastásica (144). De tal forma que si se bloquea la expresión de YB1 (*YB1 Knock-down*) el tumor crece pero no metastatiza.

1.2.8.- Genes reguladores de la expresión génica.

miRNA

Son pequeños fragmentos no codificantes de ARN, entre 21 y 25 nucleótidos, que regulan la expresión génica mediante un mecanismo de interferencia con el ARN mensajero de los genes a los que regula (145). Los miRNA se desregulan en los tumores, de forma característica para cada uno de ellos, por lo que pueden colaborar en el diagnóstico y ayudar a predecir su comportamiento.

En los TFSE se conocen 58 miRNA que están desregulados, al menos en la serie más amplia hasta la fecha (2006 italiana) y que podrían ser clave en la evolución de dichos tumores porque interfieren con los principales genes implicados en la biología de estos tumores (italianos, 2016). Junto a ello se ha descrito la sobreexpresión de receptores de membrana, con función tirosinquinasa, que se autoestimulan y mantienen una proliferación descontrolada en estos sarcomas (145, 146). Los principales son cKIT e IGF1R.

cKIT

CD117 o cKIT (en referencia al gen que codifica su expresión), es una glicoproteína transmembrana que forma parte del receptor celular KIT. En condiciones normales se expresa en numerosas células del organismo, como en células pluripotenciales de la médula ósea, en mastocitos, en melanocitos de la piel y en células del epitelio mamario. La sobreexpresión patológica de CD117 ocurre en diversos tumores, fundamentalmente en el tumor del estroma gastrointestinal (del inglés GIST). El dominio tirosina quinasa de KIT cataliza la fosforilización de tirosinas específicas de numerosas proteínas que transducen la señal hacia el interior de la

célula y regulan importantes procesos celulares, incluyendo proliferación celular, apoptosis y diferenciación (referencia).

Se ha visto que los sarcomas de Ewing expresan tanto cKIT como su ligando, el factor estimulador de células madre (SCF) (147, 148). Y dicha expresión protege de la apoptosis, a la vez que interactúa con IGF1R y provoca su fosforilación y consecuentemente su activación (149). El mesilato de imatinib es un potente inhibidor de la actividad tirosina quinasa de cKIT y experiencias tanto *in vivo* como *in vitro* han mostrado que en presencia de imatinib las células tumorales crecían menos y eran más sensibles a la quimioterapia (150). No obstante, dicho bloqueo no es capaz de frenar otras vías activas en el sarcoma de Ewing, como la vía IGF1R/ fosfoinositol3-fosfato quinasa (PI3K)/AKT; que se ha definido como más importante en estos tumores (85).

IGF1R-IGF

La vía de señalización IGF-IGF1R es una vía de señalización extracelular que interviene en la proliferación celular, el crecimiento y la supervivencia (151). El receptor se activa por autofosforilación al unirse con los ligandos IGF1 y con menor frecuencia, IGF2. Es una vía frecuentemente activa en los SE (89) . De hecho, se ha demostrado que la traslocación *EWSR1-FLI1* necesita de la activación de IGF1-R para desarrollar un sarcoma de Ewing *in vivo* (152) . A la vez que la propia traslocación se une al promotor de IGF1 permitiendo su sobreexpresión y consecuentemente la activación de IGF1R y al promotor de IGFBP3, inhibiendo su expresión y por tanto liberando a IGF1 (153) , tal y como se observa en la figura 8 (153, 154). La activación de IGF1R desencadena a su vez, la activación de la vía PI3K/AKT/mTOR y RAS/ERK y consecuentemente la proliferación, la infiltración y las metástasis (54). Bloquear IGF1R, es

por tanto una opción terapéutica en los SE, dado que reduce el crecimiento celular, tanto in vitro como en xenotrasplantes (152, 155). De hecho, terapias diana con anticuerpos humanizados anti IGF1R ya han sido utilizadas en ensayos clínicos, como IMC-A12 (cixutumumab) fase II, (156) para el tratamiento del sarcoma de Ewing recurrente o refractario y Ganitumab fase III (157) para el tratamiento del sarcoma de Ewing metastásico. Los resultados en fase II han sido prometedores y ofrecen una ayuda terapéutica al manejo de estas neoplasias (158), pero la tolerancia de los pacientes era mala, dado que provocan intensas hipoglucemias. Así mismo, han aparecido resistencias a los fármacos que bloquean IGF1R y que consecuentemente deben ser estudiadas con mayor detalle (159). De igual modo, deben estudiarse estrategias combinadas y sus interferencias con otras dianas terapéuticas utilizadas en diversas neoplasias como son inhibidores de BRAF (160) y AKT (161) y sus posibles combinaciones con otras dianas para evitar dichas resistencias (87, 161, 162).

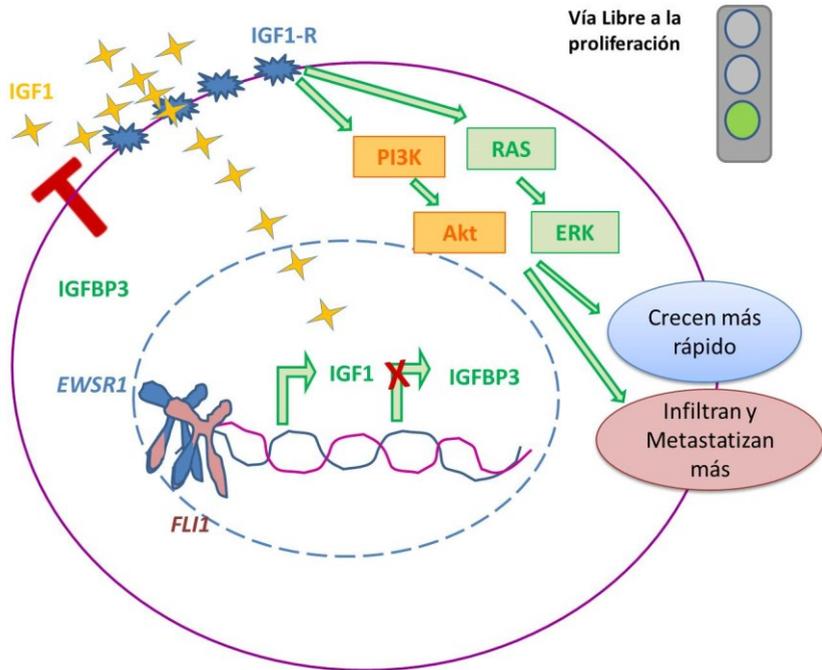


Figura 10.- Efecto de la activación de IGF1R en SE. La proteína de fusión EWSR1-FLI1 activa el promotor de IGF1 facilitando su sobreexpresión, a la vez que bloquea la expresión de IGFBP3, proteína que secuestra e inhibe a IGF1.

BRAF

BRAF es un oncogén crítico para la proliferación y supervivencia de las células del melanoma a través de la activación de la vía RAF /MEK / ERK de la vía de las quinasas activadoras de la mitosis (MAPK) (163, 164), convirtiendo a BRAF en un objetivo atractivo para la terapia anti-melanoma. Estudios recientes revelan que más de la mitad de los melanomas presentan una mutación activante en el amino ácido V600 del gen BRAF (BRAF V600E)

(165). Existen inhibidores específicos de la mutación y otros por debajo de la señalización de BRAF capaces de bloquear dicha mutación y sus efectores (inhibidores de MEK) como son RAF-265 (Novartis), XL281 (Exelixis), PLX4032 (Plexxikon/Roche) y GSK2118436 (GSK). Estos inhibidores están siendo utilizados en ensayos clínicos en enfermedad avanzada (160).

La mutación de BRAF y consecuentemente su sobreexpresión, no ha sido extensamente estudiada en el SE, siendo su expresión baja en la única serie publicada (166). Es interesante por tanto estudiar su expresión en nuestros casos, no sólo de forma estática, sino dinámica en el tiempo.

1.3.- Características Clínicas

Un tercio de estos tumores presentan metástasis al diagnóstico; siendo por tanto su pronóstico malo, sin haberse encontrado mejoría en los últimos 30 años a pesar de haberse identificado nuevas dianas terapéuticas y existir abundantes estudios al respecto. Tampoco somos capaces de predecir qué tumores inicialmente localizados van a ser mejor respondedores al tratamiento adyuvante, ni cuáles van a progresar a pesar del tratamiento. En la actualidad se estima que hasta un 30% de estos pacientes con enfermedad localizada evolucionan mal (167).

El diagnóstico se realiza a partir de biopsias percutáneas con agujas cilíndricas gruesas, guiadas por técnicas de figura. Dicha metodología, resulta menos agresiva para el paciente y con ella se minimiza el riesgo de diseminación del tumor. No obstante, se reduce notablemente la cantidad de tumor primario no tratado disponible

para estudios genéticos y de inmunohistoquímica. Este problema se ha visto reducido con la introducción de los biobancos, así como de plataformas experimentales como los cultivos celulares y la experimentación animal. Ambos igualmente válidos para los estudios morfológicos, inmunohistoquímicos y genéticos. Aunque en el estudio de la progresión tumoral y la interacción del mismo con el ambiente, son preferibles los xenotransplantes, son un método de experimentación *in vivo*.

A pesar de que SE es una familia de neoplasias bien caracterizadas desde el punto de vista morfológico y molecular; sigue siendo todavía una incógnita, tanto su origen, como su desigual evolución en los diferentes pacientes. Es necesario por tanto, realizar un estudio de la heterogeneidad tanto morfológica como fenotípica, en el origen y en la evolución en el tiempo, con vistas a determinar cambios en la biología, genética y epigenética tumorales y poder realizar una medicina personalizada en cada paciente.

1.4.- Biología Molecular

Los TFSE forman parte del grupo de sarcomas que muestran una translocación recíproca, generando proteínas de fusión que actúan como factores de transcripción. En el 90% de los casos de TFSE (ver tabla 1), la translocación es entre los cromosomas 11 y 22, con fusión de los genes *EWSR1* y *FLI1* (8, 121, 168). Dicha fusión tiene potencial oncogénico e interviene en numerosos puntos del ciclo celular, alterando tanto la apoptosis como la proliferación y la transducción de señales (169-171). La supervivencia de las células no obstante, se ve influenciada por señales autocrinas y paracrinas

en las que intervienen numerosas moléculas y vías de señalización que repasaremos a continuación.

ALTERACIÓN CITOGENÉTICA	GEN DE FUSIÓN	INCIDENCIA	REFERENCIA
<i>t(11;22) (q24;q12)</i>	<i>EWSR1/FLI1</i>	90-95%	(172)
<i>t(21;22) (q22;q12)</i>	<i>EWSR1/ERG</i>	5-10%	(121)
<i>t(7;22) (p22;q12)</i>	<i>EWSR1/ETV1</i>	<1%	(10)
<i>t(17;22) (q21;q12)</i>	<i>EWSR1/ETV4</i>	<1%	(173)
<i>t(2;22) (q33;q12)</i>	<i>EWSR1/FEV</i>	<1%	(12)
<i>t(16;21) (p11;q22)</i>	<i>FUS/ERG</i>	<1%	(21)
<i>t(2;16) (q33;p11)</i>	<i>FUS/FEV</i>	<1%	(19)
<i>t(20;22) (q13;q12)</i>	<i>EWSR1/NFATc2</i>	<1%	(15)
<i>t(6;22) (p21;q12)</i>	<i>EWSR1/POU5F1</i>	<1%	(174)
<i>t(4;22) (q31;q12)</i>	<i>EWSR1/SMARCA5</i>	<1%	(14)
<i>t(1;22) (q36.1;q12)</i>	<i>EWSR1/PATZ1</i>	<1%	(13)
<i>t(2;22) (q31;q12)</i>	<i>EWSR1/SP3</i>	<1%	(16)
<i>t(15;19) (q14;p13.1)</i>	<i>BRD4/NUT</i>	<1%	(175)
<i>t(4;19) (q35;q13)</i>	<i>CIC/DUX4</i>	<1%	(176)

Tabla 1.- Traslocaciones y frecuencias en los TFSE

1.5.- Xenotrasplantes

Los modelos de injertos de tumores en animales proporcionan una plataforma experimental valiosa, especialmente en aquellos casos en que los cultivos no son suficientes (177). Permiten, evaluar la morfología tridimensional de una neoplasia poco frecuente, tal y como en los TFSE, su relación con el componente estromal (178), la angiogénesis (179), el potencial invasivo o la capacidad metastásica.

Además de permitir la caracterización de neoplasias mediante diversos procedimientos como histopatología, inmunohistoquímica (IHC) (180-182), microscopía electrónica (EM), citogenética (hibridación convencional y fluorescente *in situ* (FISH) (183, 184), la biología molecular y la expresión génica (185), no sólo de la neoplasia original, sino también de los pasajes posteriores del tumor debido a la buena preservación de la morfología a lo largo de las generaciones (179-181). Los ratones desnudos atímicos (nu/nu) se caracterizan por tener una mutación en el gen *FOXP1* que da lugar a la deficiencia de linfocitos T. No obstante, estos ratones sí tienen linfocitos B, células dendríticas y granulocitos y un aumento compensatorio de macrófagos y células asesinas (*natural killer*). Debido a su deficiente sistema inmune, estos ratones han sido ampliamente utilizados para crecer en ellos tumores derivados de pacientes (186). Existe en nuestro grupo una amplia experiencia en utilización de ratones *atímicos* en la investigación de sarcomas (178, 179, 181, 186-190).

1.6.- Micromatrices de tejidos

La tecnología de micromatrices de tejidos (TMA) permite la evaluación de histopatología e IHC en una gran cohorte de tumores en una sola laminilla, ahorrando costes, tiempo y fundamentalmente tejido. Por tanto, varios laboratorios utilizan TMA para investigar muestras de archivo en grandes series de tumores. Sólo se ha reportado un estudio de TMA en angiosarcomas originales sin xenoinjertos ((182)).

La combinación de modelos de xenoinjerto de AS, incluyendo generaciones sucesivas de pases de ratones en combinación con la tecnología TMA, no se ha informado hasta ahora. Este estudio describe por primera vez un nuevo modelo experimental de AS basado en la experiencia obtenida del estudio de 5 casos de xenoinjerto.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1.- Hipótesis de trabajo

La hipótesis de trabajo que se pretende demostrar es que existen diferencias fenotípicas en el sarcoma de Ewing que justifican una diferente evolución en el paciente.

2.2.- Objetivos

2.2.1.- Objetivo general

1. Caracterizar *in vivo*, una serie de TFSE tanto en su forma original, como a lo largo de los pases una vez xenotransplantados, para detectar posibles cambios en la expresión proteica de marcadores biológicos, que puedan justificar la heterogeneidad de comportamiento clínico y su evolución.

2.2.2.- Objetivos específicos

1. Caracterizar *in vivo* una serie de TFSE, tanto en su forma original como a lo largo de los pases una vez xenotransplantados, para detectar posibles cambios en su morfología.
2. Validar una plataforma experimental animal y estudiar la biología tumoral en ratones atímicos.
3. Estudiar la presencia de metástasis realizando el estudio autopsico de cada uno de los animales.

4. Estudiar los principales marcadores inmunohistoquímicos disponibles para el diagnóstico de los TFSE, así como su validez en los distintos subtipos histológicos y a lo largo de los países.
5. Estudiar la expresión de marcadores biológicos y vías de señalización de relevancia en el SE.
6. Evaluar las diferencias de expresión en tumores inicialmente localizados y metastásicos para detectar posibles diferencias fenotípicas que justifiquen una distinta agresividad clínica entre ambos.
7. Evaluar el cambio de expresión de los marcadores en los distintos países.
8. Detectar cambios en el fenotipo de un tumor con respecto a sus metástasis.
9. Validación *in silico* de marcadores diferencialmente expresados en distintas formas clínicas de SE o con variación a lo largo de los países.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Material

3.1.1.- Casos

Se han xenotrasplantado 70 casos de TFSE en el Departamento de Patológica de la Facultad de Medicina y Odontología, de la Universidad de Valencia, desde el año 1985 hasta junio del 2011. De ellos, se han incluido para la tesis aquellos casos que han tenido no sólo prendimiento (crecimiento inicial en el animal) (29 casos) sino seguimiento en el tiempo con al menos 1 pase (16 casos). Se utilizaron tanto los tumores originales, como los distintos pases obtenidos en la experiencia animal tras la inoculación de pequeños fragmentos de los tumores originales. Todos los casos fueron revisados previa inclusión en el estudio y confirmados por biología molecular. Se realizó tanto FISH para la búsqueda del reordenamiento del gen *EWSR1*, como RT-PCR para definir el gen de fusión obtenido; si era *EWSR1-FLI1* o uno diferente.

3.1.2.- Datos Clínicos de los pacientes

Los datos clínicos de los pacientes están resumidos en la tabla 2.

a.- Edad y sexo

Edad del paciente en el momento de la obtención de la muestra, con edades comprendidas entre 6 y 31 años. Así como el sexo del mismo, que aunque no modifica parámetros morfológicos sí nos orienta al análisis epidemiológico de la neoplasia; habiendo 10 hombres y 6 mujeres.

b.- Evolución inicial

En nuestra serie existen 3 casos inicialmente metastásicos, los asignados con los números 6, 7 y 16; siendo el resto inicialmente localizados.

c.- Tamaño tumoral y localización

Tal y como aparece en la tabla 2, los tamaños y localizaciones son muy variadas. Contamos con 9 tumores óseos; siendo el fémur la localización más frecuente (3 casos), la pelvis la segunda (2 casos) y radio, peroné, costillas y escápula con un caso cada uno. 6 de los tumores aparecieron en partes blandas y 1 desconocemos su origen porque no consta en el informe y fue remitido de otro centro. De las localizaciones en partes blandas, tenemos 1 subescapular, 1 pulmonar, 1 paravertebral, 1 ganglionar y 1 de retroperitoneo. Los tamaños son variables, entre 1 y 17cm.

3.1.3.- Método de obtención de la muestra

Es necesario conocer el momento de obtención de la muestra por si fue previa o posterior a tratamiento neoadyuvante, dato que podría haber interferido en la morfología, prendimiento en el ratón y biología en el xenotransplante. De todos ellos el material obtenido fue de la biopsia inicial diagnóstica, en algunos casos biopsia abierta incisional, biopsia excisional y en otros cilíndrica. Todas ellas sin tratamiento previo.

3.1.4.- Tratamiento

Ninguno de los TFSE llevaba tratamiento en el momento de obtención de la muestra, dado que se obtuvo en el momento de diagnóstico inicial.

El régimen de quimioterapia recibido es similar en todos los casos. No obstante, se han detectado modificaciones en las mismas, condicionadas por el estatus general del paciente que se refieren en la tabla 3.

Caso	Nude	Año	Diagnóstico	Edad	Sexo	Localización	Tamaño	T.U	Recaída
EWS									
1	15	1983	EWS convencional	21	M	Fémur drcho.	12x10x8cm	si	MTX cresta iliaca
2	78	1988	EWS convencional	14	H	Fémur drcho.	10x20cm	si	MTX pulmón, lumbar
3	94	1989	EWS convencional	9	H	Radio izquierdo	desconocido	si	desconocido
4	199	1995	EWS convencional	17	H	Escápula	8x9cm	si	MTX pulmón
									MTX hígado/óseas
5	230	1996	EWS convencional	11	M	Peroné drcho.	11x6x24cm	si	MTX pulmón
									MTX pulmón
6	248	1997	EWS convencional	12	M	Pulmón	múltiples nódulos	no	recidiva local+MTX
7	267	1998	EWS convencional	15	M	Paravertebral dorsal	1cm	no	MTX pulmón
PNET									
8	69	1987	PNET	20	M	Pubis	7cm	si	recidiva local pubis
									MTX pulmón
9	161	1993	PNET	11	M	Subescapular	4x4cm	si	MTX pulmón, meninges, parrilla costal, pelvis
10	205	1995	PNET		H	Desconocido		si	
EWS ATÍPICOS									
12	53	1987	EWS atípico	15	H	partes blandas		si	
13	83	1989	EWS atípico	13	H	Pelvis Izqda	desconocido	si	MTX órbita drcha
14	324	2000	EWS atípico	19	H	Parrilla costal izqda.	9x5x8cm	si	MTX pulmón
15	388	2002	EWS atípico	6	H	Ganglio	2x3x2cm	si	recidiva local
									MTX pulmón
16	459	2008	EWS atípico	31	H	Retroperitoneo	8x7x6cm	no	

Tabla 2.- Datos clínicos de los casos utilizados. Caso: número del caso. Nude: número asignado en la experiencia animal. Origen: O: original, M: metástasis, R: recidiva. Edad expresada en años, Sexo: H: hombre, M: mujer. Localización drcho.: derecho, izqdo.: izquierdo. TU: tumor único: sí o no (no1: ambos lados; no2: múltiples implantes retroperitoneales). Recaída: MTX metástasis. DCO: diagnóstico.

Caso	Método diagnóstico	TLE	Recaída	TTO	SG
1	exéresis marginal	31	MTX cresta iliaca	Qxincompleta+QT+RT	31
2	Biopsia incisional	0	MTX pulmón, lumbar	RT	Traslado a C.Navarra
3	exéresis marginal	NO	NO	NO	NO
4	Biopsia incisional	0 13	MTX pulmón MTX hígado/óseas	QT + RT IESS-II	31
5	exéresis marginal	8 7	MTX pulmón MTX pulmón	QX incompleta+QT+RT +transplante Qxmtx	18
6	exéresis completa	0	MTX pulmón	QX	1
7	Biopsia punción	15	recidiva local+MTX	Qxcompleta+QT+RT	24
8	exéresis marginal	5 17	recidiva local pubis MTX pulmón	Qxincompleta+QT+RT	17
9	exéresis marginal	6	MTX pulmón, meninges, parrilla costal, pelvis	Qxincompleta+QT+RT	15
10	NO	NO	NO	NO	NO
11	Amputación mmii izquierdo	NO	MTX pulmón	NO	NO
12	exéresis marginal	NO	NO	NO	NO
13	Biopsia cilíndrica	6	MTX órbita drcha	QT +RT	7
14	exéresis marginal	no	MTX pulmón	Qxincompleta+QT+RT	48
15	exéresis marginal	7 42	MTX pulmón recidiva local	Qxcompleta+QT+RT NO	36 NO
16	Biopsia cilíndrica	no	MTX pulmón	NO	NO

Tabla 3: Evolución clínica de los pacientes: MTX: metástasis, Qx: cirugía, QT: quimioterapia, RT: radioterapia, TLE: tiempo libre de enfermedad en meses, SG: supervivencia global en meses. NO: no disponemos de información.

3.2.- Métodos

3.2.1.- Xenotransplantes

Se utilizaron ratones atímicos, de sexo masculino, variedad Nude Suis, de 5 semanas de edad, distribuidos por la casa comercial Charles River, procedentes de IFFA-CREDO (Lyon, Francia).

Los ratones, una vez recibidos, fueron estabulados en condiciones especiales, libres de patógenos y sometidos a cuarentena de aproximadamente 2 semanas para que se acostumbraran a las condiciones del estabulario. Tanto las jaulas, la comida, la bebida, como el lecho; así como cualquier medio de enriquecimiento ambiental, fueron esterilizados en autoclave.

Las jaulas son transparentes para permitir una adecuada supervisión externa de los animales y alterarles lo menos posible, evitando una manipulación excesiva. Presentan rejilla superior, donde se deposita la comida y bebida para mejorar el movimiento de los ratones y evitar que se mezcle con los deshechos de los animales. Son almacenadas en armarios ventilados, con sistema de aireación continua, con puertas de cristal que les aíslan del medio externo. Las condiciones del animalario, junto a la supervisión diaria de las mismas, garantizan un adecuado nivel de bienestar y cumplen la normativa europea.

Varios fragmentos (3-5 fragmentos de entre 2 y 4mm de diámetro máximo) de TFSE originales, recibidos en fresco son depositados en un tubo de ensayo con medio de cultivo (RPMI 1640) con antibiótico hasta el momento de realizar el trasplante en los animales, sin exceder las 2h después de la cirugía.

En una campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, se procede a realizar la inoculación; introduciendo varios fragmentos tumorales, en la espalda de 2 animales, a nivel subcutáneo. Los animales

fueron anestesiados con éter inhalado y la incisión suturada con grapas y desinfectada con solución de povidona yodada y alcohol.

Los animales fueron introducidos en una caja e identificados con una etiqueta externa en la que consta el número de experiencia, el número de pase (si es el inicial se identifica como pase 0), la fecha de la inoculación y la cantidad de animales utilizados.

Los animales fueron supervisados diariamente, controlando su estado general, así como necesidades básicas y el estado de la experiencia. Es decir, si existe prendimiento tumoral o no y cómo es el crecimiento. Dicho control es realizado por 2 personas, una con formación A para manipulación de animales (JG), y otra con formación C en experimentación animal (EMA). Encargados respectivamente de las necesidades básicas y del bienestar animal y el estado del procedimiento.

Los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzan un tamaño aproximado de 1,5cm; siempre que ello no ponga en peligro la vida del animal. En ese momento, uno de los ratones, concretamente el que nombrábamos como 1, se sacrificó. Del tumor obtenido, se realizaron nuevos trasplantes a 2 nuevos animales; así como, extendidos citológicos, mediante improntas, cultivo celular, bloque de parafina para el estudio morfológico óptico, así como fijación en gluteraldehido para el estudio ultraestructural y congelación para estudios moleculares posteriores. Este proceso se ha repetido sucesivamente, hasta alcanzar la n calculada en la fórmula estadística. El ratón 2 se mantenía hasta confirmar que el pase siguiente realizado a partir del ratón 1 había prendido, siempre que ello no pusiera en riesgo el bienestar animal. De todos los animales se realizó autopsia para la búsqueda de patología relevante, de probable origen secundario neoplásico y metástasis.

La experiencia animal ha cumplido con los permisos de ética y experimentación animal de la Unión Europea, suscritos al proyecto

europeo EuroBoNeT (contrato nº018814) efectuado entre los años 2005 y 2011. Asimismo, el proyecto tiene aprobado el permiso de experimentación animal de la Universitat de València- EstudisGenerals y de la Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalidad Valenciana (anexo 1).

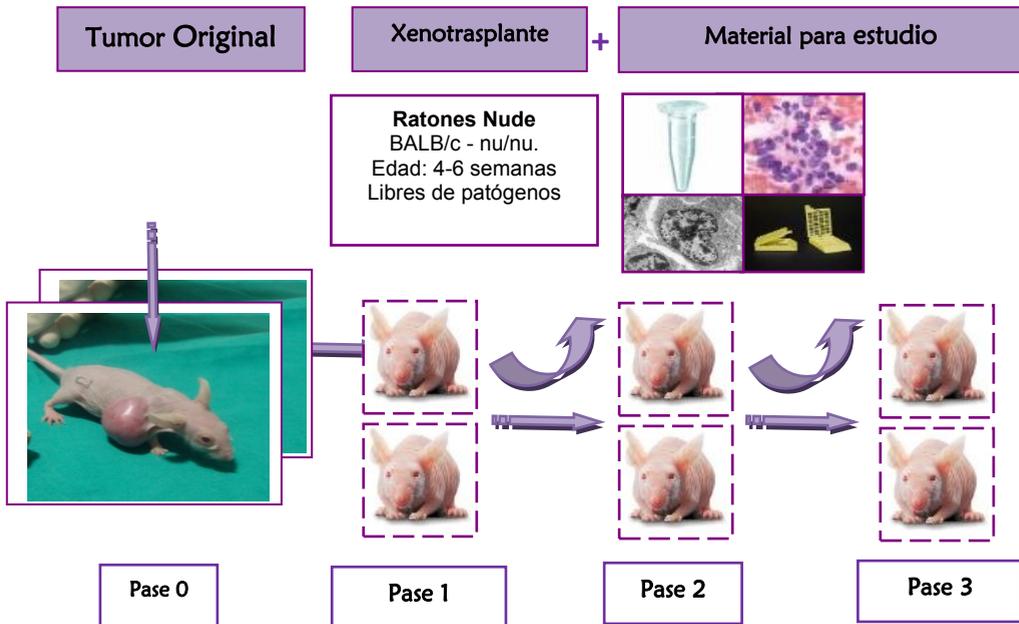


Figura 11.- Esquema de los xenotransplantes.

3.2.2.- Biología tumoral en los xenotransplantes

Para el estudio del crecimiento tumoral en los animales, se han recuperado los datos de tiempo de cada pase, teniendo en cuenta que se trasplantaban cuando los tumores xenotransplantados tenían un tamaño similar, próximo a 1,5cm. A partir del tiempo total dividido por el número de pases se ha calculado la velocidad de crecimiento. Se han considerado los tiempos del ratón 1 de cada pase, no obstante en las gráficas se incluirán

también los de su homólogo (ratón 2), no utilizado para el estudio morfológico.

3.2.3.- Microscopía óptica

Los casos fueron revisados por tres patólogos de forma independiente (ALLB, IMP, EMA) desde las secciones completas de Hematoxilina-eosina, Los casos se clasificaron según los criterios diagnósticos del libro de la OMS de 2013 de tumores de partes blandas y óseos; siendo revisados en un microscopio multicabezal de forma conjunta por los tres patólogos, para el consenso diagnóstico. Se agruparon en 3 grupos morfológicos según se ha descrito en la introducción:

- Ewing convencional
- Ewing atípico
- PNET

El diagnóstico de los casos originales fue confirmado por biología molecular; detectándose en todos ellos reordenamiento del gen *EWSR1* por FISH y el gen de fusión *EWSR1-FLI1*, mediante PCR. La técnica de Hematoxilina-eosina se realizó según el protocolo habitual en los laboratorios de Anatomía patológica.

3.2.4.- Micromatrices de tejido (TMA)

A partir de las secciones de hematoxilina-eosina del tumor completo se construyeron micromatrices de tejido con el equipo manual Beecher Instrument (Silver Springs, MD, USA), según se detalla a continuación y se ilustra en la figura 2:

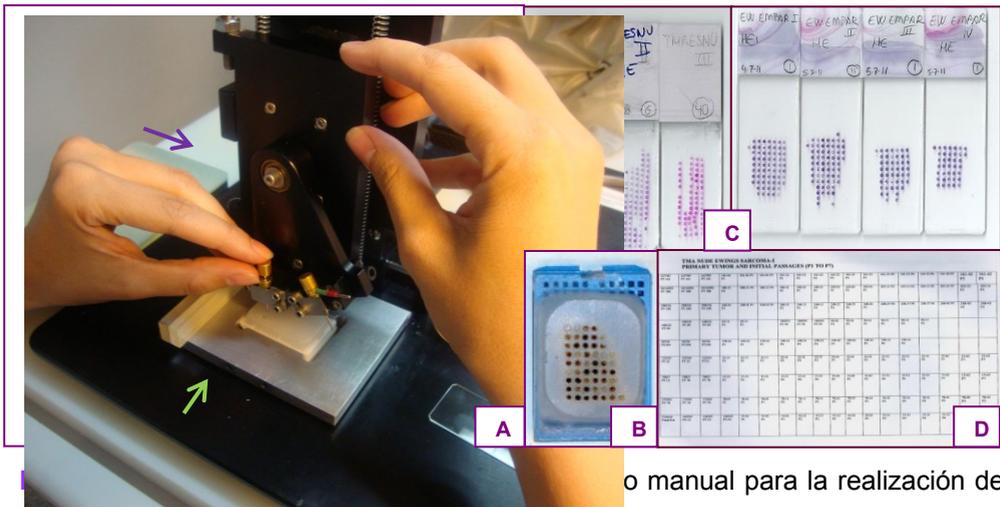
1.- se seleccionan las zonas más representativas del tumor sobre la laminilla de hematoxilina-eosina, con un marcador especial para cristal (Staedtler permanent F), evitando zonas de necrosis o no tumorales y que incluyan las áreas morfológicas distintas, si es que las hubiera.

2.- se realizan entre 2 y 5 cilindros de 1mm de diámetro (*cores* o cilindros), de las áreas seleccionadas en función de la heterogeneidad del tumor y se incluyen en un nuevo bloque de parafina. Todos los bloques incluyen al menos 2 cilindros de tejido normal (riñón e hígado fetales) para control interno de las técnicas que se realicen *a posteriori*.

3.- Al mismo tiempo se crea una planilla a modo de tabla que especifique la distribución de los cilindros en el nuevo bloque y permita la evaluación posterior con una distribución en filas y columnas (figura 2).

4.- una vez está completo el nuevo bloque, se deposita en una estufa a 37°C durante al menos 12 horas para asegurar la cohesión de los cilindros y la estabilidad del nuevo bloque.

5.- se realizan 30 secciones de 3 micras en cristales xialinizados para la realización de HE e inmunohistoquímica posterior.



o manual para la realización de micromatrices de tejido. La flecha verde señala la plataforma donde se fijan los bloques de parafina y la morada el soporte de las agujas perforadoras. B.- Bloque de parafina generado. C.- HE de los TMA. D.- un ejemplo de planilla donde se recogían los datos de las diferentes técnicas.

3.2.5.- Técnica inmunohistoquímica

Se obtuvieron secciones de 3 micras de grosor de cada matriz tisular, utilizándose portas de Dako (ref.K8020) para realizar las siguientes determinaciones de anticuerpos (tabla 2):

- marcadores diagnósticos de Ewing: CD99, Caveolina1, ezrina, FLI1, ERG y HNK1.
- marcadores de diferenciación epitelial: EMA, CKAE1-AE3, Ocludina, ZO1 y desmoplaquina.
- marcadores de proliferación y reguladores del ciclo celular: p53, BCL2, Ki67, p27 y FOXO1.
- marcadores de rutas biológicas y dianas terapéuticas potenciales: AKT, pAKT, PI3K, Hes1, IGF1R, CD17 (C-KIT), pmTOR, PARP1, ERBB4, SA2, YB1, BRAF, NF-κB, y caspasa8.

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica siguiendo el protocolo que se detalla a continuación que, aunque incluye partes comunes y habituales en los Servicios de Anatomía Patológica, existen pasos distintos y específicos para cada anticuerpo:

1. Desparafinación y 2. rehidratación

Según protocolo estándar en los Servicios de Anatomía Patológica.

3. Desenmascaramiento o recuperación antigénica

Los anticuerpos contra las proteínas CEA, Desmoplaquina I/II, SIRT1, P16 INK4a, P21^{WAF1/Cip1}, P53, FOXO, AKT 1/2, pAKT1/2/3 (Thr308)-R, BRAF, HES1, NF-κB, P65 ChIP GRADE, SA2, YB1, PARP1, PI3-KINASE p85α, HNK1, DC99 MIC2, FLI1, GALECTIN 1 se incubaron en tampón comercial de Dako a pH alto (*EnVision™ FLEX Target RetrievalSolution, High pH (50x) (DM828) código K8000*).

Los anticuerpos CKAE1-3, EMA, Ocludina, ZO-1, CD117 (cKIT), Ki67, ERBB4, IGF1Rα, Caveolina 1, EZRIN (3C12) se incubaron en tampón comercial de Dako pH bajo (*DakoEnVision™ FLEX Target*

RetrievalSolution, Low pH (50x) (código K8005)).

Por último el anticuerpo pMTOR se incubó en baño termostatzado a 99°C durante 40 minutos con tampón Tris-EDTA pH 9. El anticuerpo anti-Caspasa 8 no necesitó recuperación antigénica.

4. Bloqueo de peroxidasa endógena

Una vez realizada la descompresión del autoclave y enfiadas las preparaciones, se lavaron, con agua, agua destilada y por ultimo con TBS comercializado por Dako (*EnVision™ FLEX Wash Buffer 20x, DM831*). A continuación, se incubaron las preparaciones en solución de bloqueo deperoxidasa (*solución tamponada que contiene peróxido de hidrógeno y conservante; Ref. S2023Dako*).

No hemos bloqueado el colágeno para evitar la tinción de fondo inespecífica ya que según casa comercial Dako no es necesario. En el caso del anticuerpo contra HES-1, antes del bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó también el bloqueo de la BIOTINA endógena (*kit de Vector LaboratoriesSP-2001*).

5. Anticuerpo primario

Los Ac utilizados eran puros, por lo que se diluyeron según indica la tabla X (*EnVision™ FLEX AntibodyDiluentRef. K8006. Dako*).

6. Sistema de visualización

En el caso de los anticuerpos CEA, CYTOKERATIN, EMA, C-KIT, BCL2, ANTI-SIRT-1, KI67, P53 PROTEIN, ANTI-FOXO-1+, ANTI-B Raf, ANTI-CASPASE-8, ANTI-ERBB4, ANTI-NF-KB, SA-2, ANTI-YB-1, PARP-1, CD99, HNK-1, FLI-1 y EZRIN se realizó una incubación con ENVISION durante 30 minutos (*Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV) Ref. K5007*

Para los anticuerposP21^{WAF1/Cip1} se utilizó también ENVISION pero, añadiendo una incubación posterior al anticuerpo primario y anterior al polímero con LINKER MOUSE y LINKER RABBIT respectivamente

(DakoEnVision™ FLEX+ Mouse o EnVision™ FLEX+ Rabbit (códigos K8002 y K8009)).

Para los anticuerpos Desmoplaquina I/II, OCCLUDIN, ZO-1, AKT 1/2, P-AKT1/2/3 (THR308)-R, IGF-IR α , pm-TOR, PI3-KINASE p85 α , CAVEOLIN-1, y HES-1 se utilizó el sistema de visualización LSAB *(Dako LSAB+ System-HRP Código K0690)* Por último, el anticuerpo P16 INK4a se realizó con su kit.

- Visualización de la reacción

Para la visualización de la reacción se incubaron las preparaciones durante 5 minutos en DAB *(Dako REAL™ EnVision™ DetectionSystem, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Código K5007))*. Con ello conseguimos que los casos positivos se tiñan con una coloración marrón.

7. Tinción de contraste

Fue común en todos los casos y se utilizó Hematoxilina.

8. Deshidratación

Mediante pases en alcoholes de graduación creciente hasta etanol absoluto.

9. Aclarado

Se realizó en pases en Xilol.

10. Montaje

Se cubrieron las preparaciones con cubreobjetos y Entellan *(medio de inclusión para microscopía de MERCK)*.

ANTICUERPO	CLON	DILUCION	PRETRATAMIENTO	SISTEMA DE VISUALIZACION	CASA COMERCIAL	POSITIVIDAD
CD99 (MIC2)	MONOCLONAL MOUSE	1:50	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH ALTO DAKO (K8004)	ENVISION	DAKO	MEMBRANA
	1,20E+08			DAKO (K5007)	(M3601)	CITOPLASMA
HNK-1		SIN DILUIR	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH ALTO DAKO (K8004)	ENVISION	CELL LINE ATCC	CITOPLASMA
				DAKO (K5007)		
FLI-1 (H-60)	POLYCLONAL	1/100	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH ALTO DAKO (K8004)	ENVISION	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	NUCLEAR
	RABBIT			DAKO (K5007)	(SC-22808)	
CAVEOLIN-1 (N-20)	POLYCLONAL RABBIT	1/200	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH BAJO DAKO (K8005)	LSAB DAKO (K0690)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	CITOPLASMA
				DAB DAKO (K5007)	(SC-894)	
EZRIN (3C12)	MONOCLONAL MOUSE	1/350	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH BAJO DAKO (K8005)	ENVISION	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	MEMBRANA
				DAKO (K5007)	(SC-58758)	
GALECTIN-1	MONOCLONAL MOUSE	1/200	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH ALTO DAKO (K8004)	LSAB DAKO (K0690)	VECTOR LABORATORIES	NUCLEAR
	25C1			DAB DAKO (K5007)	(VP-G801)	
AKT 1/2 (N-19)	POLYCLONAL	1/200	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH ALTO DAKO (K8004)	LSAB DAKO (K0690)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	CITOPLASMA
	GOAT			DAB DAKO (K5007)	(SC-1619)	
pAKT1/2/3 (THR308)-R	POLYCLONAL	1/400	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH ALTO DAKO (K8004)	LSAB DAKO (K0690)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	NUCLEAR
	RABBIT			DAB DAKO (K5007)	(SC-16646-R)	
ANTI-BRAF	MONOCLONAL RABBIT	1/300	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH ALTO DAKO (K8004)	ENVISION	ABCAM	CITOPLASMA
	EP152Y			DAKO (K5007)	(Ab33899)	
ANTI-CASPASE-8	MONOCLONAL RABBIT	1/100	NINGUNO	ENVISION	ABCAM	NUCLEAR
	E6			DAKO (K5007)	(Ab-32125)	

ANTICUERPO	CLON	DILUCION	PRETRATAMIENTO	SISTEMA DE VISUALIZACION	CASA COMERCIAL	POSITIVIDAD
ANTI-ERbB4	MONOCLONAL MOUSE	1/50	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH BAJO DAKO (K8005)	ENVISION	ABCAM	MEMBRANA
	HFR-1			DAKO (K5007)	(Ab-19391)	
HES-1	POLYCLONAL	1/400	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH ALTO DAKO (K8004)	BLOQUEO AVIDINA/BIOTINA	AVIVA SYSTEMS BIOLOGY	NUCLEAR
	RABBIT			LSAB DAKO (K0690)	(ARP32372-T100)	
				DAB DAKO (K5007)		
IGF1-R α (H-78)	POLYCLONAL	1/20	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH BAJO DAKO (K8005)	LSAB DAKO (K0690)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	MEMBRANA
(IGF1-R)	RABBIT			DAB DAKO (K5007)	(SC-7952)	
pM-TOR (PHOSPHO S2448)	POLYCLONAL	1/200	BAÑO 99°C 40'	LSAB DAKO (K0690)	ABCAM	NUCLEAR
	RABBIT		TAMPON TRIS-EDTA PH 9	DAB DAKO (K5007)	(Ab-51044)	
ANTI-NF-KB P65 ANTIBODY-ChIP GRADE	POLYCLONAL	1/1000	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH ALTO DAKO (K8004)	ENVISION	ABCAM	NUCLEAR
	RABBIT			DAKO (K5007)	(Ab-7970)	
SA-2 (J-12)	MONOCLONAL MOUSE	1/50	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH ALTO DAKO (K8004)	ENVISION	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	NUCLEAR
	J12?			DAKO (K5007)	(SC-81852)	
ANTI-YB-1	MONOCLONAL RABBIT	1/100	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH ALTO DAKO (K8004)	ENVISION	ABCAM	NUCLEAR
	EP2708Y			DAKO (K5007)	(Ab-76149)	
PARP-1 (F2)	MONOCLONAL MOUSE	1/100	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH ALTO DAKO (K8004)	ENVISION	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	NUCLEAR
	F-2?			DAKO (K5007)	(SC-8007)	
PI3-KINASE p85 α (B9)	MONOCLONAL MOUSE	1/50	AUTOCLAVE 3' A 1.5 ATMOSFERAS TAMPON PH ALTO DAKO (K8004)	LSAB DAKO (K0690)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY	NUCLEAR
	B9?			DAB DAKO (K5007)	(SC-1637)	

Tabla 4.- Marcadores Inmunohistoquímicos utilizados en los TFSE: características comerciales y de utilización.

ANTICUERPO	CLON	DILUCION	CASA COMERCIAL	POSITIVIDAD
CEA	POLYCLONAL RABBIT	1/500	DAKO(A0115)	Citoplasma
CITOQUERATINA	MONOCLONAL MOUSE AE1/AE3	1/100	DAKO (M3515)	Citoplasma
DESMOPLAQUINA I/II (G-20)	POLYCLONAL GOAT	1/100	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY (SC-18082)	Citoplasma
EMA	MONOCLONAL MOUSE E29	1/200	(M0613)	Membrana
OCLUDINA	POLYCLONAL RABBIT	1/100	ZYMED/THERMOFIS HER SCIENTIFIC (71-1500)	Membrana Citoplasma
ZO-1	POLYCLONAL RABBIT	1/40	ZYMED/THERMOFIS HER SCIENTIFIC (61- 7300)	Citoplasma

Tabla 5.- Marcadores epiteliales: características comerciales y de utilización.

ANTICUERPO	CLON	DILUCION	CASA COMERCIAL	POSITIVIDAD
KI67 ANTIGEN	MONOCLONAL MOUSE	1/200	DAKO(M7240)	Nuclear
	MIB-1			
P16 INK4a	MONOCLONAL MOUSE	PREDILUIDO	CINTEC	Nuclear
P21 ^{WAF1/Cip1}	MONOCLONAL MOUSE	1/100	DAKO	Nuclear
	SX118		(M7202)	
PROTEINA P53 (DO-7)	MONOCLONAL MOUSE	1/100	LEICA MICROSYSTEMS	Nuclear
	DO7		(NCL-L-p53- DO7)	
ANTI-FOXO- 1+FOXO- 3+FOXO-4	POLYCLONAL	ene-50	ABCAM	Nuclear
	RABBIT		(Ab-58518)	

Tabla 6.- Marcadores de proliferación celular (en rosa) y reguladores del ciclo celular (en azul): características comerciales y de utilización.

3.2.6.- Valoración de la inmunohistoquímica

Se ha utilizado un método semicuantitativo combinando la valoración de intensidad y el porcentaje de células positivas. Siendo 0 aquellos casos sin expresión de la proteína, 1 los que se presentan una intensidad débil, visible sólo a grandes aumentos (40x), 2 intensidad moderada visible con dificultad a medianos aumentos (10x) y sin dificultad a 200 aumentos (20x) y 3, cuando la positividad ya se visualiza a pocos aumentos (4x).

El porcentaje de células positivas se ha considerado de la siguiente forma:

0. ninguna célula positiva
1. menos del 10% de células positivas
2. entre el 11 y el 50% de células positivas
3. más del 50% de células positivas.

Se ha considerado como válida la positividad nuclear citoplásmica, y de membrana, tal y como se especifica en el prospecto de cada anticuerpo (tabla 4). Siendo no valorables (NV) aquellos casos en los que se ha perdido el cilindro, el cilindro no incluye tumor o no existe control interno y/o externo del anticuerpo.

Los resultados han sido valorados independientemente por 3 patólogos (EMA, IMP y ALLB) asignando directamente valores entre 0 y 3 considerando ambos criterios intensidad y porcentaje de células positivas. Sólo en el caso de Ki67 se ha mantenido el porcentaje de expresión de los mismos, tal y como se establece en la práctica clínica diaria.

Los casos discordantes han sido revisados conjuntamente en un microscopio multicabezal, utilizándose la media de las tres valoraciones en caso de que no se llegara a un acuerdo.

3.2.7.- Biología molecular:

Se realizaron técnicas de Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) tanto en el diagnóstico como para la detección de la persistencia del reordenamiento de *EWSR1*, en fases iniciales, medio y tardíos. Se utilizó la sonda *break apart* de Vysis para la detección del gen *EWSR1* (22q12) marcado en verde.

3.2.8.- Estudio de expresión *in silico*:

Con objeto de validar nuestros resultados de expresión de biomarcadores en TFSE hemos empleado los datos disponibles *in silico* de una cohorte de SE cuyos datos pertenecen al estudio de Savola y se encuentran disponibles en R2: microarray analysis and visualization platform (<http://r2.amc.nl>). El estudio contiene datos de arrays de expresión (mARN) de Affymetrix (GeneChip Human Genome u133 plus 2) de 117 pacientes diagnosticados con SE y de los que en 88, hay también datos clínicos de seguimiento. La descripción de algunas de las variables clínicas están disponibles en https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi?option=datasetinfo&table=ps_avgpres_gse17679geo117_u133p2&species=hs.

3.2.9.- Tratamiento estadístico de los datos

Los datos fueron recogidos en tablas de Excel y el estudio estadístico de los datos se realizó mediante modelos de regresión logística mixtos (efecto aleatorio para el caso) mediante el software estadístico R (versión 3.3.1) y el paquete ordinal (versión 2015.6-28) comparando aquellos casos clínicamente localizados con los metastásicos de inicio. Así como un tumor original con su metástasis (casos 5 y 6, respectivamente). A la vez que su evolución a lo largo de los pases. Para aquellos marcadores diagnósticos o de interés en el diagnóstico diferencial con

otros tumores, se comparó la expresión en los distintos subgrupos morfológicos. Estos modelos se han utilizado para comparar el grado de expresión entre los grupos teniendo en cuenta la evolución en el tiempo de los pases. Es decir, teniendo en cuenta el diferente número de pases, se ha decidido aplicar la transformación logarítmica de la variable “pase” para que no sea un cambio debido al distinto número de pases, sino a una característica real. Se ha considerado significativo un p-valor inferior al nivel de significación 0.05.

4.- RESULTADOS

4.1.- Caracterización *in vivo* una serie de TFSE, tanto en su forma original como a lo largo de los pases una vez xenotransplantados, para detectar posibles cambios en la morfología.

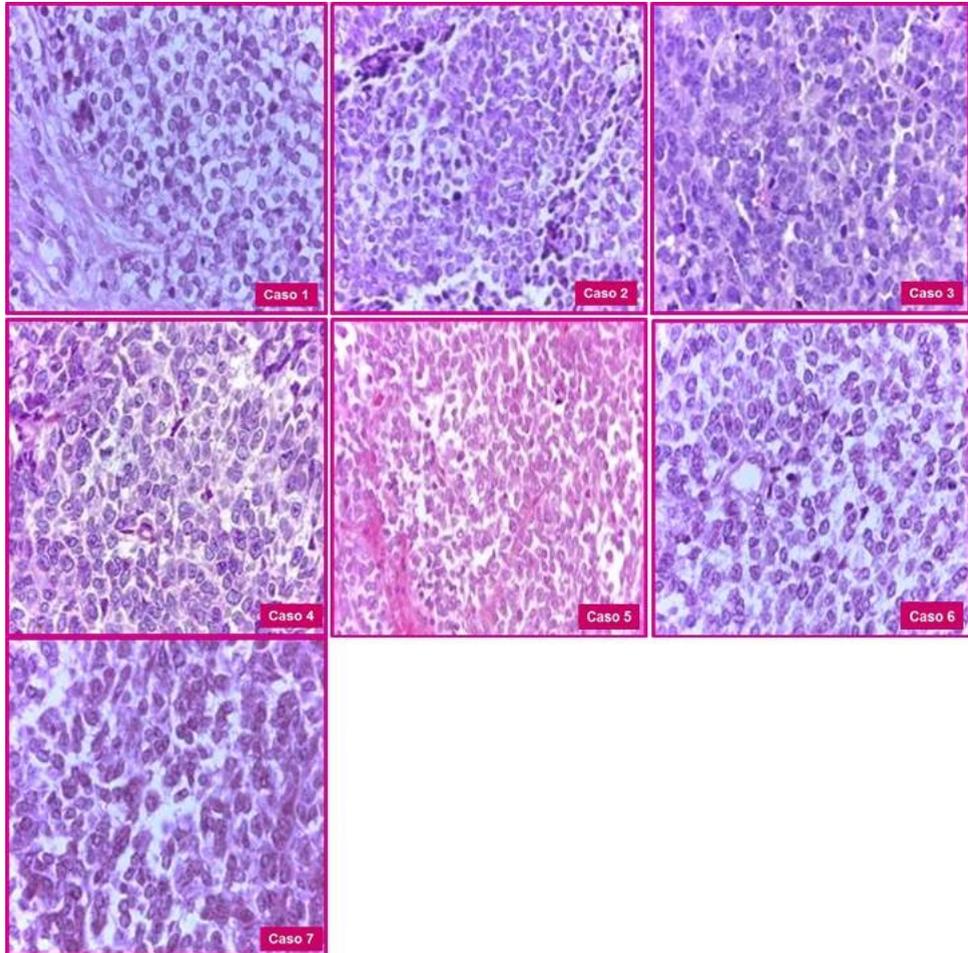


Figura 13.- Morfología de los casos. Ewing convencionales. HE a 200 aumentos de los casos originales incluidos en la tesis.

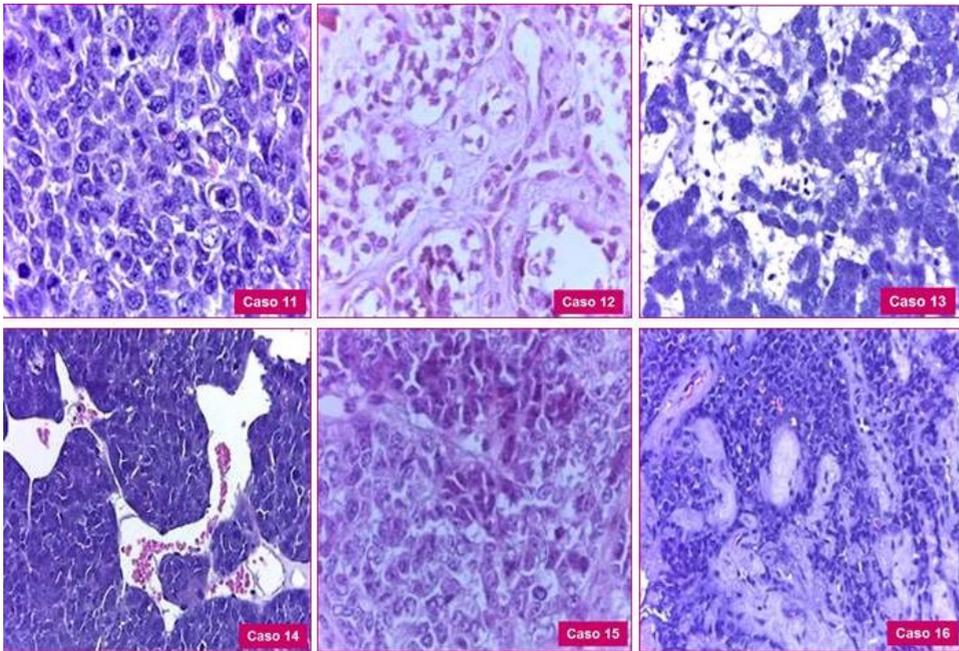
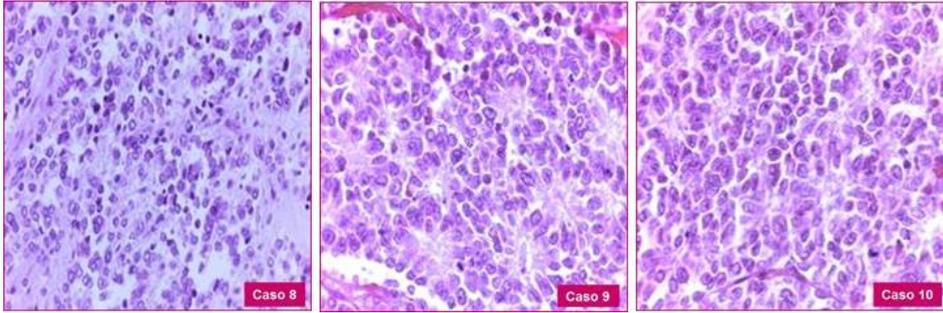


Figura 14.- Morfología de los casos. PNET (casos 8-10). HE a 200 aumentos. Las rosetas del caso 8 fueron más evidentes a lo largo de los ejes. **Ewing atípicos (11-16).** HE a 200 aumentos de los casos. Los casos 14 y 15 presentaron células más grandes, mientras que el caso 16 mostró abundante desmoplasia en el estroma.

4.2.- Validación de una plataforma experimental animal y estudio de la biología tumoral en ratones atímicos.

Se obtuvieron 16 casos que hubieran mostrado prendimiento y al menos un pase en los xenotransplantes.

Caso	Diagnóstico	Nº Nude	Nº Pases
1	Ewing clásico	15	15
2	Ewing clásico	78	6
3	Ewing clásico	94	1
4	Ewing clásico	199	41
5	Ewing clásico	230	20
6	Ewing clásico	248	40
7	Ewing clásico	267	8
8	PNET	69	1
9	PNET	162	4
10	PNET	205	2
11	Ewing atípico	22	22
12	Ewing atípico	53	44
13	Ewing atípico	83	1
14	Ewing atípico	324	5
15	Ewing atípico	388	13
16	Ewing atípico	459	16

Tabla 7.- Casos con la equivalencia morfológica, el número de xenotransplante (Nº Nude) dentro de una experiencia mayor de nuestro grupo, que incluye todos los sarcomas xenotrasplantados y los pases conseguidos en la experiencia (Nº de pases).

En la tabla 6 se muestra el crecimiento de los tumores en los xenotrasplantes; indicándose los tiempos 0, medio, final y total. El tiempo 0 o tiempo de prendimiento, es el tiempo transcurrido desde que el tumor se inocula hasta que está listo para ser transferido por primera vez. El tiempo medio de cada una de las experiencias es el tiempo transcurrido entre cada pase dividido por el número de pases y el tiempo final o tiempo del último pase, es el último pase, cuando la experiencia llega a su fin. El tiempo total de toda la experiencia y el número de pases, del que se calcula la velocidad de crecimiento. El tiempo medio entre los subtipos es similar, siendo de 108 días en los SE clásicos, 156 en los atípicos y 117 en los PNET, si se consideran tanto el pase inicial, como el final, que como veremos a continuación son más lentos. En cuanto al número de pases, los PNET fueron los que menos pases alcanzaron con una media de 4 y los que más los SE clásicos, con 19.

En el gráfico 1 se observa la biología tumoral de un caso representativo para cada subtipo morfológico. En cada caso se muestra el momento del trasplante de cada pase, de ambos ratones, el ratón 1 que se utiliza para los pases y del que se ha realizado toda la experiencia e incluido en los TMA y su pareja (ratón 2), dado que siempre se realizaba el trasplante en dos por seguridad para que al menos uno prendiera. En todos los casos hubo prendimiento y crecimiento; siendo la gráfica similar. De forma visual observamos cómo el primer pase es el que más tarda, hasta que se consigue una velocidad de crecimiento similar para un mismo volumen tumoral y el tiempo entre pases se iguala, llegando a ser prácticamente una línea horizontal. El último pase se produce cuando el tiempo ya no sigue ese patrón estable, sino que se incrementa, siendo la velocidad más lenta y anunciando que se trata del último pase. Existen casos en que el último pase se ha detenido porque al no existir crecimiento

el ratón se ha sacrificado; dicha circunstancia se ha indicado con una señal de discontinuidad.

Diagnóstico	Nude	tiempo 0	suma tiempo	nº pases	tiempo medio	tiempo final
1	15	258	2134	16	133,38	159
2	78	46	568	6	94,67	263
3	199	116	3154	42	75,09	168
4	230	85	1385	21	65,95	297
5	248	93	2331	41	56,85	158
6	267	78	808	8	101	253
7	94	176	465	2	232,5	126
11	22	68	1762	24	73,42	14
12	53	261	3807	45	84,6	81
13	324	78	1013	7	144,71	166
14	388	159	2318	14	165,57	264
15	459	202	1583	14	113,07	92
16	83	333	713	2	356,5	168
8	69	127	321	2	160,5	124
9	161	84	329	6	54,83	38
10	205	162	554	4	138,5	81

Tabla 8.- Biología tumoral en los xenotransplantes. Tiempo 0: tiempo transcurrido en el primer pase (tiempo de prendimiento) Suma tiempo: tiempo total, desde la primera inoculación, hasta el fin de la experiencia. Tiempo medio: tiempo total dividido por el número de pases. Tiempo final: tiempo transcurrido en el último pase. El tiempo está referido en días.

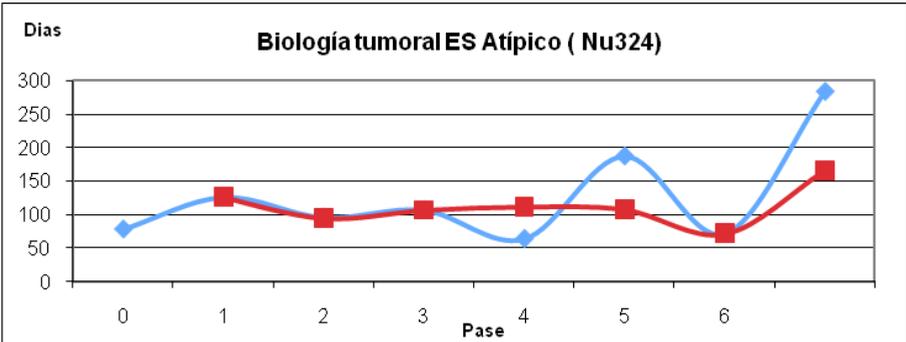
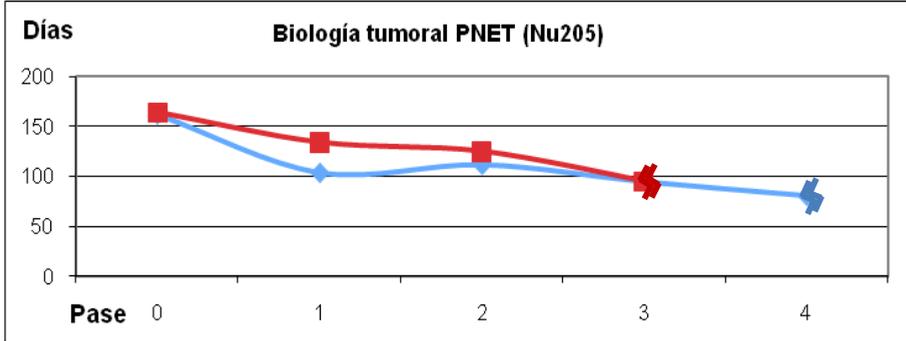
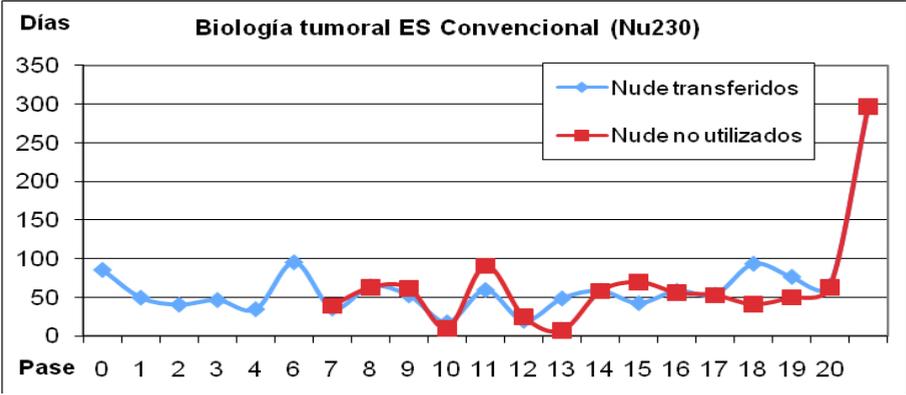
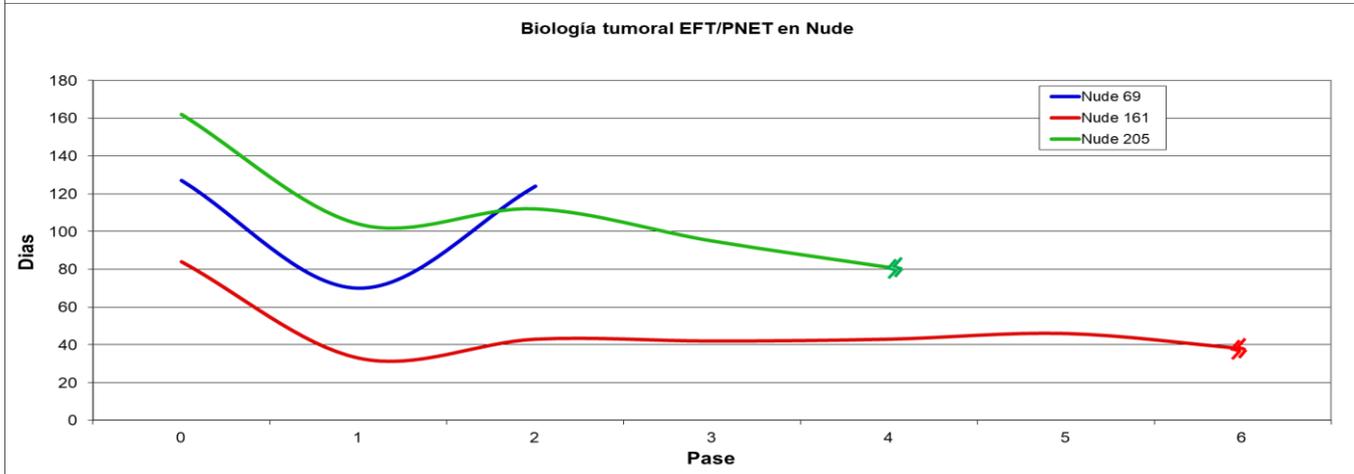
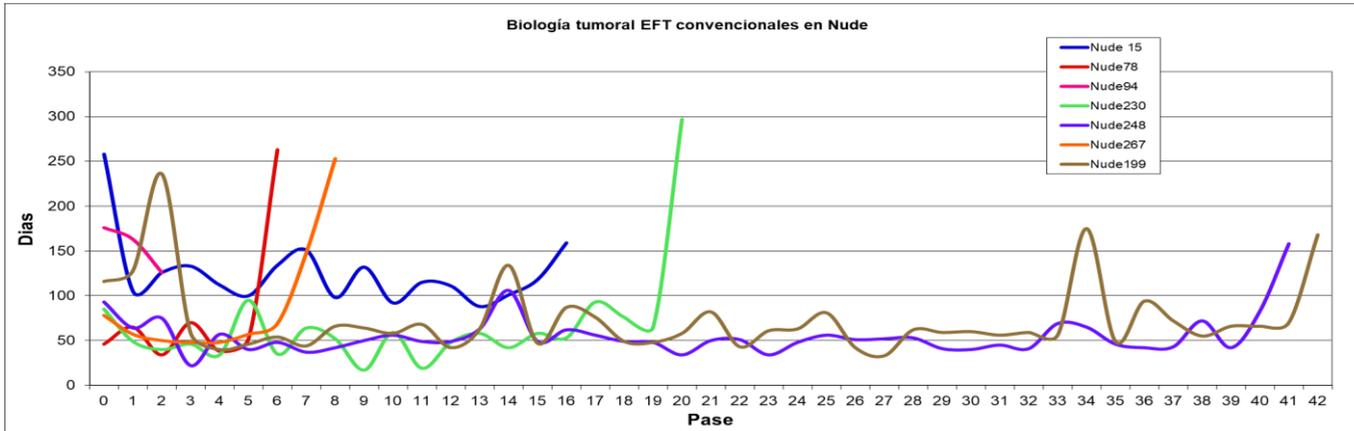


Gráfico 1.- Ejemplos representativos de biología tumoral en los xenotransplantes para cada subtipo morfológico. Se representan cada uno de los pases tanto del ratón utilizado para la experiencia (en azul), y un segundo ratón de seguridad (en rojo). El tiempo en días entre pases y el símbolo de discontinuidad al final de la gráfica a discontinuidad, es decir que el ratón se ha sacrificado por falta de crecimiento.



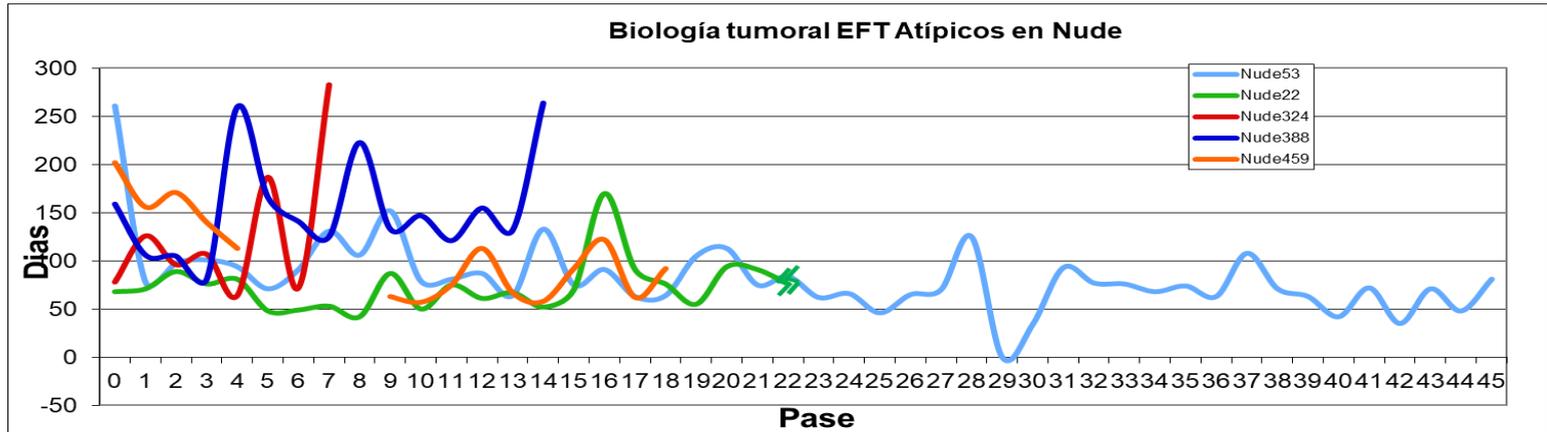


Gráfico 2.- Biología tumoral en los xenotransplantes por subtipos morfológicos. Se incluyen todos los casos y se observa una biología similar con un primer y último pases más duraderos. Alguno de los casos presenta una señal de interrupción en el último pase porque los ratones se sacrificaron tras 2 meses aproximadamente por falta de prendimiento, por motivos éticos. Existe un espacio en la gráfica del Nude 459 (en naranja) dado que falta información del tiempo entre pases.

4.3.- Estudio de la presencia de metástasis realizando el estudio autopsico de cada uno de los animales.

En cada pase, cuando el xenoinjerto alcanzaba el volumen máximo del criterio de punto final, el ratón se sacrificó y se analizaron tanto macroscópica como histológicamente todos los órganos sólidos (corazón, pulmones, riñones, cerebro y bazo) para detectar la presencia de metástasis. No se examinaron los huesos histológicamente, dado que macroscópicamente no presentaron alteraciones. Así mismo, se estudió el segundo ratón de cada pase. Se evaluaron un total de 338 ratones y en ninguno de ellos se detectaron metástasis en los órganos analizados. Estos resultados sugieren que el modelo de transplante subcutáneo que hemos empleado no es el idóneo para inducir metástasis.

4.4.- Estudio de los principales marcadores inmunohistoquímicos disponibles para el diagnóstico de los TFSE en los distintos subtipos histológicos y a lo largo de los pases.

En la tabla 9 se muestran los porcentajes de cilindros positivos para los marcadores diagnósticos habituales de los TFSE. La positividad para CD99 es elevada entre los casos; de hecho, 13 de los 16 presentan más del 30% de los cores con expresión elevada, con una expresión media del 95%. La valoración de la expresión de CD99, se muestra en la figura 15, siendo considerada como positiva la que combina membrana y citoplasma, generalmente con la membrana bien remarcada en la mayor parte de ellos. No obstante, hay 3 casos con expresión variable al CD99, el caso 7, 10 y el 14, cada uno con una morfología distinta, en los que se ha observado porcentajes de expresión bajos y con tinción citoplásmica en porcentaje variable.

Caso	CD99	HNK1	CAV1	FLI1	ERG	Ezrina
Ewing Convencional						
1	97%	90,3%	93%	77,4%	0%	0%
2	100%	90,9%	100%	69,2%	0%	40%
3	100%	88,9%	100%	77,8%	0%	22%
4	84%	76,1%	97%	73,5%	0%	6%
5	96%	80,8%	100%	73,1%	0%	7%
6	86%	75,0%	94%	67,6%	0%	3%
7	6%	36,8%	100%	31,6%	0%	0%
PNET						
8	100%	100,0%	100%	66,7%	0%	0%
9	100%	83,3%	100%	50,0%	0%	0%
10	29%	33,3%	100%	33,3%	0%	0%
Ewing Atípico						
11	95%	85,4%	83%	65,1%	0%	7%
12	91%	76,7%	59%	65,9%	0%	4%
13	100%	85,7%	100%	42,9%	0%	0%
14	8%	0,0%	0%	0,0%	0%	0%
15	92%	69,2%	100%	80,8%	0%	13%
16	100%	78,6%	100%	81,0%	0%	50%

Tabla 9.- Marcadores diagnósticos: un formato condicional con el porcentaje de cores que presenta al menos positividad en más del 10% de sus células (positividad 2). En blanco los negativos, en azul claro hasta el 25% de cores positivos y en creciente intensidad de azules hasta el 100% de expresión.

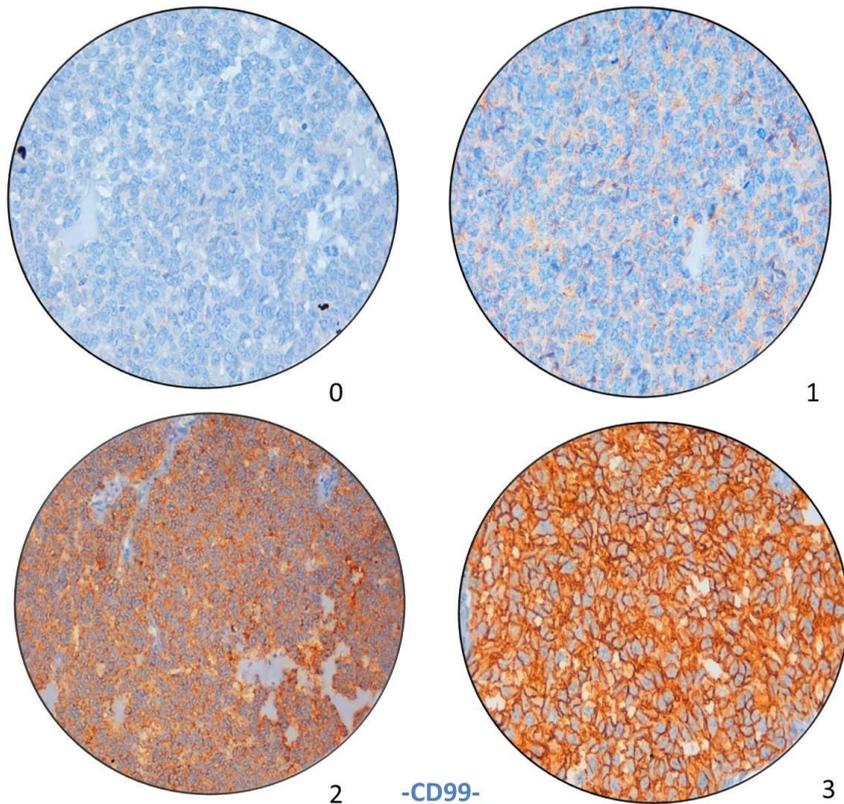


Figura 15.- Valoración de los Marcadores diagnósticos: en 4 grados según porcentaje e intensidad de expresión. Grado 0: 0% de expresión, Grado 1 <10% de expresión, Grado 2 10-50%, Grado 3 >50%

El 87% de los casos, tal y como se observa en la tabla, fueron positivos para FLI1, siendo no obstante su positividad heterogénea y parcheada; con positividades que oscilaban entre el 60 y 80% del tumor en la mayoría de los casos. No obstante los casos 7, 10 y 13 muestran expresión inferior al 50%, siendo del 30, 33 y 42% respectivamente y el caso 14 fue negativo. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los subtipos.

La expresión de HNK-1 es equiparable a la de FLI1; siendo elevada aunque heterogénea dentro del tumor y con los mismos casos que presentan positividad baja; como son los casos 7 y 10 y el 14 totalmente negativo. En la figura 16 se muestran ejemplos de gradación de la expresión.

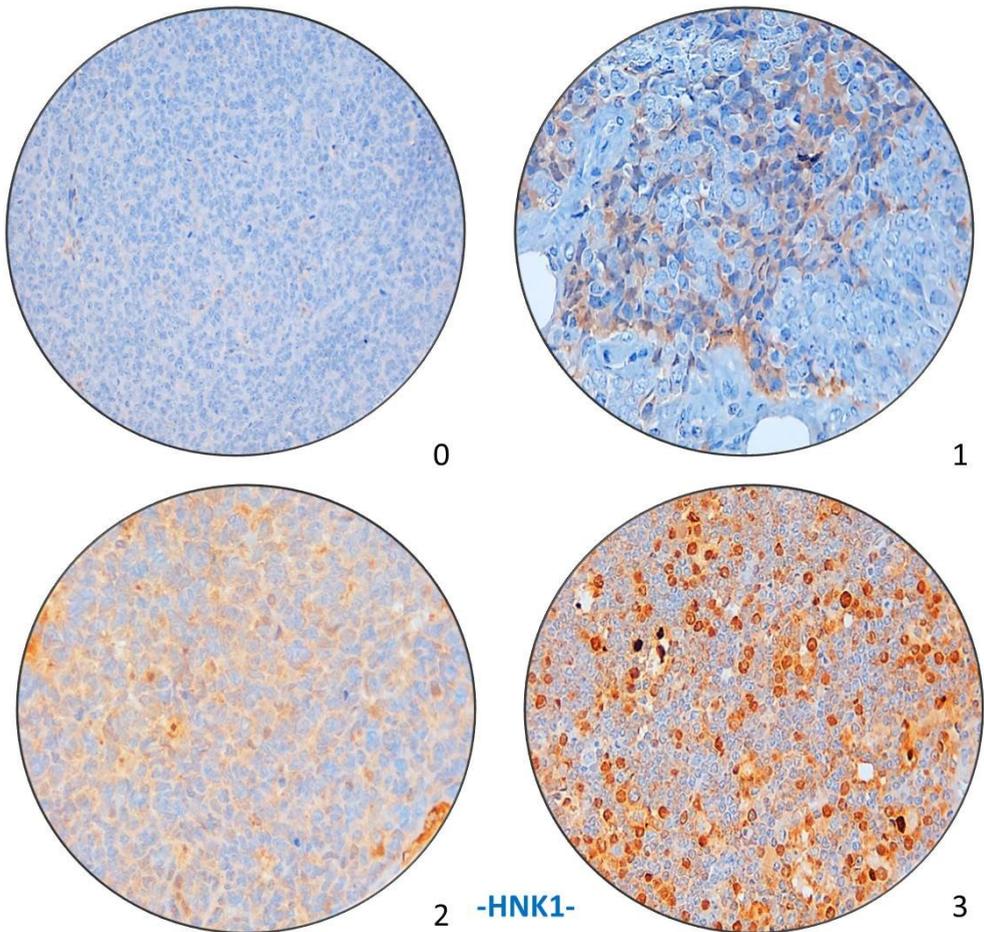


Figura 16.- Expresión de HNK1: 4 grados según porcentaje e intensidad de expresión. Grado 0: 0% de expresión, Grado 1 <10% de expresión, Grado 2 10-50%, Grado 3 >50%.

Todos los casos a excepción de 1 (caso 14) presentan positividad elevada a la caveolina (superior al 60%; siendo la mayoría superior al 80%), sin existir diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos morfológicos, ni variaciones a lo largo de los pases. En la figura 17 se ejemplifica la gradación del anticuerpo.

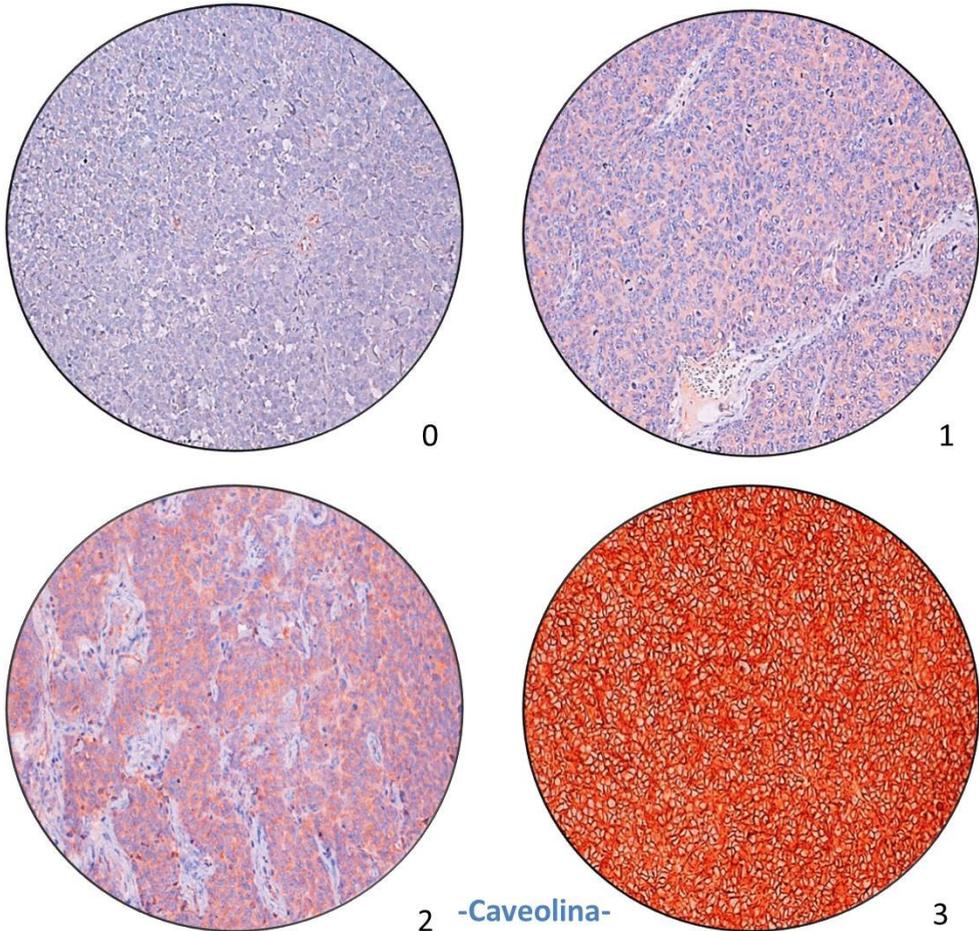


Figura 17.- Expresión de Caveolina: expresión de membrana, separando 4 grados según porcentaje e intensidad de expresión. Grado 0: 0% de expresión, Grado 1 <10% de expresión, Grado 2 10-50% o >50% débil, Grado 3 >50% intenso.

Nuestros casos presentan una positividad baja a la ezrina, con la excepción de los casos 2 y 16 que presentaron positividad del 40 y 50%, respectivamente (figura 18). El 45% de los casos han resultado completamente negativos y el 40% con positividad en menos del 10% de las células.

Ninguno de nuestros casos ha presentado positividad para ERG.

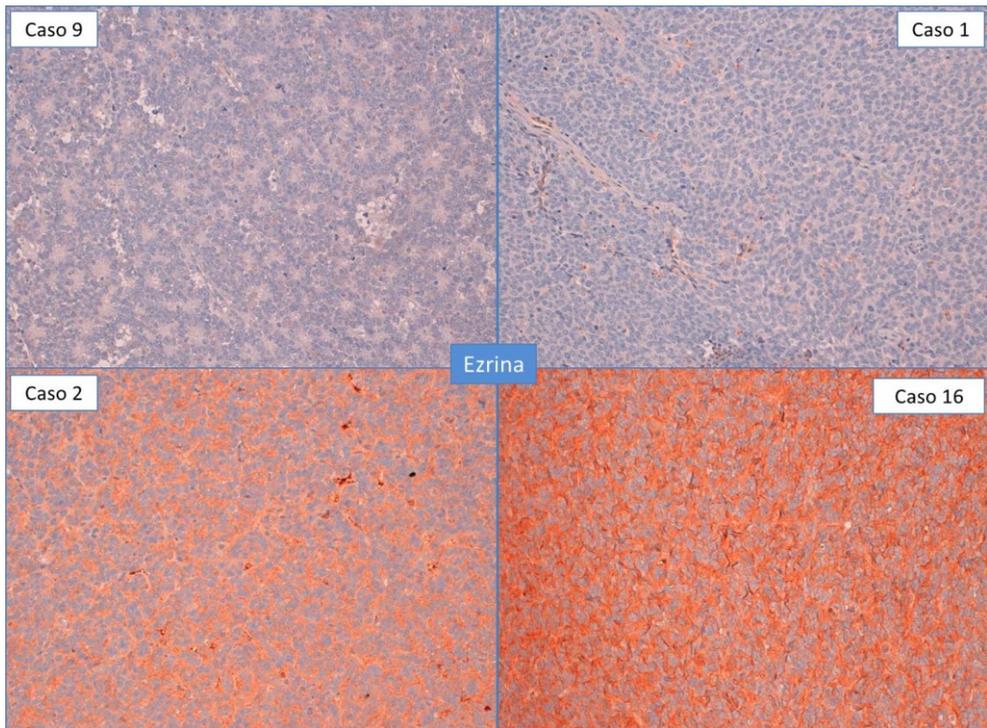


Figura 18.- Expresión de Ezrina en distintos casos de SE: caso 9 es un PNET con 0% de expresión, el caso 1 es un SE convencional con 0% de expresión. Los casos 2 y 16 son los que más ezrina expresan, con positividad intensa y difusa en el 40 y 50% de los cores respectivamente.

Marcadores epiteliales

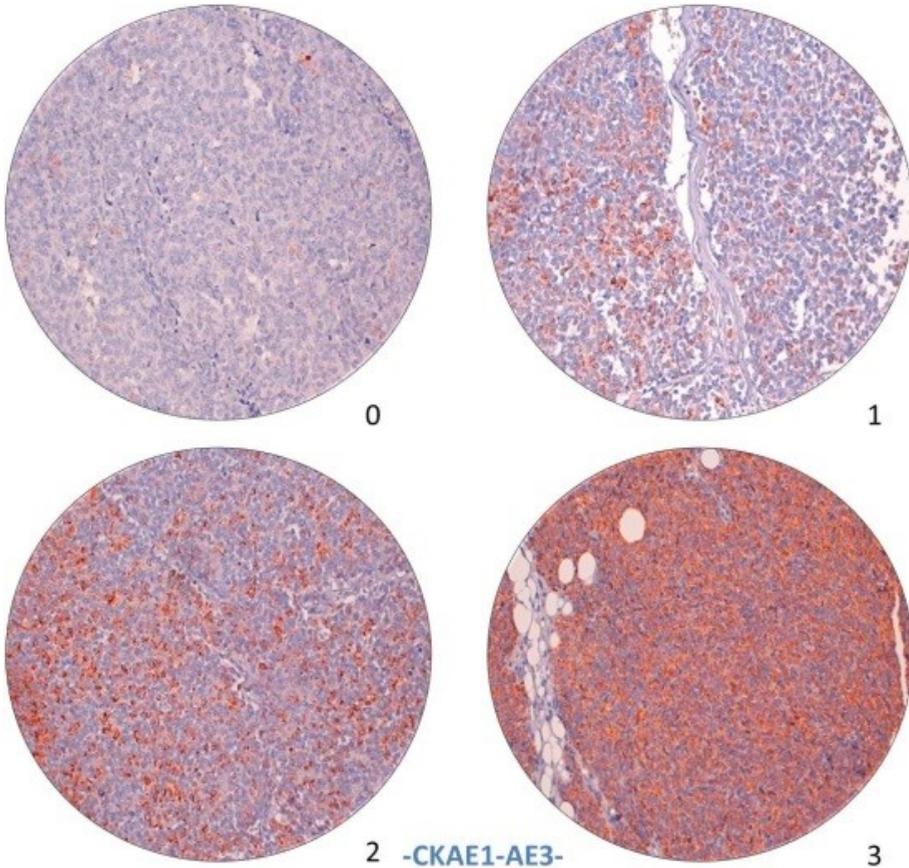
El 23% de casos de Ewing presentó positividad para al menos un marcador epitelial, siendo con mayor frecuencia la citoqueratina de amplio

espectro (CkAE1-AE3). En la tabla 10 se observa cada uno de los marcadores epiteliales con el porcentaje de expresión en todos los cores para cada uno de los casos.

Caso	EMA	CK	ZO1	Ocludina	Desmoplakina
Ewing Convencional					
1	13%	0%	0%	0%	0%
2	8%	85%	0%	0%	0%
3	0%	0%	0%	0%	0%
4	5%	0%	0%	0%	0%
5	0%	0%	0%	0%	0%
6	11%	0%	0%	0%	0%
7	0%	11%	0%	0%	0%
PNET					
8	0%	0%	0%	0%	0%
9	0%	0%	0%	0%	0%
10	22%	0%	0%	0%	0%
Ewing Atípico					
11	72%	82%	0%	0%	0%
12	15%	0%	0%	0%	0%
13	0%	60%	0%	0%	0%
14	0%	0%	0%	0%	0%
15	25%	100%	0%	0%	0%
16	0%	38%	0%	0%	0%

Tabla 10.- Marcadores epiteliales y de transición epitelio-mesénquima: un formato condicional con el porcentaje de cores que presenta positividad en más del 10% de sus células (positividad 2 y 3). En blanco los negativos, en azul claro hasta el 25% de cores positivos y en creciente intensidad de azules hasta el 100% de expresión.

Ningún caso mostró expresión de ZO1, ocludina, ni desmoplaquina y la expresión de los marcadores epiteliales se mantuvo durante los pases. Es decir no existe mayor o menor expresión entre pases, la expresión se mantiene durante la experiencia. En cambio sí existen diferencias significativas en la expresión de CK y EMA entre los subtipos; siendo los Ewing atípicos los que con mayor porcentaje lo expresan y los PNET los que menos. La expresión es aislada y focal, pudiendo observarse intensa y difusa en algún caso. En la figura 18 se ejemplifican las expresiones tanto de CKAE1-3, como de EMA.



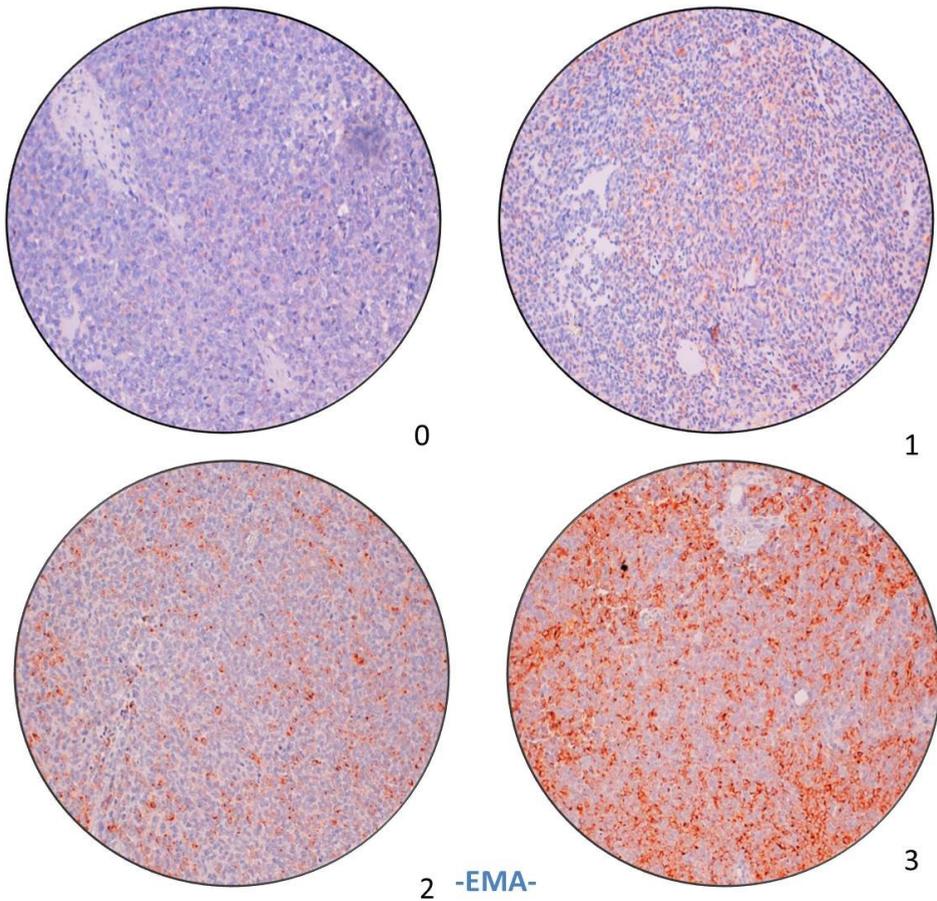


Figura 18.- Resultados de CkAE1-AE3 y EMA: las imágenes están hechas a 200 aumentos y muestran los 4 resultados posibles. : 0: Ausencia de expresión, 1: <10% de células lo expresan, 2: hasta el 50% de células lo expresan con variable intensidad, 3: >50% de células lo expresan con variable intensidad.

4.5.- Estudio de la expresión de marcadores biológicos en nuestra serie.

Marcadores de apoptosis

En la tabla 11 se describe el porcentaje (%) de cores que muestran positividad para los marcadores BCL2 y caspasa 8. Considerando como

positivo al menos un 10% de células positivas, con positividad citoplásmica para BCL2 y nuclear para caspasa 8 (figura 19).

Existe expresión de BCL2 en hasta el 30% de los SE. Fundamentalmente se observa en aquellos casos en los que la morfología es atípica, existiendo diferencias estadísticamente significativas de los atípicos con respecto al resto de grupos. No es significativa entre los PNET y los convencionales porque aunque tenga menor expresión, es posible observar expresión en algún caso de ambos grupos.

Caso	BCL2	CASPASA 8	p53
Ewing Convencional			
1	37%	0%	4,2%
2	0%	0%	0%
3	0%	0%	0%
4	3%	0%	0%
5	0%	15%	0%
6	11%	5%	4,8%
7	7%	35%	15%
PNET			
8	33%	0%	50%
9	0%	0%	0%
10	56%	0%	0%
Ewing Atípico			
11	100%	15%	0%
12	66%	0%	0%
13	0%	0%	0%
14	9%	0%	0%
15	75%	0%	0%
16	95%	0%	0%

Tabla 11.- Marcadores de apoptosis: un formato condicional con el porcentaje de cores que presenta positividad en más del 10% de sus células (positividad 2 y 3).

La expresión de caspasa 8 ha sido baja en todos los casos. Sólo 4 casos presentan expresión entre el 5 y el 35% de los cilindros de la matriz de tejido; siendo los de morfología convencional los que presentan un porcentaje de expresión mayor, sin ser los resultados estadísticamente significativos. Ningún caso de PNET ha presentado expresión de caspasa 8. Tampoco se han observado diferencias estadísticamente significativas entre los casos de debut clínico distinto, como veremos más adelante en la sección de resultados comparados.

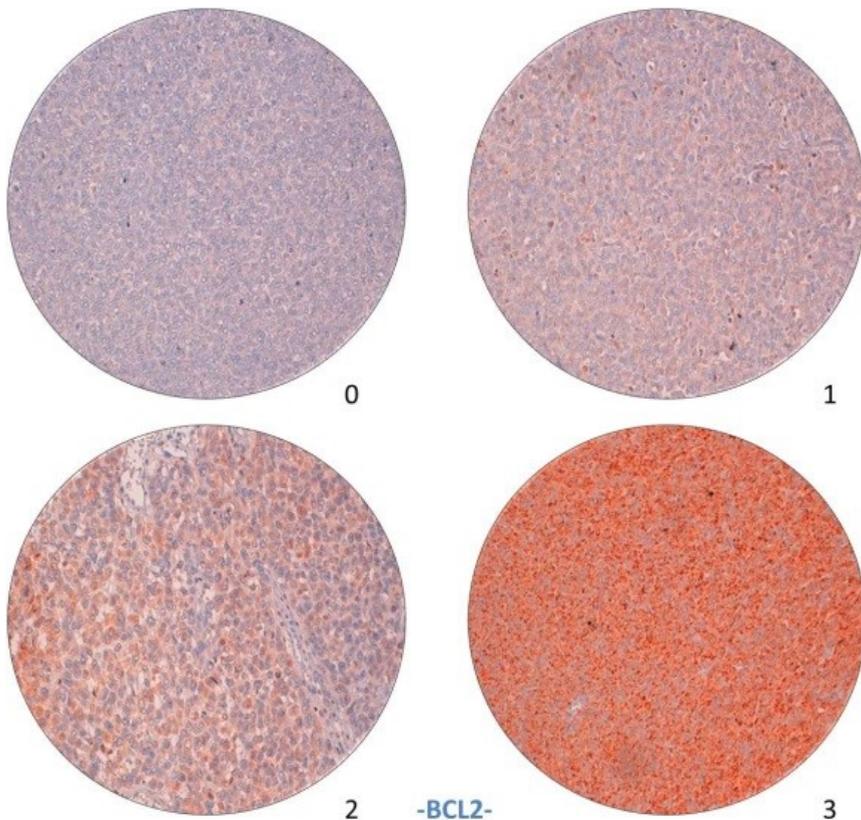


Figura 19.- Resultados de BCL2: las imágenes están hechas a 200x aumentos y muestran los 4 resultados posibles: 0: ausencia de expresión, 1: <10% de células lo expresan, 2: hasta el 75% de células lo expresan con variable intensidad, 3: >75% de células lo expresan con variable intensidad.

La expresión de p53 ha sido baja, sin expresión o siendo ésta menor al 10% en el 87,5% de los casos. A excepción de 2 casos (el 12,5% del total), el caso 7 en que la expresión fue de más del 15% e intensa y el 8, con una expresión del 50%. Destaca el aumento de expresión de p53 a lo largo de los pases, como veremos más adelante.

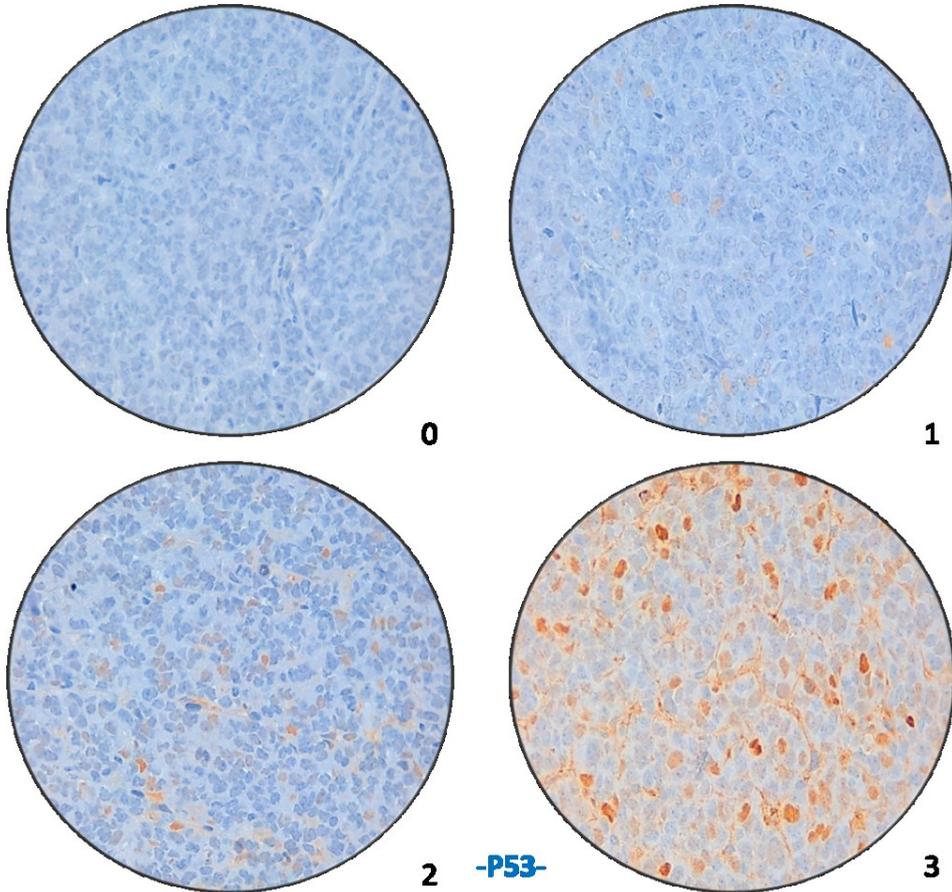


Figura 20.- Expresión nuclear de p53. 0 y 1 muestran o ninguna o menos del 10% de células positivas, 2 entre el 10 y el 50% y 3, más del 50%.

La tabla 12 describe el porcentaje de expresión de los marcadores biológicos estudiados en cada uno de los casos.

PARP1

La mayoría de nuestros casos muestran expresión nuclear de PARP1, de forma difusa e intensidad elevada, siendo significativamente menor su expresión en los casos de PNET, tal y como muestra la tabla 12; sin diferencias estadísticas entre los convencionales y los atípicos. Existen sólo dos casos completamente negativos, 2 PNET, tanto en los originales como en los pases. No obstante, la expresión de PARP1 aumenta con los pases tal y como se observa en las tablas de correlación de Pearson y es significativamente mayor en los casos inicialmente metastásicos que en los localizados tal y como se analizará en el apartado correspondiente a los resultados comparados.

En la figura 21 se observan los cores correspondientes al caso 16, un SE clásico con expresión grado 3, prácticamente en el 100% de las células.



Figura 21.- Expresión de PARP-1 en el TMA 6 correspondiente al caso 16 una metástasis de un SE clásico. La expresión en marrón representa la positividad de los cilindros de tumor en cada uno de los pases.

YB-1

La mayoría de TFSE expresan YB-1, siendo la expresión en nuestros casos superior al 80% en más de la mitad de los casos; con un 37% de casos completamente negativos, como son el caso 3, 7, de morfología convencional y los casos 13, 14, 15 y 16, de morfología atípica. Siendo los PNET todos positivos y con una positividad intensa y difusa en el 100% de los cores.

Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR

La expresión de AKT en su forma inactiva no fosforilada ha sido del 0% en los casos. La forma activa, fosforilada pAKT se observa en gran parte de ellos. Siendo positivos los casos metastásicos, sin diferencias significativas entre grupos inicialmente localizados y metastásicos.

La expresión de la forma fosforilada de mTOR (pmTOR), es variable aunque se asocia a una mayor expresión de pAKT tal y como se expresa en el gráfico 3. Su expresión no obstante, disminuye a lo largo de los pases.

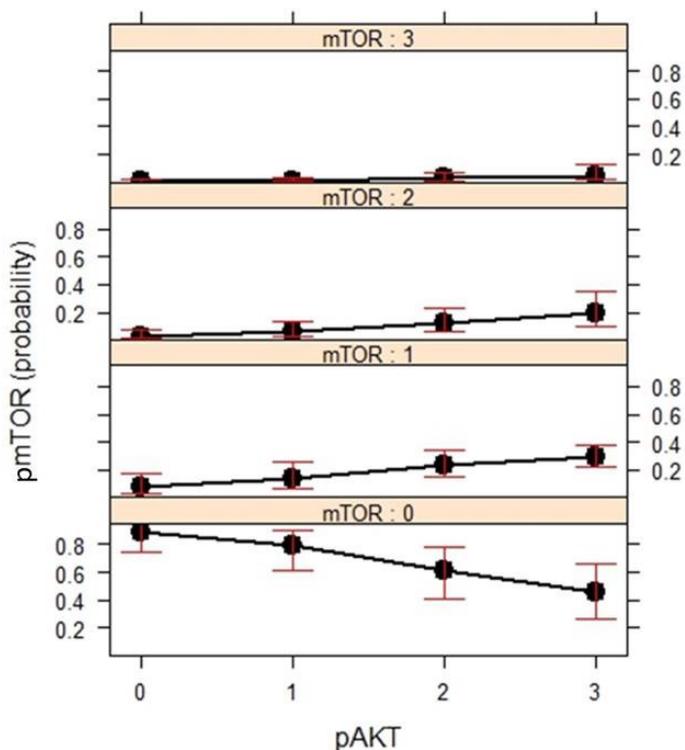


Gráfico 3.- Gráfico de dependencia parcial entre pAKT y pmTOR. Se puede comprobar que cuanto menor sea el grado de pAKT, menor será el grado de pmTOR. A medida que aumenta el grado de expresión de pAKT, disminuye la probabilidad de tener grado 0 de nivel de expresión en el pmTOR y aumenta la probabilidad de tener mayor grado de expresión.

Caso	AKT	pAKT	pmTOR	BRAF	nNFkβ	cNFkβ	PARP1	FOXO-1	YB-1	ERBB4
Ewing										
Convencional										
1	0,0%	95,7%	22,7%	0%	0%	82,4%	91,7%	100,0%	85,7%	4,3%
2	0,0%	52,9%	25,0%	0%	0%	37,5%	58,8%	100,0%	100,0%	14,3%
3	0,0%	100,0%	100,0%	0%	0%	100,0%	66,7%	100,0%	0,0%	0,0%
4	0,0%	45,3%	18,6%	0%	0%	16,9%	80,6%	100,0%	50,0%	6,3%
5	0,0%	65,0%	36,8%	0%	0%	23,8%	100,0%	100,0%	90,0%	0,0%
6	0,0%	56,5%	16,4%	0%	0%	33,3%	92,2%	98,3%	100,0%	0,0%
7	0,0%	20,0%	0,0%	0%	0%	0,0%	92,3%	100,0%	0,0%	43,8%
PNET										
8	0,0%	40,0%	0,0%	0%	0%	50,0%	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%
9	0,0%	0,0%	0,0%	0%	0%	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%
10	0,0%	30,0%	40,0%	0%	0%	70,0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%
Ewing										
11	0,0%	88,2%	37,0%	0%	0%	72,7%	62,5%	100,0%	100,0%	7,4%
12	0,0%	56,2%	5,0%	0%	0%	32,0%	80,5%	98,7%	85,5%	1,3%
13	0,0%	100,0%	0,0%	0%	0%	100,0%	75,0%	100,0%	0,0%	0,0%
14	0,0%	0,0%	0,0%	0%	0%	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%
15	0,0%	44,0%	8,3%	0%	0%	52,0%	84,0%	100,0%	0,0%	0,0%
16	0,0%	85,7%	14,6%	0%	0%	0,0%	95,2%	100,0%	0,0%	0,0%

Tabla 12. Marcadores biológicos: un formato condicional con el porcentaje de cores que presenta positividad en más del 10% de sus células (positividad 2 y 3). En blanco los negativos y en creciente intensidad de azules hasta el 100% de expresión.

Se observa extensa expresión de LSD1 en los casos, con más del 50% de los cores con positividad elevada, tal y como se describe en la tabla 13 y se observa en la figura 22. No se detectan diferencias de expresión entre los subtipos histológicos, ni modificaciones a lo largo de los pases. Tampoco hay diferencias significativas entre casos inicialmente localizados y metastásicos.

La expresión de SIRT1 es variable, sin observarse diferencias entre los subtipos morfológicos, ni en aquellos casos con debut clínico inicial distinto. Destaca la expresión en los casos metastásicos y la disminución de la expresión en los pases.

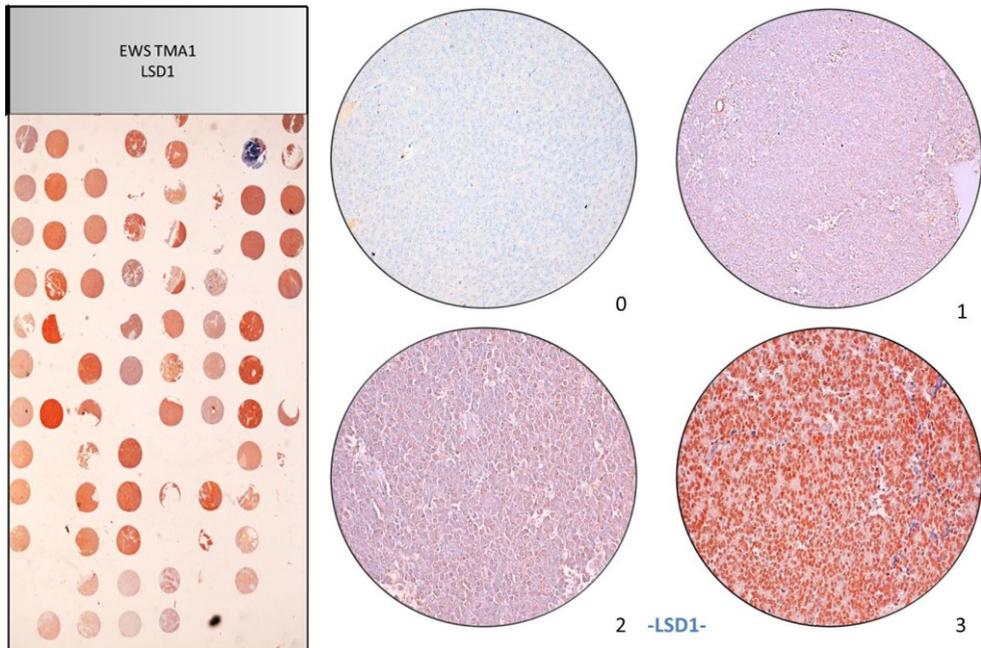


Figura 22.- Expresión nuclear de LSD1. A la izquierda un ejemplo de expresión de TMA y a la derecha a 10x ejemplos de grados de intensidad de expresión.

La expresión de HES en nuestros casos es baja, inferior al 10% en todos los casos a excepción de uno, el caso 16, en que el 43% de los casos presentaban expresión elevada.

Caso	p53	HES	LSD1	SIRT1
Ewing				
1	4,2%	7,4%	71,4%	72,7%
2	0,0%	0,0%	100,0%	78,6%
3	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
4	0,0%	9,5%	96,7%	26,7%
5	0,0%	4,2%	100,0%	80,0%
6	4,8%	0,0%	100,0%	24,2%
7	15,0%	0,0%	57,1%	21,1%
PNET				
8	50,0%	0,0%	66,7%	0,0%
9	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
10	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
Ewing				
11	0,0%	8,8%	89,7%	96,7%
12	0,0%	9,0%	89,3%	39,5%
13	0,0%	0,0%	100,0%	100,0%
14	0,0%	0,0%	72,7%	18,2%
15	0,0%	3,8%	100,0%	8,3%
16	0,0%	43,9%	100,0%	43,9%

Tabla 13.- Porcentaje de expresión de genes reguladores de expresión génica y p53.

Nuestros casos no muestran apenas expresión de BRAF, siendo ésta focal y débil, con ningún caso de positividad moderada o intensa superior al 10% de las células; por eso en la tabla 14 aparece un 0% de expresión, porque sólo se consideran positivities moderadas y elevadas,

valoradas como 2 y 3, respectivamente. Existe no obstante expresión débil en el 40% de los cores, sin observarse diferencias estadísticas significativas ni entre debuts clínicos distintos, ni en los subtipos morfológicos distintos; aunque sí se ha observado un discreto aumento de expresión en el caso del que disponemos de la metástasis y su tumor original, sin ser éste aumento, estadísticamente significativo. No obstante supone un cambio a tener en cuenta dado que la activación de BRAF puede ser bloqueada farmacológicamente.

4.6.- Evaluar las diferencias de expresión en tumores inicialmente localizados y metastásicos para encontrar diferencias fenotípicas que justifiquen la distinta agresividad de ambos.

Marcadores biológicos

Como ya hemos visto, en la tabla 12 se describe el % de cilindros positivos para cada marcador, de los distintos casos agrupados por morfología, según SE clásico, PNET o SE atípico. En la tabla 14 se compara dicha expresión entre casos inicialmente localizados y metastásicos, detallando el número total de cilindros y el porcentaje de ellos que muestran cada una de las intensidades evaluadas (0,1, 2 y 3). De esta forma podemos observar si alguno de ellos es diferente y pudiera ser clave para evaluar por qué unos se expresan cuando la enfermedad es localizada y otros cuando ya es sistémica.

Variable	Localizados	Metastásicos	Variable	Localizados	Metastásicos	Variable	Localizados	Metastásicos	Variable	Localizados	Metastásicos
	N (%)	N (%)		N (%)	N (%)		N (%)	N (%)		N (%)	N (%)
BRAF			pAKT			SIRT.1			Mtor		
0	271 (90.9%)	113 (91.9%)	0	72 (22.1%)	26 (21.8%)	0	115 (38.7%)	71 (58.2%)	0	190 (64.8%)	67 (54.9%)
1	27 (9.1%)	10 (8.1%)	1	71 (21.8%)	19 (16%)	1	38 (12.8%)	14 (11.5%)	1	51 (17.4%)	39 (32%)
2	0 (0%)	0 (0%)	2	104 (31.9%)	39 (32.8%)	2	47 (15.8%)	20 (16.4%)	2	38 (13%)	15 (12.3%)
3	0 (0%)	0 (0%)	3	79 (24.2%)	35 (29.4%)	3	97 (32.7%)	17 (13.9%)	3	14 (4.8%)	1 (0.8%)
c.kit			IGFR			ERB.B4			Y.BOX		
0	210 (80.5%)	98 (82.4%)	0	22 (7.8%)	17 (14.2%)	0	56 (19.3%)	22 (18.8%)	0	31 (12.8%)	0 (0%)
1	47 (18%)	21 (17.6%)	1	33 (11.7%)	21 (17.5%)	1	225 (77.6%)	88 (75.2%)	1	14 (5.8%)	0 (0%)
2	4 (1.5%)	0 (0%)	2	108 (38.4%)	30 (25%)	2	9 (3.1%)	7 (6%)	2	36 (14.9%)	1 (7.7%)
3	0 (0%)	0 (0%)	3	118 (42%)	52 (43.3%)	3	0 (0%)	0 (0%)	3	161 (66.5%)	12 (92.3%)
ki67			IGF			CASPASA.8			BCL2		
0	131 (55.3%)	25 (61%)	0	129 (49.2%)	36 (29.5%)	0	244 (84.1%)	101 (89.4%)	0	152 (48.9%)	60 (50%)
1	47 (19.8%)	8 (19.5%)	1	45 (17.2%)	10 (8.2%)	1	40 (13.8%)	3 (2.7%)	1	27 (8.7%)	13 (10.8%)
2	45 (19%)	8 (19.5%)	2	61 (23.3%)	18 (14.8%)	2	3 (1%)	9 (8%)	2	62 (19.9%)	17 (14.2%)
3	14 (5.9%)	0 (0%)	3	27 (10.3%)	58 (47.5%)	3	3 (1%)	0 (0%)	3	70 (22.5%)	30 (25%)
p16			FOXO1			HES1			parp1		
0	61 (27%)	18 (35.3%)	0	1 (0.4%)	0 (0%)	0	284 (85.8%)	87 (72.5%)	0	45 (14.4%)	4 (3.4%)
1	23 (10.2%)	11 (21.6%)	1	0 (0%)	1 (0.9%)	1	26 (7.9%)	15 (12.5%)	1	32 (10.2%)	4 (3.4%)
2	20 (8.8%)	3 (5.9%)	2	19 (7.2%)	6 (5.4%)	2	21 (6.3%)	15 (12.5%)	2	23 (7.3%)	5 (4.2%)
3	122 (54%)	19 (37.3%)	3	244 (92.4%)	104 (93.7%)	3	0 (0%)	3 (2.5%)	3	213 (68.1%)	106 (89.1%)
p53			SA.2			LSD1					
0	276 (85.7%)	56 (67.5%)	0	54 (19.2%)	61 (52.6%)	0	9 (3%)	4 (3.5%)			
1	42 (13%)	21 (25.3%)	1	26 (9.3%)	6 (5.2%)	1	16 (5.3%)	2 (1.7%)			
2	1 (0.3%)	0 (0%)	2	120 (42.7%)	29 (25%)	2	116 (38.3%)	26 (22.6%)			
3	3 (0.9%)	6 (7.2%)	3	81 (28.8%)	20 (17.2%)	3	162 (53.5%)	83 (72.2%)			

Tabla 14.- Expresión comparada de marcadores biológicos en casos inicialmente localizados y metastásicos. En las columnas azules cada uno de los marcadores y las intensidades. N representa el número de cilindros para cada intensidad de expresión y al lado entre paréntesis el porcentaje de ellos.

El estudio estadístico sólo ha mostrado una expresión diferente y estadísticamente significativa en SA2, que se expresa intensamente en los localizados y menos en los metastásicos. Tal y como se observa en la siguiente tabla (tabla 15).

	P-Valor	
	Debutinicial (Metastásicos)	Log(pases)
Caspasa 8	0.52	0.08
P16	0.45	0.58
Ki67	0.95	0.37
pAKT	0.97	0.11
pmTOR	0.49	0.007
IGF1R	0.88	0.07
P53	0.15	0.11
ERBB4	0.17	0.26
BRAF	0.84	< 0.001
PARP1	0.08	0.84
cKIT	0.92	0.12
FOXO1	0.86	0.13
SA2	0.005	0.94
YB1	0.68	< 0.001
SIRT1	0.14	0.08
HES1	0.97	< 0.001
LSD1	0.63	0.49
BCL2	0.68	0.61

Tabla 15.- Comparaciones entre expresión de marcadores biológicos en TFSE inicialmente localizados y metastásicos. En gris oscuro aquellos marcadores que han sido significativos y en gris claro aquellos que aun no siendo significativos, el p-valor es muy bajo.

Y representadas de una forma más visual, mediante gráficos de dependencia parcial (gráfico 4), los indicadores SA2, PARP1, p53 y SIRT1. Los gráficos de los otros marcadores no se han añadido porque el p-valor

era muy alto y simplemente se podía ver si la expresión era alta o baja desde las imágenes y tablas anteriormente mostradas.

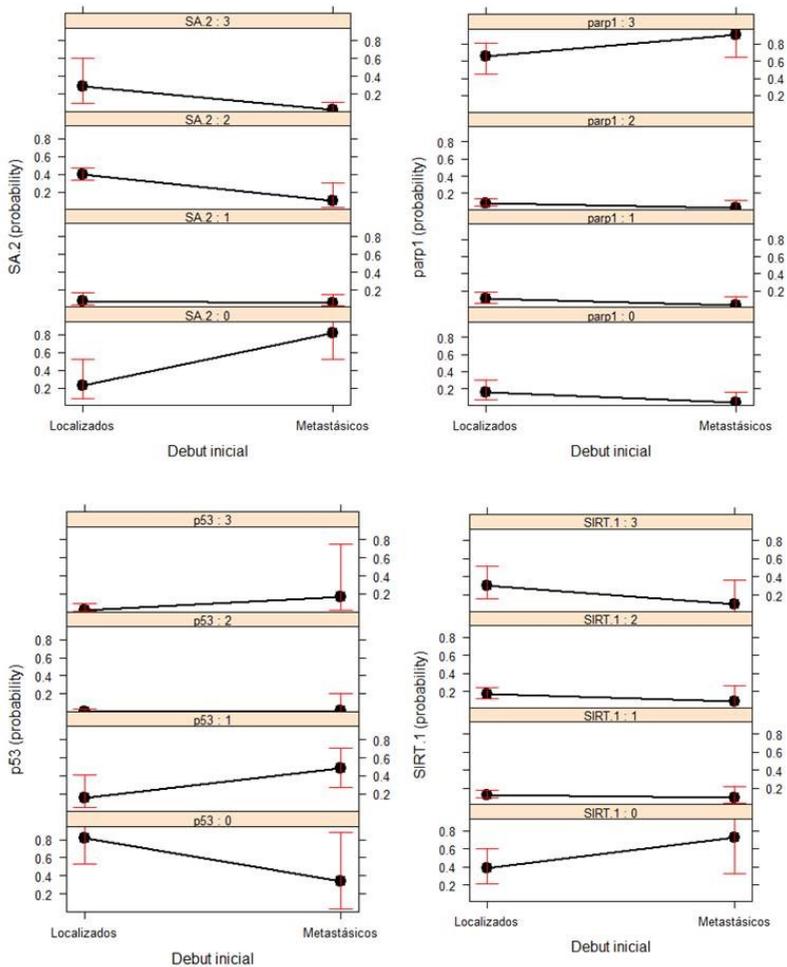


Gráfico 4.- Gráficos de dependencia parcial. Representación de la probabilidad de intensidad de expresión y porcentaje de células positivas, en 4 categorías: 0, 1, 2 y 3; comparando los SE inicialmente localizados y metastásicos.

Las proteínas PARP1 y p53 muestran mayor expresión en los casos inicialmente metastásicos que en los localizados, tal y como se muestra en las figuras 23 y 24, sin ser estadísticamente significativas.

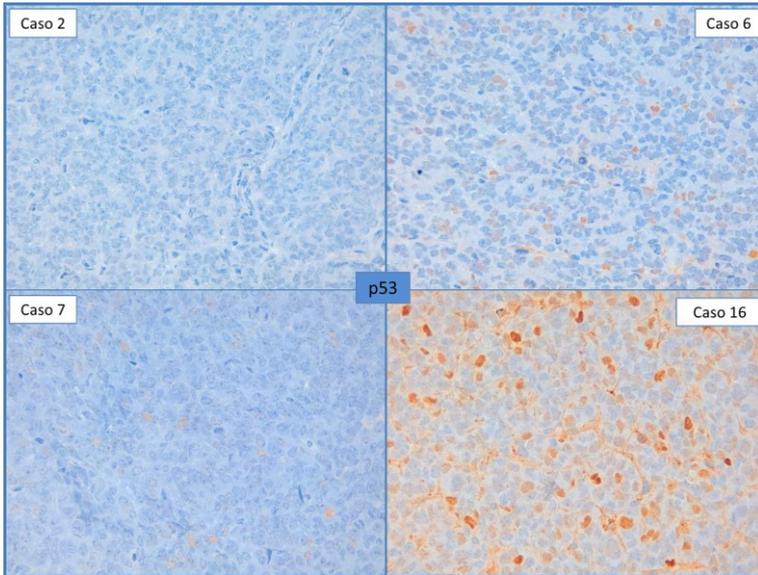


Figura 23.- Ejemplos de expresión de p53, en casos localizados, a la izquierda (casos 2 y 7) y metastásicos (casos 6 y 16), a la derecha.

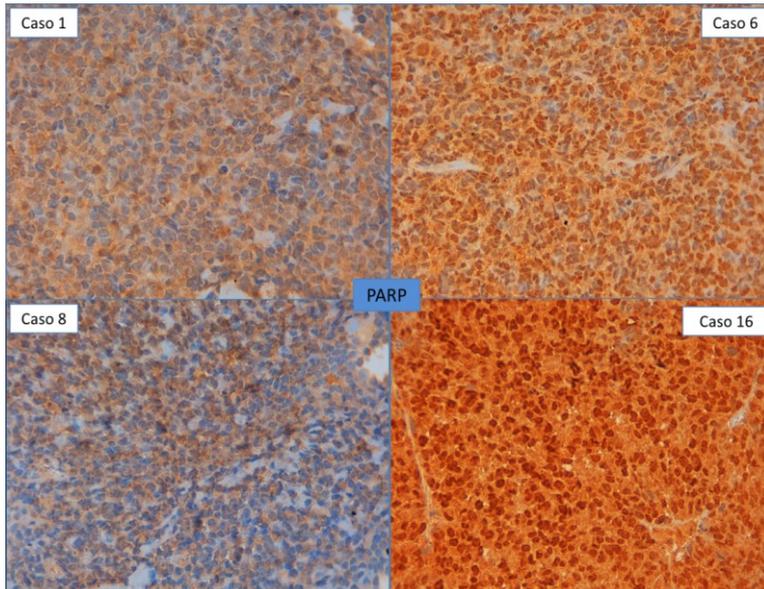


Figura 24.- Ejemplos de expresión de PARP-1, en casos localizados, a la izquierda y metastásicos a la derecha, con mayor intensidad de expresión.

Se ha analizado el Ki67 mediante un modelo de regresión beta mixto, en el cual no hemos visto diferencias estadísticamente significativas entre los debuts clínicos iniciales y la expresión de dicho marcador de proliferación. No obstante, tal y como vemos en el gráfico 5, sí observamos porcentajes de expresión menores en los localizados y mayores en los inicialmente metastásicos

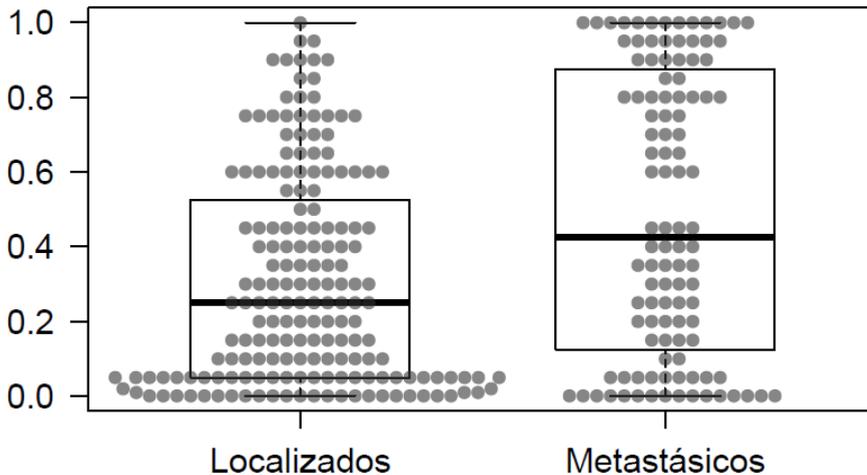


Gráfico 5.- Diagrama de cajas mostrando el tanto por 1 de la expresión de Ki67 en los casos localizados y en los metastásicos. Cada círculo representa un caso y las barras de error con la barra central en negra describen la desviación estándar de los valores y su mediana.

Si lo analizamos por cuartiles, se observa que el 75% (tercer cuartil) de los casos localizados está por debajo del 50% de expresión y en los metastásicos por debajo de 80%. No obstante, al existir algunos casos de localizados por encima de 80% de expresión y muchos de los metastásicos con valores menores, no es posible establecer un porcentaje de corte que nos separe un grupo del otro. En la figura 25 se representan en vista panorámica de las laminillas ejemplos de expresión de Ki67.

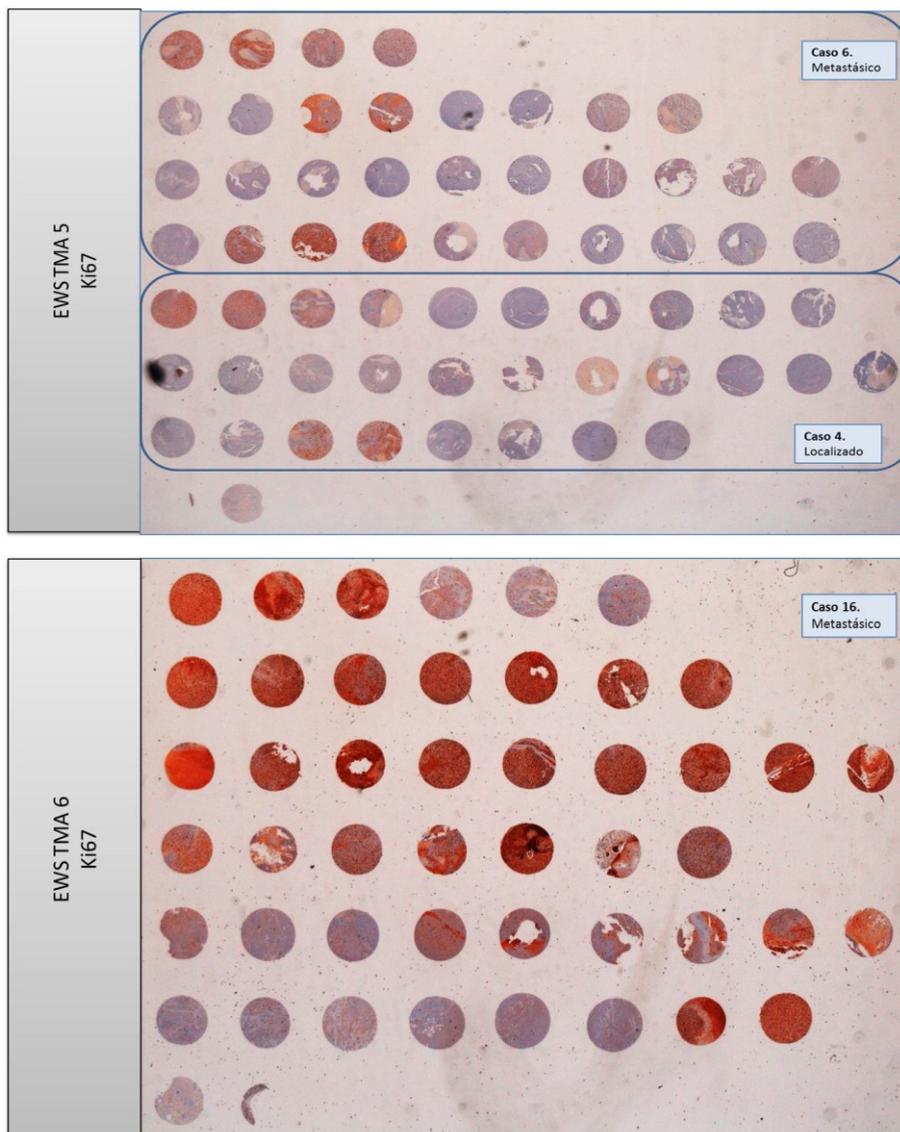


Figura 25.- Expresión de Ki67 en los TMA 5 y 6. Estos TMA incluyen además de los controles en la parte inferior, los casos 4, 6 y 16, respectivamente.

En cuanto a p16, no hay diferencias estadísticamente significativas entre metastásicos y localizados, ni tampoco cambio con los países. La expresión en nuestros casos ha sido variable con 5 casos completamente

negativos, siendo de los tres grupos morfológicos y del grupo tanto de los inicialmente localizados, como los metastásicos. Se trata de los casos 7, 8 (SE clásico), 13 (PNET) y 15 y 16 (SE atípicos).

4.7.- Evaluar el cambio de expresión de los marcadores en los pases.

Es interesante estudiar la evolución de los niveles de expresión de los distintos marcadores estudiados, en el tiempo, no sólo para asegurarnos de que los resultados son reales y no debidos a un desigual número de pases, sino para ver cómo cambia el tumor en el tiempo y detectar posibles cambios que resulten de interés en clínica; a la vez que ofrezcan opciones terapéuticas.

Tal y como vemos en la tabla 16, en 4 de los marcadores la evolución en los pases es estadísticamente significativa: BRAF, HES1, pmTOR e YB1. Sólo YB1 muestra un cambio lo significativamente grande como para que sea representado en un gráfico (gráfico 6). En los otros marcadores (BRAF, HES1 y pmTOR) el cambio aunque significativo, es pequeño, lo que supone unas líneas casi rectas al intentar representarlos en un gráfico. Lo que quiere decir que varía ínfimamente con el paso del tiempo. En el gráfico 6, vemos cómo decrece la expresión de YBOX (YB1) a lo largo de los pases. Es decir, a medida que avanzan los pases es más probable que se exprese menos, mientras que en los primeros pases se expresa en mayor proporción e intensidad.

	P-Valor
	Log(pases)
Caspasa8	0.08
P16	0.58
Ki67	0.37
pAKT	0.11
pmTOR	0.007
IGF1R	0.07
P53	0.11
ERBB4	0.26
BRAF	< 0.001
PARP1	0.84
cKIT	0.12
FOXO1	0.13
SA2	0.94
YB1	< 0.001
SIRT1	0.08
HES1	< 0.001
LSD1	0.49
BCL2	0.61

Tabla 16.- Nivel de significación estadística del cambio de los marcadores en los pases. En gris oscuro aquellos marcadores que han sido significativos y en blanco, aquellos que no.

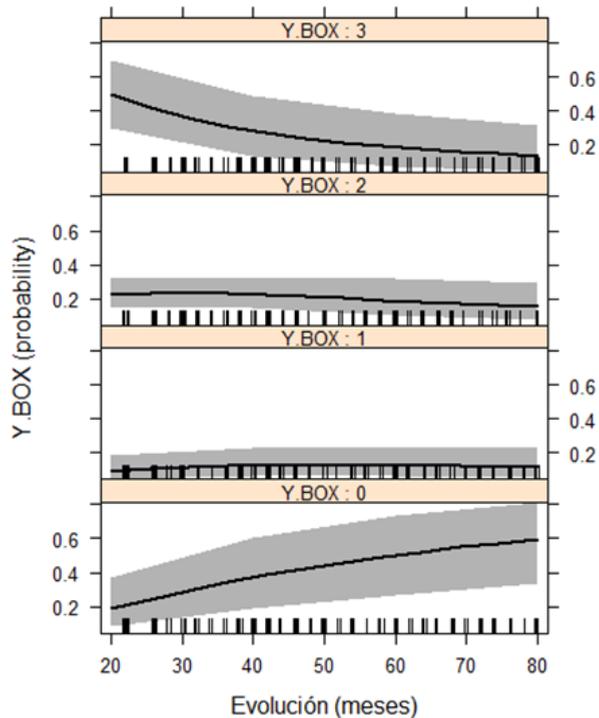


Gráfico 6.- Expresión de YBOX (YB1) en los pases. Se observa la pérdida de expresión con los pases, existiendo al inicio mucha expresión 3 y al final se reduce la 3 y 2 para aumentar la 0 y 1.

Otro cambio interesante es el del Ki67. Aunque no existen diferencias estadísticamente significativas en su expresión entre los inicialmente localizados y metastásicos en los tumores originales, como hemos visto anteriormente, sí se observa una menor expresión de Ki67 a lo largo de los pases en los tumores originales, mientras que la expresión aumenta con los pases en los metastásicos de inicio, tal y como se observa en el siguiente gráfico (gráfico 7).

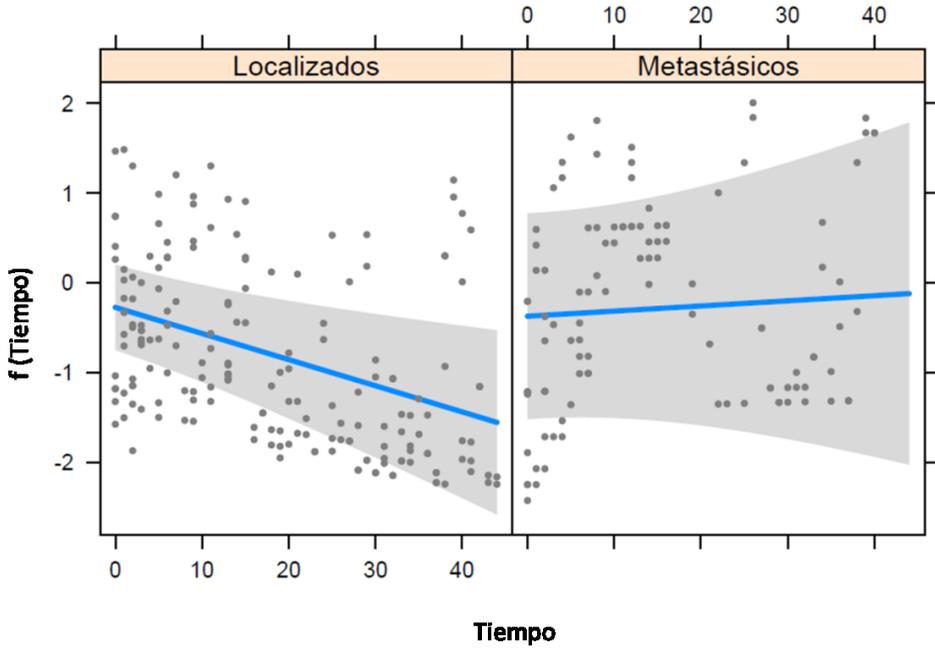


Gráfico 7. Evolución de la expresión de Ki67 en el tiempo en casos inicialmente localizados y metastásicos. Se observa la probabilidad de ser positivos en el tiempo expresado en meses (según los países).

4.8.- Detectar cambios en el fenotipo de un tumor con respecto a su metástasis.

Se han comparado ciertos marcadores entre la muestra 5 (tumor primario) y 6 (metástasis) procedentes del mismo paciente. Debemos tener en cuenta que solamente es una muestra pareada con varias muestras por pase observado. El efecto aleatorio del modelo de regresión logística ordinal se ha fijado en el pase, del cual teníamos 20 en el original y 40 en la metástasis, con 4 variables según el porcentaje de células positivas y su intensidad de expresión; tal y cómo se ha explicado en el apartado de material y métodos. Aunque las conclusiones no son extrapolables a los TFSE por tratarse de una única muestra pareada, el interés del experimento reside en contrastar el fenotipo del tumor primario con el de la metástasis.

En el gráfico 8 se muestra la expresión de diversos marcadores, tanto en el tumor original como en la metástasis, en forma de frecuencias relativas, que vemos como la probabilidad de expresar cada uno de los marcadores con 0, 1, 2 y 3.

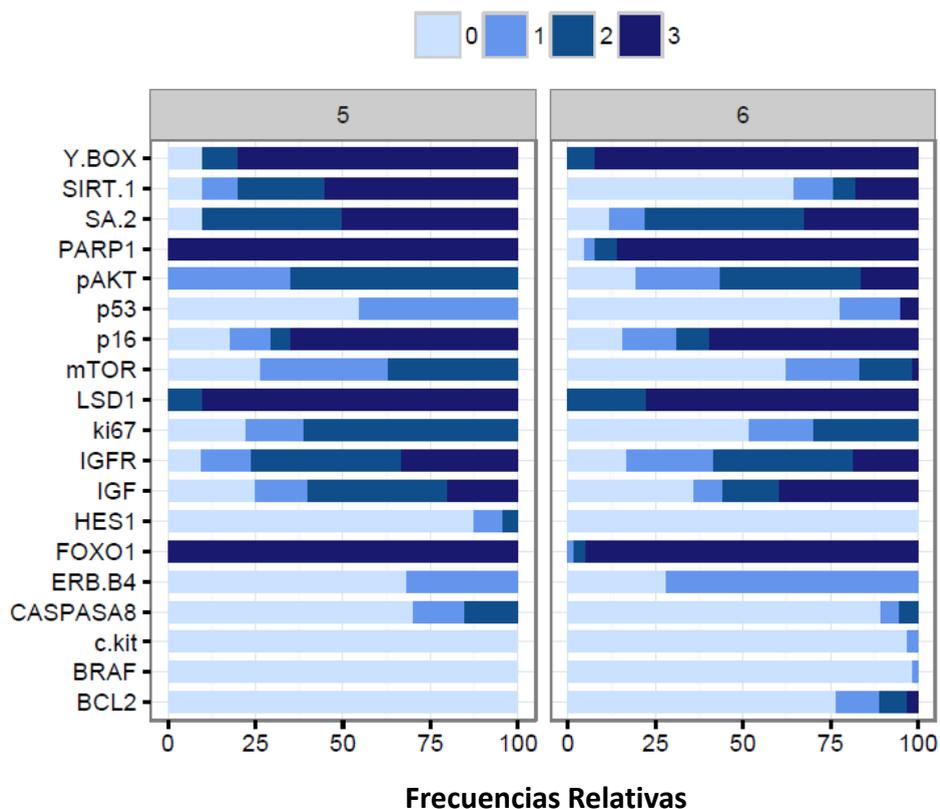


Gráfico 8. Frecuencias relativas de expresión. Representación esquemática de la diferente expresión de determinados marcadores en el tumor original y la metástasis, en un formato condicional de azules, según escala superior.

Si los agrupamos por marcadores de los que se conoce su utilidad como diana terapéutica, sólo pmTOR se expresa menos en la metástasis que en el tumor primario. En cambio, no hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles de pAKT entre los pases de la metastásis y los pases del tumor primario.

ANTICUERPO	p VALOR	Log (pases)
pmTOR	<0,001	<0,001
pAKT	0,066	0,99
IGF1R	0,81	0,35
ERBB4	0,02	0,15
P16	0,57	0,91
BRAF	NA	NA

Tabla17. Grado de significancia de marcadores entre el original y su metástasis. En azul se destaca el que ha resultado estadísticamente significativo, que es pMtor. NA: no aplicable, dado que los valores todos eran bajos entre 0 y 1.

Por lo se refiere a porcentajes absolutos de expresión, en la Tabla 19 podemos observar pequeños cambios en los porcentajes de expresión de los mismos. Por un lado tenemos aumentos de expresión en BCL2, p53, S100, CD56 y YB1 y muy discreto en BRAF, ERBB4 y cKIT. Por otro lado, se observa reducción de expresión en p16, pAKT, pmTOR, PARP1, FOXO1, SA2, HES y Ki67, observándose significación estadística sólo en el caso de pmTOR.

En el caso de BRAF no se ha hecho cálculo estadístico debido a que todos los cores eran prácticamente negativos, por eso aparece NA en la tabla 17. Siendo la mayoría de resultados para ambos casos 0, a excepción de 1 core en la metástasis que presentó una positividad débil en el 5% de las células. En la tabla 17 se muestran la expresión en los cores.

Positividad	Original	Metastásis
0	18	64
1	0	1

Tabla 18.- Expresión de BRAF en el original (caso 5) y su metástasis (caso 6). Resultado simplificado a 2 valores, 0 negativo y 1 positivo en más del 10% de las células. Los resultados se expresan en número de cores.

Caso	CD99	HNK1	CAV1	FLI1	ERG	Ezrina				
5	96%	81%	100%	73%	0%	7%				
6	86%	75%	94%	68%	0%	3%				
Caso	BCL2	p63	Sinaptofisina	CD56	S100	cKIT	Gal1			
5	0%	0%	0%	0%	22%	0%	0%			
6	11%	0%	0%	19%	97%	0%	0%			
Caso	p16	p53	Ki67							
5	71%	0%	61%							
6	69%	5%	30%							
Caso	pAKT	pmTOR	BRAF	PARP1	FOXO-1	YB-1	SA-2	ERBB4	HES	LSD1
5	65,0%	36,8%	0,0%	100,0%	100,0%	90,0%	90,0%	0,0%	4,2%	100,0%
6	56,5%	16,4%	0,0%	92,2%	98,3%	100,0%	78,0%	0,0%	0,0%	100,0%

Tabla 19. Porcentajes absolutos de expresión de los distintos marcadores en ambos casos (original, caso 5 y su metástasis, caso 6). En azul claro los marcadores que pierden expresión, en azul oscuro los que aumentan su expresión y en blanco los que no se modifican. En gris BRAF, ERBB4 y cKIT que aunque su expresión aumenta, es mínimamente.

4.9.- Validación in silico de marcadores diferencialmente expresados en distintas formas clínicas de SE o con variación a lo largo de los pases.

La validación *in silico* de los biomarcadores nos ha permitido contrastar nuestros resultados con los de una serie más amplia de SE de la que se dispone información de expresión en mRNA de genes incluidos en esta tesis, así como de seguimiento clínico (191).

Existe una expresión de Ki67 (Gráfico 9A) significativamente superior en SE metastásicos con respecto a los localizados. Así mismo, existe peor supervivencia libre de progresión (Gráfico 9B) y peor supervivencia global (Gráfico 9C) en aquellos casos con Ki67 elevado. Los gráficos se han elaborado considerando una cohorte de 88 pacientes de la serie de Savola que incluye 64 tumores primarios localizados y 14 metastásicos. No se tuvieron en cuenta para el gráfico A, pero sí para el resto, 10 tumores por ser recidivas. En las Curvas de supervivencia Kaplan-Meier se observa como a Ki67 mayores, las supervivencias libre de progresión ($p=0.0006$) y global ($p<0.0001$) son peores, en SE.

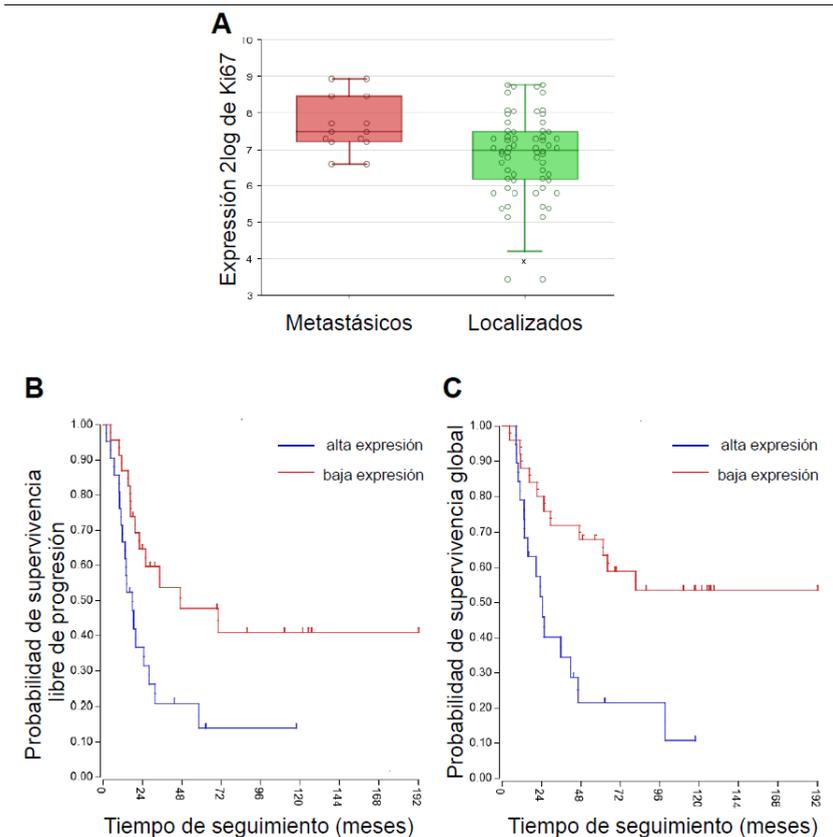


Gráfico 9. Validación *in silico* de la expresión de Ki67. Datos obtenidos del estudio de Savola en R2: microarray analysis and visualization platform (<http://r2.amc.nl>). **(A)** Análisis de la expresión de Ki67 entre 64 tumores primarios y 14 metastásicos. **(B)** Curvas de Kaplan-Meier mostrando que la sobreexpresión de Ki67 se asocia a peor supervivencia libre de progresión ($p=0.0006$) y **(C)** a peor supervivencia global ($p<0.0001$) en SE.

Con respecto a los biomarcadores de apoptosis, que en nuestra serie no han resultado significativos, al realizar el análisis *in silico* del marcador proapoptótico Caspasa 8, se observó que tampoco hay diferencias significativas entre la expresión de tumores localizados y metastásicos, pero su sobreexpresión se asocia a mejor pronóstico tanto en supervivencia libre de progresión, como en supervivencia global (Gráfico 10).

Por el contrario, la sobreexpresión del biomarcador antiapoptótico BCL2 se asoció significativamente con una peor supervivencia libre de progresión y peor supervivencia global (Gráfico 11). Al igual que en nuestro estudio, en la cohorte *in silico* no hemos observado diferencias significativas entre los niveles de expresión y los distintos subtipos morfológicos de SE.

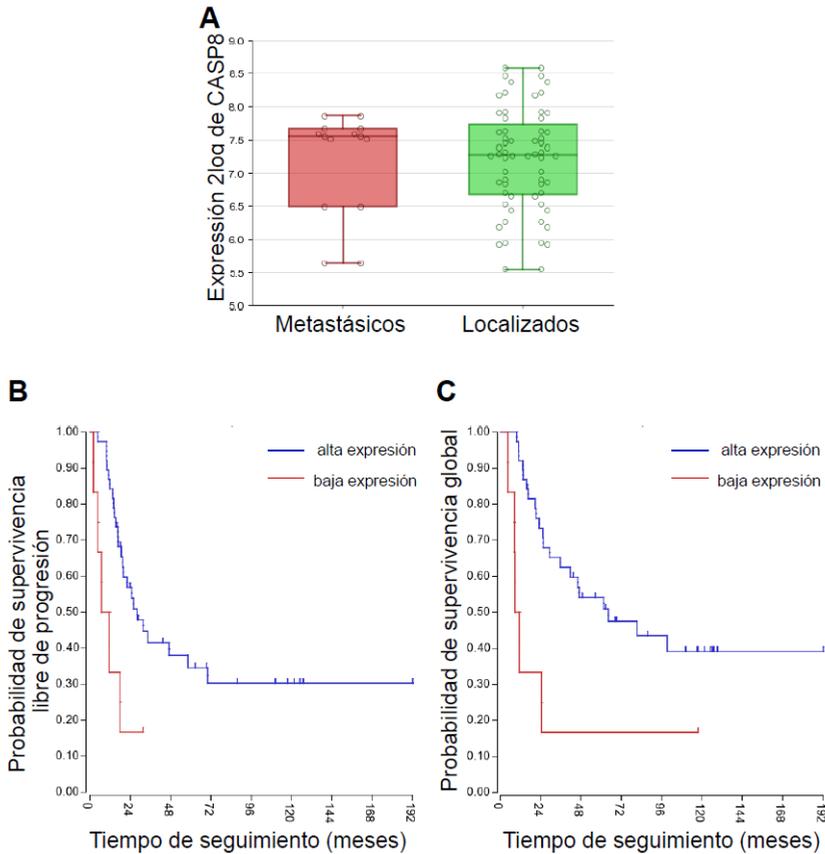


Gráfico 10. Niveles de expresión de Caspasa 8 en tumores primarios y metastásicos y curvas de supervivencia asociadas a la expresión de Caspasa 8. **(A)** Diagrama de cajas mostrando que no hay diferencias significativas entre la expresión de Caspasa 8 en tumores de primarios y metastásicos ($p=0.91$). **(B)** La sobreexpresión de Caspasa 8 se asocia a mayor supervivencia libre de progresión ($p=0.0002$) y **(C)** a mayor supervivencia global ($p<0.0001$) en SE.

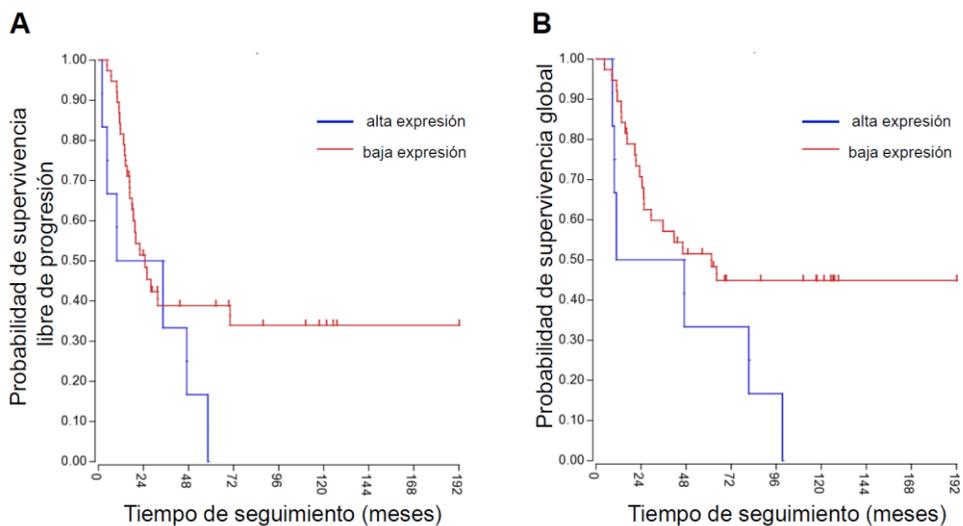


Gráfico 11. Sobrexpresión de BCL2 asociada significativamente a peor pronóstico. (A) Curvas de Kaplan-Meier mostrando que la sobreexpresión de BCL2 se asocia a peor supervivencia libre de progresión ($p=0.03$) y (B) a peor supervivencia global ($p<0.006$) en SE.

La sobreexpresión de PARP1 ha revelado asociarse a peor pronóstico en la cohorte de Savola de nuestro estudio *in silico* y ser significativamente superior en los tumores metastásicos (Gráfico 12).

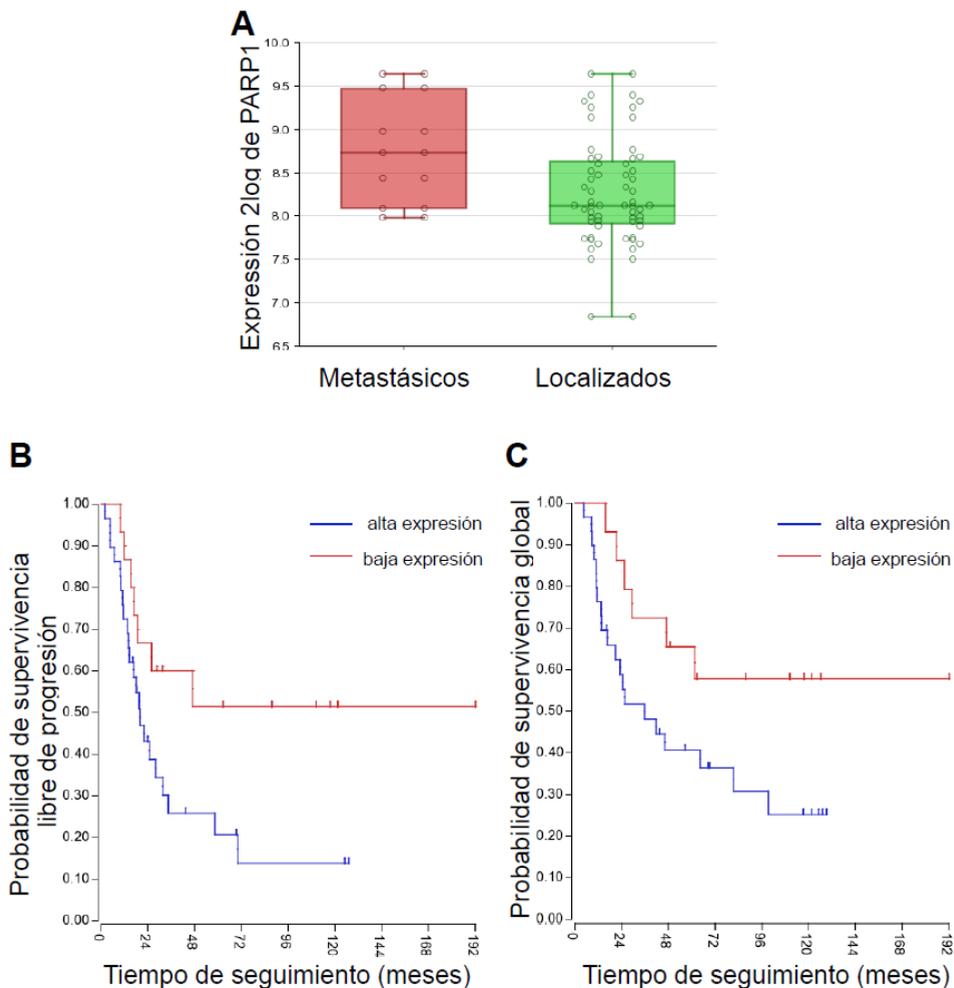


Gráfico 12. La sobreexpresión de PARP1 se asocia significativamente a peor pronóstico. (A) Diagrama de cajas comparando la expresión de PARP1 en 14 SE metastásicos y en 64 SE localizados ($p=0.008$) **(B)** Curvas de Kaplan-Meier mostrando que la sobreexpresión de PARP1 se asocia a peor supervivencia libre de progresión ($p=0.003$) y **(C)** a peor supervivencia global ($p<0.007$) en SE.

Las curvas de Kaplan-Meier basadas en la mayor o menor expresión de YB-1 confirman su potencial oncogénico, asociándose muy significativamente su sobreexpresión a peor pronóstico (Gráfico 13).

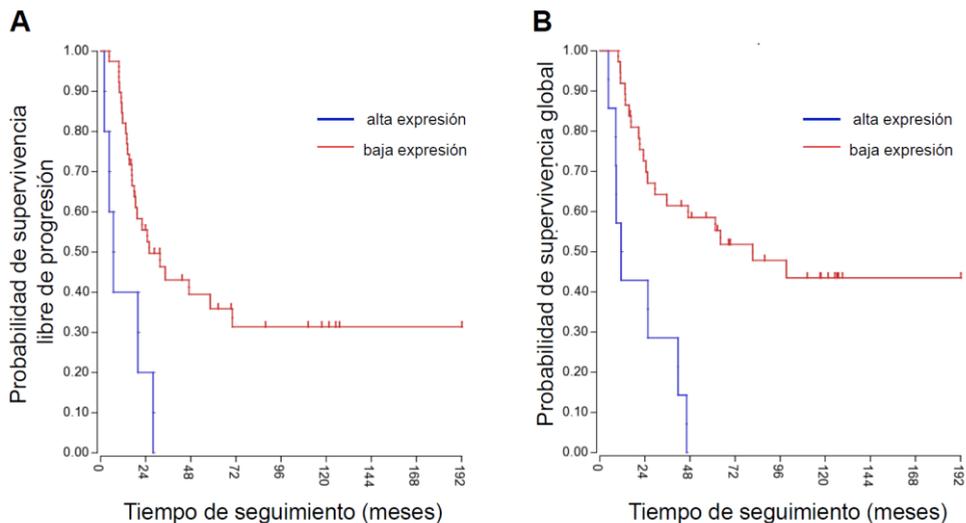


Gráfico 13. La sobreexpresión de YB-1 se asocia significativamente a peor pronóstico. (A) Curvas de Kaplan-Meier mostrando que la sobreexpresión de YB-1 se asocia a peor supervivencia libre de progresión ($p < 0.0001$) y **(B)** a peor supervivencia global ($p < 0.0001$) en SE.

De manera similar a YB-1, la sobreexpresión de ERBB4 también se asocia de manera muy significativa a peor pronóstico (Gráfico 14), si bien no hemos podido encontrar diferencias de expresión entre tumores primarios y metastásicos, tal y como ocurre en nuestra serie.

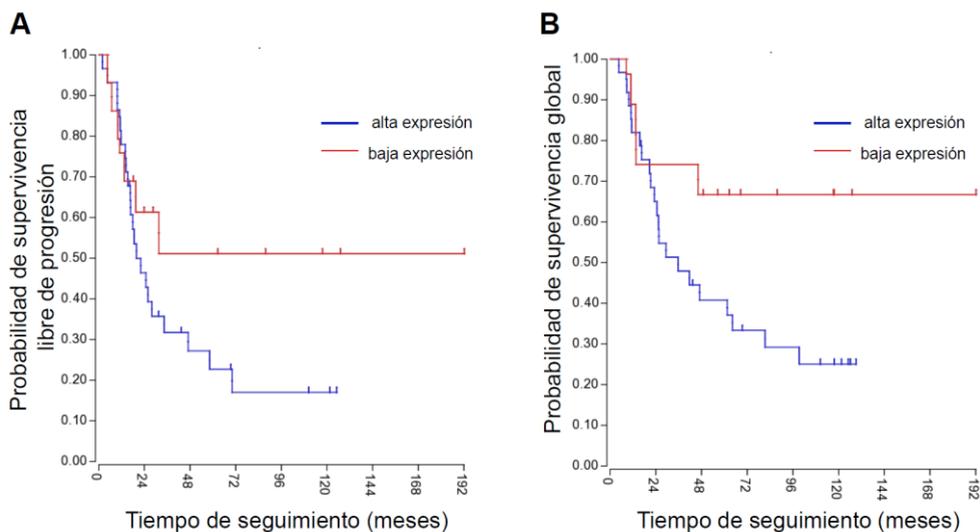


Gráfico 14. La sobreexpresión de ERBB4 se asocia significativamente a peor pronóstico. (A) Curvas de Kaplan-Meier mostrando que la sobreexpresión de ERBB4 se asocia a peor supervivencia libre de progresión ($p=0.04$) y **(B)** a peor supervivencia global ($p=0.008$) en SE.

Nuestros resultados apoyan que la sobreexpresión de SA2 es mayor en los tumores primarios localizados que en los metastásicos, apoyando su actividad biológica como supresor tumoral. A pesar de que los resultados *in silico* no son significativos (Gráfico 15A), la sobreexpresión de SA2 tiene un valor preventivo tanto de recaída, como de supervivencia global (Gráfico 15B y C).

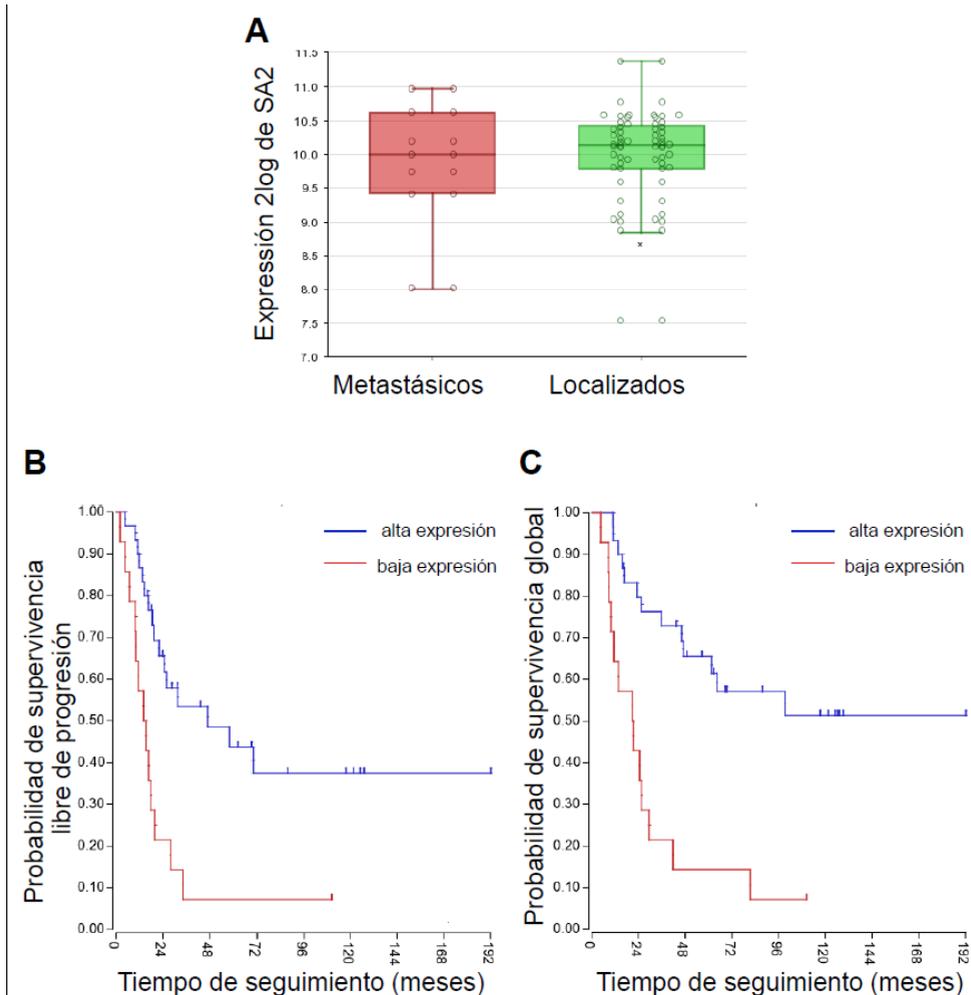


Gráfico 15. La sobreexpresión de SA2 se asocia a mayor supervivencia. (A) análisis de la varianza con un factor (ANOVA) ($p=0.54$) entre 64 tumores primarios y 14 metastásicos. **(B)** Curvas de Kaplan-Meier mostrando que la sobreexpresión de SA2 se asocia a mejor supervivencia libre de progresión ($p<0.001$) y **(C)** a mejor supervivencia global ($p<0.001$) en SE.

Nuestros estudios nos sugieren que hay un discreto aumento de expresión de BRAF en las metástasis, aunque no significativa. Los resultados *in silico* siguen apoyando que no hay una diferencia significativa en la expresión de BRAF entre SE primarios y metastásicos (Gráfico 16A).

Además, la sobreexpresión de BRAF tampoco se asocia en SE con peor pronóstico (Gráfico 16 B y C).

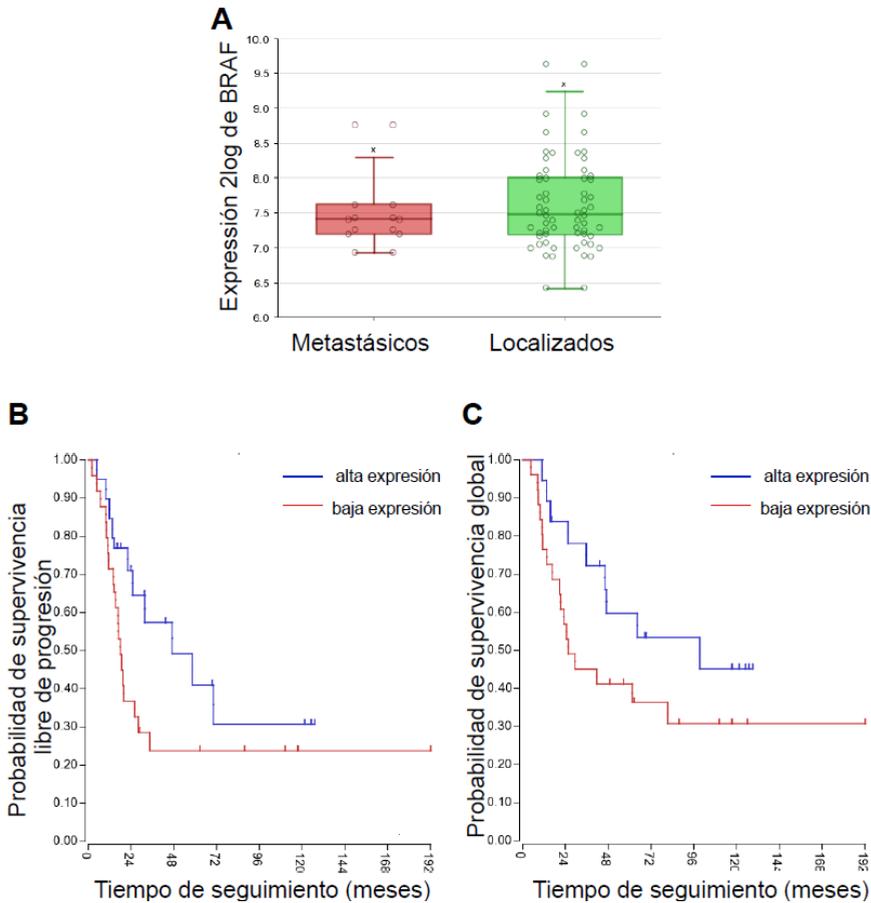


Gráfico 16. La sobreexpresión de BRAF no se asocia a metástasis ni tampoco a peor pronóstico. (A) análisis de la varianza con un factor (ANOVA) ($p=0.56$) entre 64 tumores primarios y 14 metastásicos. **(B)** Curvas de Kaplan-Meier mostrando que la sobreexpresión de BRAF no se asocia a peor pronóstico.

El estudio *in silico* de la expresión de TP53 no reveló diferencias significativas ni entre tumores primarios y metastásicos, ni tampoco como valor pronóstico en supervivencia libre de progresión ni global, por lo que la mayor tendencia de sobreexpresión que observamos en tumores metastásicos no es significativa o simplemente las diferencias observadas

inmunohistoquímicamente (sobrexpresión de la proteína) no se corresponden a diferencias en la expresión de mRNA de TP53 como veremos más adelante en la discusión.

Aunque nuestros resultados no muestran cambios significativos en los niveles de expresión de LSD1 que se asocian a variables clínicas o a cambios de expresión en los sucesivos pases de los xenoinjertos, su intensa expresión en más del 50% de los casos sugiere que su sobreexpresión es un mecanismo frecuente en SE para alterar la epigenética del tumor y por tanto, inhibidores como HCI-2509 podrían constituir un tratamiento eficaz alternativo a la terapia convencional en caso de recaída. Con objeto de validar esta hipótesis, hemos realizado un estudio *in silico* de supervivencia libre de progresión y global (Gráfico 17). Este estudio confirma que la sobreexpresión de LSD1 se asocia a peor pronóstico.

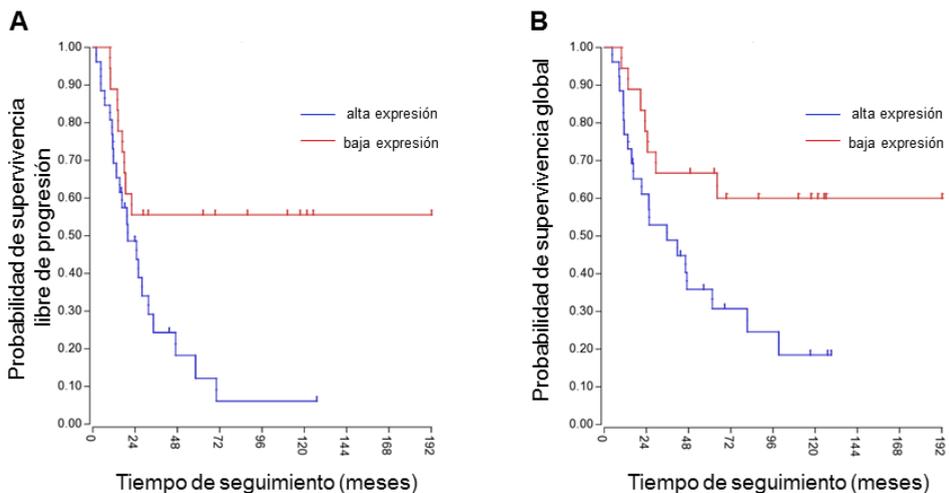


Gráfico 17. La sobreexpresión de LSD1 (KDM1A) se correlaciona significativamente con peor supervivencia libre de progresión (A; $p=0.0007$) y peor supervivencia global (B; $p=0.001$) en SE.

5.- DISCUSIÓN

En la actualidad siguen siendo la morfología y un amplio estudio inmunohistoquímico las herramientas fundamentales para orientar adecuadamente el diagnóstico del sarcoma de Ewing. Estos estudios necesitan de la complementariedad de estudios moleculares para un diagnóstico definitivo y veraz, así como para excluir definitivamente otros diagnósticos diferenciales que forman parte del espectro morfológico de los sarcomas de células redondas y que comparten marcadores inmunohistoquímicos.

Las mejoras técnicas en las determinaciones moleculares han permitido optimizar al máximo el material recibido para el diagnóstico en los Servicios de Anatomía Patológica. No sólo se realizan con material congelado, que sigue siendo lo deseable, sino también a partir de improntas de tumores y bloques de parafina con la misma validez y fiabilidad, de forma que facilitan enormemente la rutina de trabajo.

La inclusión de técnicas de trabajo como los TMA ha facilitado el estudio de numerosos tumores en una sola laminilla, economizando en tiempo y recursos. Este es el motivo principal por el que se ha elegido esta metodología para nuestro trabajo, debido a que se iban a estudiar muchos pases y muchos marcadores. El hecho de incluir un área concreta y deseada del tumor facilita enormemente la lectura de técnicas de hibridación *in situ* como FISH. Hay que tener en cuenta que para eliminar el sesgo de selección del tumor, se deben incluir varios cilindros de las distintas áreas tumorales que permitan estudiar la heterogeneidad fenotípica. Los casos en los que se pretenda estudiar la interacción de las células tumorales con el estroma deben incluir dichas células estromales para la evaluación de determinados marcadores inmunohistoquímicos. La desventaja observada en la utilización de tantas técnicas sobre los TMAs es que el material se acaba agotando y se pierden algunos cilindros y por

tanto información de algunos países. No obstante, la inclusión de varios cilindros de cada pase minimiza dicha desventaja.

No es objeto de este estudio evaluar la idoneidad de las técnicas moleculares para el diagnóstico del sarcoma de Ewing. No obstante, se realizó de forma fiable y segura FISH con la sonda *EWSR1* break apart de DAKO sobre TMA y RT-PCR en el tumor original antes de empezar el estudio; así como en aquellos casos no valorables por FISH. En ocasiones, sarcomas distintos desde el punto de vista clínico y morfológico muestran reordenamientos que implican al mismo gen. Por ello, si dudamos del diagnóstico y queremos saber exactamente cuál es la pareja de fusión del gen *EWSR1*, es necesario utilizar sondas de fusión (*EWSR1-FLI1* o *EWSR1-ERG*) o en su defecto RT-PCR, según se disponga en cada laboratorio. Estas dos técnicas son fundamentales para casos infrecuentes de TFSE en que otros genes son pareja de fusión de *EWSR1* y para detectar las entidades recientemente descritas con reordenamiento de los genes *CIC-DUX4* y *BCOR-CCNB3*.

5.1. Caracterizar in vivo una serie de TFSE, tanto en su forma original como a lo largo de los pases una vez xenotransplantados, para detectar posibles cambios en la morfología.

No hemos observado cambios significativos en la morfología de los tumores a lo largo de los pases, de tal forma que la morfología original se mantenía en ellos (181-183, 192). Este hecho refuerza la utilidad de los xenotrasplantes en el estudio del cáncer y en particular, en neoplasias poco frecuentes como son los sarcomas.

Sí se ha observado la aparición de pseudorosetas en un caso de PNET (caso 8) que originariamente eran menos evidentes, aunque presentes y de forma esporádica, en algún pase, cómo la morfología de los

SE atípicos recordaba a un SE convencional, sin llegar a ser la morfología predominante en ningún pase; hecho que apoyaría que a pesar de su apariencia morfológica son parte de una misma familia (3, 5). La firma genética que define a estos tumores, tampoco se ha visto modificada a lo largo de los pases, tal y como se ha demostrado con la realización de FISH utilizando la sonda break apart que detecta el reordenamiento del gen *EWSR1* (resultados no mostrados).

5.2.- Validar una plataforma experimental animal y estudiar la biología tumoral en ratones atímicos.

Los xenotrasplantes derivados de pacientes (PDX de las siglas en inglés *patient derived xenografts*) son una plataforma experimental de utilidad porque conservan las características morfológicas, fenotípicas y genotípicas del tumor original, así como su heterogeneidad y su respuesta al tratamiento (186). A este respecto son preferibles a los cultivos celulares, en que existe una selección celular, adaptación celular al medio de cultivo, estrés y cambios genéticos debidos a la tripsinización en los sucesivos pases y una pérdida de heterogeneidad, a la vez que no permiten estudiar la interacción del tumor con el estroma (193).

Al mismo tiempo, los PDX nos permiten diseñar biomarcadores de respuesta al tratamiento y el desarrollo de nuevas terapias que nos ayuden a realizar una medicina personalizada y de precisión (112).

De esta forma, con nuestra experiencia hemos podido validar dicha plataforma, aportando nuevos datos a la evolución en la expresión de determinados biomarcadores y a la estabilidad tanto a nivel morfológico, como molecular. Hemos observado que el número de pases alcanzado de los PNET creciendo en los animales es inferior a los convencionales, con una media de 4 pases en los PNET y de 19 en los

convencionales. Esta diferencia es estadísticamente significativa, pero debe considerarse con prudencia a la hora de extraer conclusiones más allá de nuestra serie, porque el número de casos PNET xenotrasplantados y con crecimiento, es muy bajo. En cambio, la velocidad de crecimiento en los grupos y el patrón de crecimiento, es similar. Siendo el primer pase el más lento, en el que ocurre el prendimiento del tumor en el animal y homogeneizándose el tiempo en los posteriores pases. Todos los tumores se pasaron a un nuevo animal cuando alcanzaron un volumen fijo de 1,5cm. El tiempo medio de pase en nuestros experimentos es de un pase cada mes. De tal forma que en los pases intermedios el tumor crece a una velocidad constante, siendo el tiempo entre pases similar para un volumen tumoral constante. En el momento que este tiempo entre pases es superior, podemos predecir que el tumor no va a crecer más en el ratón y el experimento ha llegado a su fin. Éste fenómeno no ha sido estudiado con anterioridad y puede ser de utilidad en el mantenimiento de una plataforma animal. No se detectó cambio en la morfología, ni en el índice proliferativo (Ki67) que permitan predecir cuándo los pases han llegado a su fin.

Este es el primer trabajo que describe la biología tumoral del SE xenotrasplantado, determinando el tiempo inicial, el tiempo entre pases y el tiempo final en una experiencia y puede resultar de utilidad en sucesivos trabajos.

5.3.- Estudiar la posible presencia de metástasis realizando el estudio autopsico de cada uno de los animales.

En cuanto a la utilidad del modelo animal en el estudio de metástasis, este modelo no ha demostrado ser útil. Ninguno de los casos presentó metástasis a pesar de presentar metástasis precoces en la clínica y cuando se utilizan otras vías de inoculación, como son la intravenosa (194) o la intraabdominal perirrenal (195), que deben ser priorizadas si el objetivo del trabajo es generar metástasis

5.4.- Conocer los principales marcadores inmunohistoquímicos disponibles para el diagnóstico de los TFSE, así como su robustez en los distintos subtipos histológicos y a lo largo de los pases.

A pesar de que se conocen los marcadores inmunohistoquímicos que se han perfilado como característicos de los TFSE (CD99, FLI1, HNK1 y CAV1) y se han estudiado en series amplias (3), no se conoce hasta el momento su evolución en el tiempo, ni su posible variación en recidivas y metástasis con respecto al tumor original. Tampoco se conoce si existen diferencias de expresión en las distintas formas de presentación clínica del tumor. De ahí la utilidad del estudio de dichos marcadores en nuestra serie y utilizando xenotrasplantes.

La mayoría de nuestros casos ha presentado positividad para CD99 (13 de los 16 casos presentan más del 30% de expresión siendo ésta intensa, con una media de 95% de expresión) independientemente del subtipo histológico. CD99 es un marcador constante, tal y como ha sido descrito en la literatura en grandes series de SE (3). Aunque la expresión estromal de CD99 se ha asociado a pronóstico en tumores epiteliales

(196), la expresión en tumores de la familia de Ewing no tiene ningún impacto significativo en la supervivencia (197). Sin embargo, la expresión de membrana de CD99 es muy característica de estos tumores y aunque no exclusiva, es una herramienta esencial en el diagnóstico de estos sarcomas (198). No obstante no es estrictamente necesaria para su diagnóstico, porque aunque escasos, se han descrito SE CD99 negativos, confirmados genéticamente (3). En nuestra serie, 3 casos (caso 7, 10 y 14), cada uno con una morfología distinta, han presentado positividad baja y fundamentalmente citoplásmica para CD99, siendo casos típicos de SE a otros aspectos como son datos clínicos de aparición, morfología y citogenética. Hallazgo a tener en cuenta en el diagnóstico de rutina de este sarcoma. La expresión de CD99 también se detecta en otras neoplasias que están en el espectro morfológico diferencial del SE, como la leucemia linfoblástica u otros sarcomas de células redondas, como son el sarcoma sinovial, el rhabdomioma o el osteosarcoma de células redondas (3). La expresión de CD99 en osteosarcomas podría tener un papel oncosupresor a través de la regulación de caveolina y la inhibición de la quinasa SRC (199).

El 87% de los casos, tal y como hemos visto en resultados, fueron positivos para FLI1, siendo no obstante su positividad heterogénea y parcheada; sin diferencias estadísticamente significativas entre los subtipos. La tinción nuclear del anticuerpo FLI1 fue considerada de gran utilidad inicialmente en el diagnóstico de TFSE (198), pero diversas publicaciones posteriores lo desmienten dada su baja especificidad (36). La elevada expresión en nuestra serie, con positivities relativamente elevadas (intensidad 3 fundamentalmente) y difusas (entre el 60 y 80% del tumor), apoyaría al papel oncogénico de la sobreexpresión de FLI1. No obstante existen casos como 7, 10 y 13 en que la expresión es inferior al 50%, hecho a tener en cuenta en el diagnóstico diario de los SE si

130

utilizamos este marcador. Debido a la complicada red de señales que llevan a la regulación transcripcional de FLI1 (200), es posible que algunas de ellas tengan especial relevancia en los frecuentes casos de SE con FLI1 sobreexpresado.

La expresión de HNK1 fundamentalmente citoplásmica y en refuerzo de Golgi, suele estar presente en el SE y es equiparable a la de FLI1; siendo elevada aunque heterogénea dentro del tumor. Expresiones similares se han demostrado también en series largas, entorno al 53% de positividad para HNK1 y 89% para FLI1 en la serie de A.Llombart-Bosch (3) (con 415 SE genéticamente confirmados) y 94% de FLI1 en la serie de AL Folpe et al (50). Se ha descrito que HNK1 actúa como supresor tumoral en astrocitomas, reduciendo la migración y la activación de señales mitogénicas (201). No obstante, no se ha asociado la expresión de HNK1 a pronóstico en SE y tampoco es específica, habiéndose descrito en otros casos de TCRA, motivo por el que pensamos que su aplicación al diagnóstico no es todo lo robusto que se pensaba inicialmente.

Todos los casos a excepción de uno (caso 14), presentaron positividad elevada a la caveolina (superior al 60%; siendo la mayoría superior al 80%), sin existir diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos morfológicos, ni variaciones a lo largo de los pases. Nuestros resultados confirman los de otras grandes series anteriormente citadas, sin ser exclusiva su expresión de estos tumores, pudiendo presentarse en otros sarcomas (202) y carcinomas como el carcinoma de esófago (38) o el carcinoma de pulmón (39). No obstante, su expresión dentro del grupo de los TCRA es elevada, siendo mayor que en otros casos, como neuroblastomas, sarcomas sinoviales indiferenciados, condrosarcomas y osteosarcomas.

El gen que la codifica *CAV1* ha sido descrito anteriormente como uno de estos genes diana en el SE, implicado en la promoción de la

proliferación celular (41), la angiogénesis (42), la aparición de metástasis (43) y de resistencia a la quimioterapia (44). En nuestra serie no hemos visto una mayor expresión en los casos metastásicos, ni en la metástasis con respecto a su tumor original.

Nuestros resultados identifican a caveolina, junto a CD99, como los marcadores más sensibles y específicos de SE, coincidiendo también con series más amplias descritas en la literatura (3). Es por tanto la combinación de estos 4 marcadores (CD99, FLI1, HNK1 y CAV1) los que confieren positividad en el 99% de los casos y permiten realizar una aproximación diagnóstica fiable.

Nuestros casos presentan una positividad baja a la ezrina, con la excepción de los casos 2 y 16 que presentaron positividad del 40 y 50%, respectivamente. El 45% de los casos han resultado completamente negativos y el 40% con positividad en menos del 10% de las células. Resultado que se correlaciona con lo que ha sido descrito en la literatura y que permite el diagnóstico diferencial con otros sarcomas de similar localización (como los osteosarcomas) y que en ocasiones pueden presentar morfología de células redondas (67).

Ninguno de nuestros casos ha presentado positividad para ERG utilizando el clon 9FY, que detecta la porción N-terminal. Este clon ha demostrado mayor especificidad para aquellos casos en los que existe la fusión *EWSR1-ERG*, con menor porcentaje de positividad en aquellos casos con la fusión *EWSR1-FLI1* (27).

Los TFSE pueden expresar marcadores epiteliales hasta en un 20-30% de los casos, aunque no han sido relacionados con un valor pronóstico y conocerlo resultaría de utilidad para realizar un adecuado diagnóstico. Revisando las series publicadas, los porcentajes varían entre el 20% de Gu et al, el 31,7% de Collini et al, el 35,7% de Folpe y el 39% de Elbasher SH et al. La diferencia radica en el anticuerpo utilizado y en el

clon; siendo la más frecuente CKAE1-AE3 y en menor proporción EMA. En nuestra serie, los casos han presentado una positividad que es acorde a lo anteriormente publicado. Hemos añadido marcadores más actuales como son la ocludina y la desmoplaquina, que han sido relacionados con la interacción del epitelio (en este caso de las células neoplásicas) con el mesénquima (el estroma circundante). En nuestra serie, los casos han resultado negativos, algo que contradice los resultados de series amplias como la de nuestro grupo (3), en que no sólo fueron positivos sino que se relacionaban con aquellos casos diseminados en el momento del diagnóstico. Esta ausencia de expresión podría ser explicada por la diferente interacción entre el tumor y el estroma, que en caso de la serie amplia era humano y en la nuestra, animal. Este resultado necesita de series más amplias en xenotransplantes para ser confirmado.

En cuanto a la diferenciación neural, es evidente aunque no exclusiva en los PNET, debido a la formación de rosetas así como a la expresión de determinados marcadores de estirpe neural como la proteína S100, pudiendo ser positiva en los TFSE, en los tumores condrales indiferenciados y en el liposarcoma de células redondas. Otros marcadores como el SOX9, descrito en los primeros, permitiría diferenciarlos. La expresión de S100 es aunque irregularmente distribuida, más frecuentemente observada en los liposarcomas de células redondas. La utilización de otras técnicas, como el PAS o moleculares, pueden resultar de gran ayuda para distinguir este tipo de tumores.

5.5.- Estudio de la expresión de marcadores biológicos y vías de señalización relevantes en el SE.

Debido a que nuestra serie es limitada, desde un punto de vista de utilidad práctica hemos preferido comentar cada uno de estos marcadores en los siguientes apartados.

5.6.- Evaluar las diferencias de expresión de biomarcadores entre tumores inicialmente localizados y metastásicos para detectar posibles diferencias fenotípicas que justifiquen una distinta agresividad clínica entre ambos.

Hemos observado en los resultados que de todos los marcadores evaluados, sólo el SA2 se expresa de una forma significativamente menor en los tumores con debut metastásico que en los inicialmente localizados.

SA2

SA2 es una proteína del grupo de las cohesinas que participa en la separación de los centrómeros (117), de tal forma que su inactivación provoca aneuploidía en el cáncer humano (118) y un peor comportamiento clínico, tal y como se ha observado en el cáncer de mama (119) y en el sarcoma de Ewing (120). El grupo de Brohl revela que la ausencia de expresión de SA2 se correlaciona con la mutación del gen, hecho que ocurre fundamentalmente en tumores de estadios avanzados. Es interesante observar cómo en nuestros casos la expresión ha sido inferior en los casos que clínicamente tenían peor pronóstico, los casos inicialmente metastásicos. Al añadir la casuística del grupo de Savola en el estudio *in silico*, se observa una mayor supervivencia global y libre de progresión en aquellos casos con mayor expresión de SA2, lo que orienta a su valor predictivo de peor pronóstico clínico en caso de pérdida de expresión, apoyando su actividad biológica como supresor tumoral.

Determinar su expresión en la práctica clínica diaria podría resultar de interés para determinar qué casos van a ser negativos y por tanto presentar un peor pronóstico clínico.

Las expresiones de PARP1 y SIRT1 han sido diferentes pero no significativas en los distintos grupos clínicos, aunque sí resultaron significativas en el estudio *in silico*. El primero ha mostrado una expresión superior en las metástasis, mientras que SIRT1 ha sido menos expresado en este grupo.

P53 no ha resultado estadísticamente significativo al añadir la serie de Savola, por lo que nuestros resultados deben considerarse con cautela por ser una serie limitada. No obstante, no es de extrañar que la apoptosis esté alterada en los casos clínicamente más agresivos, con un peor funcionamiento de p53 y una mayor expresión de PARP1. Esta alteración de la vía apoptótica se debe a una hipersensibilidad a los complejos ADN-PARP que impiden a la célula entrar en apoptosis, no a un defecto de reparación del ADN tal y como definió Gill S (111).

PARP1

Nuestros casos han demostrado altos niveles de expresión de PARP1, algo que era esperable dado que todos presentan la fusión EWSR1-FLI1 (110). Hasta el momento se habían estudiado los mecanismos de actuación de los inhibidores de PARP (PARP1i), su acción *in vitro* e *in vivo* (112) pero no su expresión en el tiempo o su cambio de expresión en la evolución del tumor. Es importante conocer cuándo dicha expresión está presente, para prever si estos inhibidores serán efectivos o no. En nuestra serie se ha observado una mayor expresión en los casos inicialmente metastásicos con respecto a los originalmente localizados, sin ser esta diferencia estadísticamente significativa, pero sí al añadir los casos de la serie de Savola. Es interesante conocer la expresión de PARP ya que las células que expresan estas proteínas quiméricas muestran un

reducido crecimiento cuando son tratadas con Olaparib (potente inhibidor de PARP1 y PARP2). Existe un aumento de roturas de ADN en los TFSE debido a la fusión EWSR1-FLI1, algo que se potencia utilizando los inhibidores de PARP, reduciendo así la supervivencia celular y por tanto, el crecimiento celular y la capacidad de invasión y metástasis de dichas células. Olaparib asociado a la quimioterapia convencional utilizada en el SE, como la temozolomida, reduce significativamente el crecimiento tumoral in vitro frente a cualquiera de los dos de forma aislada (112). De hecho, este tratamiento ha sido ya utilizado en segunda línea en casos altamente agresivos demostrándose como potenciador del efecto de la quimioterapia aislada (114). Recientemente, los estudios preclínicos de olaparib combinado con irinotecan o con temozolomida en SE han mostrado ser altamente sinérgicos, abriendo la posibilidad de su uso en tratamientos más efectivos en SE (112, 203). En la actualidad hay un ensayo clínico fase I abierto para el tratamiento de SE con olaparib y temozolomida o irinotecan (NCT01858168), un fase II para muchos tumores pediátricos incluyendo SE (NCT03233204) y un fase I para SE en recaída con Niraparib (NCT02044120), otro inhibidor de PARP que presenta mayor sinergismo combinado con irinotecan o temozolomida.

p53

No podemos asumir que exista una mutación asociada al aumento de expresión de p53 sin estudiar su estado mutacional, porque tal y como se ha demostrado, no existe correlación entre la sobreexpresión detectada por inmunohistoquímica y el estado mutacional del gen (126). Son numerosas las vías de inactivación de este gen supresor tumoral, por mutaciones en línea germinal (204), mutaciones puntuales adquiridas (205). También se ha descrito la pérdida de función sin mutación debido al control negativo de reguladores de la proteína p53, como la amplificación de *MDM2* (206), o incluso por la pérdida de control de *MDM2*, debido la

pérdida de expresión de p14ARF por delección o silenciamiento de su locus genético *CDKN2A*, un inhibidor del eje p53-MDM2 (207).

Así mismo, las alteraciones de *TP53* no se consideran un marcador pronóstico estable, dado que los resultados en las series han sido contradictorios (58, 125, 130, 132); no demostrándose diferencias significativas en las grandes series, entre presencia o no de mutación y evolución clínica adversa (58, 130, 132). Se ha observado mayor expresión de p53 en los PNET que en el resto de subtipos morfológicos de los TFSE (132), hallazgos no relacionados con un peor comportamiento clínico. En nuestra serie, también la mayor expresión se ha observado en los PNET, sin existir diferencias estadísticamente significativas, ya que sólo uno (caso 8) de los 3 (casos 8-10) presenta una expresión superior al 50%, siendo el resto negativos. No existe tampoco relación con un peor comportamiento clínico porque el caso 8 es de los inicialmente localizados. El grupo de los inicialmente metastásicos (casos 6, 7 y 16) muestran, por otra parte expresión baja y variable; 5%, 15% y 0% respectivamente, aunque discretamente superior a los localizados inicialmente, sin ser estos resultados estadísticamente significativos. Es interesante el resultado en el caso 5 que es negativo, mientras que en el 6, su metástasis, es positivo. Aunque sea un bajo porcentaje (5%) puede hipotetizarse que se trata de un evento no inicial en la oncogénesis del SE, aunque sí podría ser de interés en su evolución.

El estudio *in silico* de la expresión de TP53 tampoco reveló diferencias significativas entre tumores primarios y metastásicos, ni tampoco como valor pronóstico en supervivencia libre de progresión, ni global, por lo que la mayor tendencia de sobreexpresión que observamos en tumores metastásicos no es significativa o simplemente las diferencias

observadas inmunohistoquímicamente (sobrexpresión de proteína) no se corresponden a diferencias en la expresión de mRNA de TP53.

Ki67

El estudio del índice proliferativo (Ki67) no ha demostrado diferencias estadísticamente significativas entre casos localizados y metastásicos nuestra serie. En cambio cuando se ha analizado el Ki67 mediante un modelo de regresión beta mixto, considerando todos los pases en los xenotrasplantes, agrupados por debuts clínicos sí se observa un índice mayor en los casos metastásicos que en los localizados. Este resultado apoyaría a que estos tumores de debut clínico localizado son biológicamente menos agresivos y con menor capacidad replicativa. Sería necesaria una serie más amplia para poder determinar un valor de corte que permita predecir el comportamiento clínico, porque su valor pronóstico ya ha sido demostrado (132). En nuestra serie no ha sido posible extraer dicho punto de corte, ya que tenemos casos inicialmente localizados con Ki67 elevados (caso 12 con un 90% de expresión) y casos metastásicos con Ki67 bajos (caso 16 con un 20% de expresión).

No obstante, sí se han visto diferencias estadísticamente significativas entre los subtipos morfológicos, algo que no había sido estudiado con anterioridad. Los SE atípicos presentan porcentajes de expresión de Ki67 más elevados, sin ser significativamente superiores a los de los clásicos; en cambio, sí a los PNET, que presentan los porcentajes más bajos de expresión. No obstante es la morfología y no el porcentaje de expresión el que nos hará decidimos por un diagnóstico y no otro.

Son necesarias series más amplias para confirmar estos resultados y establecer un valor de corte del Ki67 que separe un grupo que clínicamente vaya a ir bien, de otro que no. De momento, el Ki67 no ha logrado sustituir al contaje de mitosis por 10 campos en la práctica diaria,

ni en las clasificaciones, ni en las gradaciones internacionales. No obstante, resulta orientativo y de utilidad en el diagnóstico de los tumores (128).

En los TFSE se ha descrito una expresión variable e irregular según las series (132, 133), siendo un factor pronóstico independiente en la serie de López-Guerrero, concretamente en los casos de SE inicialmente localizado, con una mayor supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG).

5.7.- Evaluar el cambio de expresión de los marcadores en los pases.

En 4 de los marcadores la evolución de los pases es estadísticamente significativa: BRAF, HES1, pmTOR e YB1, tal y como hemos visto en resultados (página 101), aunque sólo en el caso de YB1 era el cambio lo suficientemente grande como para ser considerado.

YB1

En los sarcomas se ha demostrado que la expresión de YB-1, tanto en cultivos celulares como en xenotrasplantes, se relaciona con una mayor capacidad metastásica (144). En nuestra serie se ha observado también una mayor expresión de YB1 en el caso 6 (la metástasis) que en el 5 (el original). No obstante no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tumores inicialmente localizados y los metastásicos, con casos de expresión muy marcada y negativos en ambos grupos,. Al añadir la casuística del grupo de Savola, sí se observa una relación de la expresión de YB-1 a peor pronóstico (Gráfico 13).

Es interesante observar cómo la expresión es en nuestra serie o muy elevada o negativa totalmente, sin que se haya podido relacionar ni con la SG, ni SLE, ni con el número de pases. Adicionalmente hemos observado una reducción en la expresión a lo largo de los pases sin llegar a ser negativa en ningún momento.

BRAF

Nuestros casos no muestran apenas expresión de BRAF, con ningún caso de positividad moderada o intensa. La expresión de BRAF en los sarcomas se ha estimado baja (208), sin observarse diferencias significativas ni entre los subtipos clínicos (166), ni morfológicos (según resultados en nuestra serie). El único grupo que ha estudiado esta expresión por inmunohistoquímica, Ahmed y colaboradores (166) muestra un resultado similar en su serie, con una positividad moderada en el 3% de los casos y débil y aislada en un 68%. En nuestros casos la positividad ocasional definida como 1 está presente en el 40% de los casos, un porcentaje inferior al de su serie y no se han observado diferencias estadísticamente significativas ni entre debuts clínicos distintos, ni en subtipos morfológicos distintos. Este hecho orienta a que la expresión de BRAF no es útil en el diagnóstico, ni como predictor de comportamiento clínico; aunque sí podría ser interesante su determinación en la evolución del sarcoma, en recidivas y metástasis, porque en nuestra serie además del aumento con los pases, hemos visto un discreto aumento de la expresión en el caso 6 con respecto a la expresión en el tumor original. No obstante es tan baja que deberíamos comprobar si realmente dicha expresión traduce una mutación en el exón V600E del gen *BRAF* y en caso de haberla, sería susceptible de ser tratado con inhibidores que como el melanoma, presenta unos resultados prometedores. Estos resultados deben ser estudiados en series más amplias para confirmar si la mayor

expresión es real en las metástasis y puede adquirirse la mutación de BRAF como evento secundario, porque supondría un avance en el tratamiento del SE. Es interesante también el aumento de expresión a lo largo de los pases, pero de nuevo, la serie estudiada es reducida. Desconocemos si pudiera estar relacionada con la aparición de mutación V600E caracterizada en otro tipo de tumores como melanoma. La sobreexpresión de BRAF pudiera ser un mecanismo alternativo a la mutación que igualmente conllevaría la activación constitutiva de las MAPK.

5.8.- Detectar cambios en el fenotipo de un tumor con respecto a su metástasis.

Se han comparado la expresión de los distintos marcadores entre el caso 5 (tumor primario) y 6 (metástasis) procedentes del mismo paciente, con el fin de detectar cambios de expresión en alguno de ellos. Como sólo disponemos de una muestra pareada con diferente número de pases, 20 en el original y 40 en la metástasis, se ha corregido la aleatoriedad que esto pudiera generar, tal y cómo se ha explicado en el apartado de material y métodos. Aunque las conclusiones no son extrapolables a los TFSE por tratarse de una única muestra pareada, sí se han encontrado cambios en el fenotipo del tumor.

Nuestros resultados revelan la diferente expresión de los marcadores, tanto en el tumor original como en la metástasis (gráfico 4). De todos ellos, sólo pmTOR se expresa menos en la metástasis que en el tumor primario de forma estadísticamente significativa. Esta expresión diferencial ha sido relacionada con un peor pronóstico (85) sin observarse cambios significativos en la expresión de pAKT. Estos resultados aparentemente contradictorios pueden ser justificados por el hecho que

AKT tiene un efecto pleiotrópico en la célula e interviene en numerosas vías de señales además de la fosforilación directa de pmTOR. Alternativamente, mTOR forma parte de dos complejos distintos: TORC2 por encima de AKT y TORC1 por debajo. Este resultado apoya lo que ya ha sido descrito en la literatura (85) que existen vías que activan mTOR en el complejo TORC1 por debajo de AKT, mediante la kinasa p70S6 que es la que realmente determina la agresividad de la vía.

Resulta interesante la reducción de expresión en SA2 que cómo hemos revisado con anterioridad está asociado a un peor pronóstico. Otro resultado igualmente interesante es la pérdida de expresión de SIRT1, junto a un aumento de expresión en p53. Teniendo en cuenta que SIRT1 desacetila a p53 su pérdida de acción podría justificar una activación de p53. Otras proteínas como HES y FOXO1 muestran una pequeña reducción en su expresión, no han resultado estadísticamente significativos.

ERBB4

Al igual que con BRAF, observamos que la expresión de ERBB4 pasa de un predominio de 0 en el tumor primario a una expresión entorno al 10%, en la metástasis. Este hallazgo es concordante con la literatura en la que se ha demostrado que la activación de la tirosina quinasa ERBB4 suprime anoikis, evitando la muerte celular, e induciendo quimiorresistencia in vitro (96), a la vez que existe sobreexpresión en líneas celulares derivadas de SE metastásicos (97).

ERBB4 aumenta, por tanto la invasión tumoral y la metástasis in vivo, a la vez que se correlaciona significativamente con la reducción en la supervivencia libre de enfermedad. Hallazgos que confieren una nueva opción terapéutica en el SE bloqueando la vía ERBB4-PI3K-Akt-FAK-Rac1 asociada a enfermedad agresiva en ES (97).

Así mismo dicha expresión de ERBB4 se ha correlacionado con la histología de los tumores neuroblásticos y su sobreexpresión a enfermedad metastásica (209).

Las principales moléculas implicadas en el mecanismo anti-apoptosis en los TFSE son CD117, factor de células madres (SCF), CD95 (FAS), CD95L (FASL), **BCL2**, **caspasa8** y el receptor del factor de crecimiento insulínico (IGF1R).

BCL2

En los SE puede existir expresión de BCL2 (57). En nuestra serie 11 de los 16 casos han demostrado expresión en proporciones muy variables, hecho a tener en cuenta para el diagnóstico diferencial de los SE con otros sarcomas de células redondas, como el sarcoma sinovial, que sí la expresan o el rhabdomyosarcoma, que no la suele expresar. En nuestra serie existe mayor expresión en los SE atípicos que en los clásicos y los PNET, hallazgo que no había sido descrito hasta la fecha. Dicha expresión más allá de tenerla en cuenta para un adecuado diagnóstico, está en relación al papel que ocupa el gen *BCL2* en la biología del tumor. BCL2 se ha descrito como un gen clave en el sarcoma de Ewing, que interviene en la apoptosis y se ve alterado por multitud de fragmentos no codificantes de ARN. Tal y como describe Parafioriti *et al* (145) es una potencial diana terapéutica clave en la proliferación celular tumoral y en la respuesta al tratamiento quimioterápico. De los 58 miRNAs deregulados en el SE, 8 interferían con la expresión de BCL2. Entre estos miRNA son mi181b y Let7 los más expresados en Ewing, con más de un 90% de los casos positivos, por lo que sería interesante conocer su expresión para el tratamiento.

En condiciones normales BCL2 bloquea la vía intrínseca de la apoptosis, uniéndose e inhibiendo proteínas proapoptóticas que facilitan la apertura de poros mitocondriales, como son BAX, BAK, BID, BAD, BIM,

BIK, BLK y PUMA (55). El equilibrio de estas interacciones modula la permeabilidad de la membrana mitocondrial facilitando o inhibiendo la apoptosis. En condiciones de estrés celular o daño al ADN, la sobreexpresión de BAX por TP53 desplaza el equilibrio hacia la apoptosis (56). En diversos tumores como el sarcoma de Ewing, la sobreexpresión de BCL2 reduce la permeabilidad de la membrana mitocondrial, inhibe la apoptosis y las células sobreviven y crecen descontroladamente (57).

Las formas en que se puede alterar la expresión de BCL2 son variables, una de ellas es mediante la expresión aberrante de diversos miRNA, producto de la presencia de alteraciones cromosómicas, o mediante el efecto de la propia quimioterapia y radioterapia, una de las explicaciones posibles, de por qué se generan resistencias al tratamiento. Es interesante ver cómo en nuestra casuística BCL2 no se expresa en el tumor original, pero sí en cambio en la metástasis que sucede a tiempo posterior.

Caspasa 8

El receptor de muerte celular DR5 en cuya vía está implicada la caspasa 8 ha sido descrito como una posible diana terapéutica en los TFSE (66). Los autores demostraron que utilizando un agonista de DR5 (conatumumab) inducían la apoptosis in vitro, en cultivos celulares de células de SE. De igual modo demostraron que se reducía la formación de tumores y se mejoraba la supervivencia al inocular líneas celulares sensibles a dicho tratamiento. Esta sensibilidad estaba relacionada con la expresión de caspasa 8, de forma que la línea celular KAD era la que más expresaba caspasa 8 y también la más sensible; no así en cambio la línea celular A4573, que no expresaba a penas caspasa 8 y fue la más resistente al tratamiento. Es esencial por tanto para utilizar el tratamiento con conatumumab. conocer la expresión de caspasa 8; sino podríamos estar añadiendo un tratamiento que aunque seguro, no es inocuo a unos

inmunotransferencia, con resultados comparables a los anteriormente citados del estudio inmunohistoquímico, lo que afianza la validez del estudio inmunohistoquímico. No se obtuvieron diferencias significativas en la expresión de cKIT ni en tumores primarios ni en metastásicos, ni tampoco se pudo relacionar con la supervivencia, tal y como hemos observado en nuestra serie, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Otros autores como Ahmed et al, también estudiaron la expresión de dianas terapéuticas en 72 TFSE. Realizaron IHC de mTOR, VEGF, pAKT, NFκβ y BRAF. En su estudio no se demostró relación con la supervivencia, ni con la localización clínica de la neoplasia, a excepción de VEGF. Los bajos niveles de expresión de VEGF se relacionaron con un mejor pronóstico. Los autores encontraron baja expresión de mTOR (en un 37% de los casos), siendo significativamente menor en aquellos casos cuya translocación era *EWSR1-ERG*, respecto a *EWSR1-FLI1*, algo que no podemos comprobar, dado que todos nuestros casos presentan esta última. En nuestros casos los porcentajes de expresión de PNET muestran menor expresión que los SE convencionales y atípicos. Aunque sería necesario un mayor número de casos para comprobarlo. Así mismo, se ha observado una pérdida de expresión a lo largo de los pases en todos los subtipos. Esta pérdida de expresión está en concordancia con lo que ha sido anteriormente descrito dado que a mayor expresión de mTOR mejor pronóstico (85).

La expresión de pAKT en la serie de Ahmed et al fue del 86%, mientras que en nuestro caso fue de 55%, sin observarse variación de expresión a lo largo de los pases en los animales, pero sí de entre los subtipos morfológicos, siendo significativamente menor la expresión en los PNET que en los SE convencionales y los atípicos.

NFκB fue expresado en el 55% de los casos de la serie de Ahmed et al, mientras que en nuestra serie la expresión nuclear es negativa. En sus casos no se observó relación con la supervivencia, pero sí con una localización clínica definida como de mayor agresividad, la pélvica.

LSD1

LSD1 es una histona desmetilasa que forma parte de complejos con actividad histona deacetilasa, por lo que es una proteína crítica en la regulación epigenética de la expresión de genes, así como en la migración, invasión y diferenciación celulares (revisado en Thinnes et al., *Biochim Biophys Acta*. 2014 Dec; 1839(12): 1416–1432). Se han identificado inhibidores de LSD1 que podrían actuar como potenciales dianas terapéuticas como HCI-2509 y otros que actúan deacetilando (Vorinostat, Romidepsin) pero con peores resultados que el anterior. HCI-2509 tiene una notable eficacia y tolerabilidad como monoterapia *in vivo* y en SE se ha visto que bloquea la actividad transcripcional de las proteínas de fusión *EWSR1-FLI* y *EWSR1-ERG* y consecuentemente, la tumorigénesis (Sankar S, Theisen ER, Bearss J, Mulvihill T, Hoffman LM, Sorna V, Beckerle MC, Sharma S, Lessnick SL. Reversible LSD1 inhibition interferes with global EWS/ETS transcriptional activity and impedes Ewing sarcoma tumor growth. *Clin Cancer Res*. 2014; 20: 4584-97. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0072.). Aunque nuestros resultados no muestran cambios significativos en los niveles de expresión de LSD1 que se asocian a variables clínicas o a cambios de expresión en los sucesivos pasajes de los xenoinjertos, su intensa expresión en más del 50% de los casos y su validación en nuestro estudio *in silico* apoyan que su sobreexpresión es un mecanismo frecuente en SE para alterar la epigenética del tumor y por tanto, inhibidores como HCI-2509 podrían constituir un tratamiento eficaz alternativo a la terapia convencional en caso de recaída.

5.9.- Validación in silico de marcadores diferencialmente expresados en distintas formas clínicas de SE o con variación a lo largo de los pases.

Los estudios realizados en la presente tesis doctoral han permitido establecer una plataforma PDX en SE, idónea para la identificación y validación de biomarcadores pronóstico o útiles para el tratamiento personalizado del SE. Los biomarcadores que hemos encontrado con mayor valor potencial pronóstico y terapéutico son Ki67, BCL2, Caspasa 8, PARP1, YB-1, ERBB4 y LSD1. No hemos podido validar *in silico* otros biomarcadores como pAKT y pmTOR por tratarse de modificaciones postraduccionales que ocurren posterior a la síntesis del mRNA. Adicionalmente, hemos demostrado que el número de pases no altera las características inmunohistológicas ni morfológicas del tumor inicial, por lo que los modelos PDX constituyen una herramienta muy útil para el futuro tratamiento personalizado de estos tumores. La combinación de las plataformas PDX con cohortes externas más amplias, tanto prospectivas como las disponibles actualmente *in silico*, permiten estudios de biomarcadores y su posterior validación constituyendo una aproximación experimental integrada con gran proyección de futuro en el ámbito del descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas con valor pronóstico y de la implementación de la medicina de precisión.

Un motivo del mayor rango de detección en la expresión de Caspasa 8 mediante el estudio *in silico* con arrays es la mayor sensibilidad de la detección del mRNA frente a la inmunohistoquímica con anticuerpos. Se define como Ki67 de alta expresión a partir de lo que el programa de forma automática considera alta expresión de Ki67 en mRNA.

Este hallazgo junto con nuestros resultados que revelan el aumento de la expresión de PARP1 con los pases indica que la actividad de PARP tiene un doble papel en el cáncer, actuando como una barrera contra la tumorigénesis (presumiblemente al contribuir a la preservación de la estabilidad del genoma) y promoviendo la supervivencia una vez que los tumores se han establecido.

6. CONCLUSIONES

1. Los PDX en ratones atímicos constituyen un modelo experimental adecuado y útil para el estudio de la heterogeneidad biológica de los sarcomas de Ewing.
2. Confirmamos que la vía de inoculación tumoral subcutánea en el ratón atímico resulta inadecuada para el estudio de las metástasis.
3. La biología de estos tumores en los xenotrasplantes es similar, con un primer pase más lento, una velocidad de crecimiento constante y un último pase en que se altera dicho patrón estable, siendo la velocidad de crecimiento más lenta.
4. La morfología de los tumores se mantiene estable en el transcurso de los sucesivos pases, sin observarse cambios histológicos significativos en los mismos.
5. Existe heterogeneidad en la expresión proteica en el SE, evidenciada a través de los marcadores inmunohistoquímicos a lo largo de los pases y en el original con respecto a su metástasis.
6. CD99 y Caveolina han resultado ser los marcadores inmunohistoquímicos más sensibles, y estables para el diagnóstico de SE, en nuestra serie. .,
7. Los SE, pueden expresar ocasionalmente, inmunomarcadores epiteliales, como CKAE1-E3 y EMA, fundamentalmente aquellos con histología atípica.

8. Los biomarcadores con mayor valor potencial pronóstico son Ki67, BCL2, Caspasa 8, PARP1, YB-1, ERBB4 y LSD1.
9. La expresión inmunohistoquímica de SA2 es intensa en los tumores localizados, y menor en los inicialmente metastásicos, lo que sugiere una mayor malignidad asociada a la pérdida de dicha expresión.
10. Existe en nuestra serie mayor expresión de pmTOR en el tumor original que en su metástasis, pero no de pAKT, sugiriendo que aunque ambos forman parte de la misma ruta troncal de señales, no tienen estrictamente los mismos activadores o efectores.
11. Los estudios *in silico* han permitido validar la casuística utilizada en xenotransplantes, haciendo significativos aquellos resultados que no lo habían sido en una serie más limitada.
12. La presente experiencia demuestra la existencia de variaciones en la expresión inmunofenotípica del SE sin que ello ocurra a nivel histológico que podrían justificar su desigual evolución en cada paciente e irregular respuesta al tratamiento estándar, por lo que cada caso debe ser tratado individualmente.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Fletcher CDM, World Health Organization., International Agency for Research on Cancer. WHO classification of tumours of soft tissue and bone. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2013.
2. Goldblum JR, Folpe AL, Weiss SW, Enzinger FM, Weiss SW. Enzinger and Weiss's soft tissue tumors. 6th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2014.
3. 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. *Virchows Archiv : an international journal of pathology.* 2009;455:397-411.
4. Llombart - Bosch A, Blache R, Peydro - Olaya A. Ultrastructural study of 28 cases of Ewing's sarcoma: Typical and atypical forms. *Cancer.* 1978;41:1362-73.
5. Angervall L, Enzinger FM. Extraskeletal neoplasm resembling Ewing's sarcoma. *Cancer.* 1975;36:240-51.
6. Machado I, Noguera R, Mateos EA, Calabuig-Farinas S, Lopez FI, Martinez A, et al. The many faces of atypical Ewing's sarcoma. A true entity mimicking sarcomas, carcinomas and lymphomas. *Virchows Archiv : an international journal of pathology.* 2011;458:281-90.
7. Llombart-Bosch A, Peydro-Olaya A, Gomar F. Ultrastructure of one Ewing's Sarcoma of Bone with Endothelial Character and a Comparative Review of the Vessels in 27 Cases of Typical Ewing's Sarcoma. *Pathology - Research and Practice.* 1980;167:71-87.
8. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature.* 1992;359:162-5.
9. Ginsberg JP, de Alava E, Ladanyi M, Wexler LH, Kovar H, Paulussen M, et al. EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 1999;17:1809-14.
10. Jeon IS, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT, et al. A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene.* 1995;10:1229-34.
11. Kaneko Y, Yoshida K, Handa M, Toyoda Y, Nishihira H, Tanaka Y, et al. Fusion of an ETS-family gene, EIAF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes, chromosomes & cancer.* 1996;15:115-21.
12. Peter M, Couturier J, Pacquement H, Michon J, Thomas G, Magdelenat H, et al. A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. *Oncogene.* 1997;14:1159-64.

13. Mastrangelo T, Modena P, Tornielli S, Bullrich F, Testi MA, Mezzelani A, et al. A novel zinc finger gene is fused to EWS in small round cell tumor. *Oncogene*. 2000;19:3799-804.
14. Sumegi J, Nishio J, Nelson M, Frayer RW, Perry D, Bridge JA. A novel t(4;22)(q31;q12) produces an EWSR1-SMARCA5 fusion in extraskeletal Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2011;24:333-42.
15. Szuhai K, Ijszenga M, de Jong D, Karseladze A, Tanke HJ, Hogendoorn PC. The NFATc2 gene is involved in a novel cloned translocation in a Ewing sarcoma variant that couples its function in immunology to oncology. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15:2259-68.
16. Wang L, Bhargava R, Zheng T, Wexler L, Collins MH, Roulston D, et al. Undifferentiated small round cell sarcomas with rare EWS gene fusions: identification of a novel EWS-SP3 fusion and of additional cases with the EWS-ETV1 and EWS-FEV fusions. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2007;9:498-509.
17. Berg T, Kalsaas AH, Buechner J, Busund LT. Ewing sarcoma-peripheral neuroectodermal tumor of the kidney with a FUS-ERG fusion transcript. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2009;194:53-7.
18. Chen S, Deniz K, Sung YS, Zhang L, Dry S, Antonescu CR. Ewing sarcoma with ERG gene rearrangements: A molecular study focusing on the prevalence of FUS-ERG and common pitfalls in detecting EWSR1-ERG fusions by FISH. *Genes, chromosomes & cancer*. 2016;55:340-9.
19. Ng TL, O'Sullivan MJ, Pallen CJ, Hayes M, Clarkson PW, Winstanley M, et al. Ewing sarcoma with novel translocation t(2;16) producing an in-frame fusion of FUS and FEV. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2007;9:459-63.
20. Postel-Vinay S, Veron AS, Tirode F, Pierron G, Reynaud S, Kovar H, et al. Common variants near TARDBP and EGR2 are associated with susceptibility to Ewing sarcoma. *Nature genetics*. 2012;44:323-7.
21. Shing DC, McMullan DJ, Roberts P, Smith K, Chin SF, Nicholson J, et al. FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors. *Cancer research*. 2003;63:4568-76.
22. Specht K, Sung YS, Zhang L, Richter GH, Fletcher CD, Antonescu CR. Distinct transcriptional signature and immunoprofile of CIC-DUX4 fusion-positive round cell tumors compared to EWSR1-rearranged Ewing sarcomas: further evidence toward distinct pathologic entities. *Genes, chromosomes & cancer*. 2014;53:622-33.
23. Antonescu C. Round cell sarcomas beyond Ewing: emerging entities. *Histopathology*. 2014;64:26-37.

24. Specht K, Zhang L, Sung YS, Nucci M, Dry S, Vaiyapuri S, et al. Novel BCOR-MAML3 and ZC3H7B-BCOR Gene Fusions in Undifferentiated Small Blue Round Cell Sarcomas. *The American journal of surgical pathology*. 2016;40:433-42.
25. Peydro-Olaya A L-BA, Carda-Batalla C, Lopez-Guerrero JA. . Electron microscopy and other ancillary techniques in the diagnosis of small round cell tumors. . *Semin Diagn Pathol*. 2003;20:25-45.
26. Miettinen M, Lehto VP, Virtanen I. Histogenesis of Ewing's sarcoma. An evaluation of intermediate filaments and endothelial cell markers. *Virchows Archiv B, Cell pathology including molecular pathology*. 1982;41:277-84.
27. Machado I, Mayordomo-Aranda E, Scotlandi K, Picci P, Llombart-Bosch A. Immunoreactivity using anti-ERG monoclonal antibodies in sarcomas is influenced by clone selection. *Pathology, research and practice*. 2014;210:508-13.
28. Fellingner EJ, Garin-Chesa P, Glasser DB, Huvos AG, Rettig WJ. Comparison of cell surface antigen HBA71 (p30/32MIC2), neuron-specific enolase, and vimentin in the immunohistochemical analysis of Ewing's sarcoma of bone. *The American journal of surgical pathology*. 1992;16:746-55.
29. Llombart-Bosch A, Contesso G, Peydro-Olaya A. Histology, immunohistochemistry, and electron microscopy of small round cell tumors of bone. *Semin Diagn Pathol*. 1996;13:153-70.
30. Bakhshi S, Singh P, Thulkar S. Bone involvement in pediatric non-Hodgkin's lymphomas. *Hematology*. 2008;13:348-51.
31. Noguera R, Navarro S, Cremades A, Rosello-Sastre E, Pellin A, Peydro-Olaya A, et al. Translocation (X;18) in a biphasic synovial sarcoma with morphologic features of neural differentiation. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 1998;7:16-23.
32. Ayala AG, Ro JY, Raymond AK, Jaffe N, Chawla S, Carrasco H, et al. Small cell osteosarcoma. A clinicopathologic study of 27 cases. *Cancer*. 1989;64:2162-73.
33. Machado I, Navarro L, Pellin A, Navarro S, Agaimy A, Tardio JC, et al. Defining Ewing and Ewing-like small round cell tumors (SRCT): The need for molecular techniques in their categorization and differential diagnosis. A study of 200 cases. *Annals of diagnostic pathology*. 2016;22:25-32.
34. Hamilton G, Mallinger R, Hofbauer S, Havel M. The monoclonal HBA-71 antibody modulates proliferation of thymocytes and Ewing's sarcoma cells by interfering with the action of insulin-like growth factor I. *Thymus*. 1991;18:33-41.
35. Guerzoni C, Fiori V, Terracciano M, Manara MC, Moricoli D, Pasello M, et al. CD99 triggering in Ewing sarcoma delivers a lethal signal through p53

- pathway reactivation and cooperates with doxorubicin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21:146-56.
36. Folpe AL, Hill CE, Parham DM, O'Shea PA, Weiss SW. Immunohistochemical detection of FLI-1 protein expression: a study of 132 round cell tumors with emphasis on CD99-positive mimics of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *The American journal of surgical pathology*. 2000;24:1657-62.
 37. Alaggio R, Boldrini R, Di Venosa B, Rosolen A, Bisogno G, Magro G. Pediatric extra-renal rhabdoid tumors with unusual morphology: a diagnostic pitfall for small biopsies. *Pathology, research and practice*. 2009;205:451-7.
 38. Ando T, Ishiguro H, Kimura M, Mitsui A, Mori Y, Sugito N, et al. The overexpression of caveolin-1 and caveolin-2 correlates with a poor prognosis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology reports*. 2007;18:601-9.
 39. Belanger MM, Roussel E, Couet J. Caveolin-1 is down-regulated in human lung carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Chest*. 2004;125:106S.
 40. Tirado OM, Mateo-Lozano S, Villar J, Dettin LE, Lloret A, Gallego S, et al. Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer research*. 2006;66:9937-47.
 41. Sengupta A, Mateo-Lozano S, Tirado OM, Notario V. Auto-stimulatory action of secreted caveolin-1 on the proliferation of Ewing's sarcoma cells. *International journal of oncology*. 2011;38:1259-65.
 42. Sainz-Jaspeado M, Huertas-Martinez J, Lagares-Tena L, Martin Liberal J, Mateo-Lozano S, de Alava E, et al. EphA2-induced angiogenesis in ewing sarcoma cells works through bFGF production and is dependent on caveolin-1. *PloS one*. 2013;8:e71449.
 43. Sainz-Jaspeado M, Lagares-Tena L, Lasheras J, Navid F, Rodriguez-Galindo C, Mateo-Lozano S, et al. Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize. *Molecular cancer research : MCR*. 2010;8:1489-500.
 44. Tirado OM, MacCarthy CM, Fatima N, Villar J, Mateo-Lozano S, Notario V. Caveolin-1 promotes resistance to chemotherapy-induced apoptosis in Ewing's sarcoma cells by modulating PKCalpha phosphorylation. *International journal of cancer*. 2010;126:426-36.
 45. Rocchi A, Manara MC, Sciandra M, Zambelli D, Nardi F, Nicoletti G, et al. CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120:668-80.

46. Llombart-Bosch A, Carda C, Peydro-Olaya A, Noguera R, Perez-Bacete M, Pellin A, et al. Soft tissue Ewing's sarcoma. Characterization in established cultures and xenografts with evidence of a neuroectodermic phenotype. *Cancer*. 1990;66:2589-601.
47. Noguera R, Navarro S, Peydro-Olaya A, Llombart-Bosch A. Patterns of differentiation in extraosseous Ewing's sarcoma cells. An in vitro study. *Cancer*. 1994;73:616-24.
48. Pagani A, Macri L, Rosolen A, Toffolatti L, Stella A, Bussolati G. Neuroendocrine differentiation in Ewing's sarcomas and primitive neuroectodermal tumors revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of chromogranin mRNA. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 1998;7:36-43.
49. Collini P, Sampietro G, Bertulli R, Casali PG, Luksch R, Mezzelani A, et al. Cytokeratin immunoreactivity in 41 cases of ES/PNET confirmed by molecular diagnostic studies. *The American journal of surgical pathology*. 2001;25:273-4.
50. Folpe AL, Goldblum JR, Rubin BP, Shehata BM, Liu W, Dei Tos AP, et al. Morphologic and immunophenotypic diversity in Ewing family tumors: a study of 66 genetically confirmed cases. *The American journal of surgical pathology*. 2005;29:1025-33.
51. Gu M, Antonescu CR, Guter G, Huvos AG, Ladanyi M, Zakowski MF. Cytokeratin immunoreactivity in Ewing's sarcoma: prevalence in 50 cases confirmed by molecular diagnostic studies. *The American journal of surgical pathology*. 2000;24:410-6.
52. Schuetz AN, Rubin BP, Goldblum JR, Shehata B, Weiss SW, Liu W, et al. Intercellular junctions in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor: additional evidence of epithelial differentiation. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005;18:1403-10.
53. Machado I, Navarro S, Lopez-Guerrero JA, Alberghini M, Picci P, Llombart-Bosch A. Epithelial marker expression does not rule out a diagnosis of Ewing's sarcoma family of tumours. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2011;459:409-14.
54. Yu H, Ge Y, Guo L, Huang L. Potential approaches to the treatment of Ewing's sarcoma. *Oncotarget*. 2017;8:5523-39.
55. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in biochemical sciences*. 2001;26:61-6.
56. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 1995;80:293-9.

57. Soldatenkov V, Notario V, Dritschilo A. Expression of the human Bcl-2 increases resistance of Ewing's sarcoma cells to apoptosis and inhibits poly(ADP-ribose) polymerase cleavage induced by radiation. *International journal of oncology*. 1996;9:547-51.
58. Lerman DM, Monument MJ, McIlvaine E, Liu XQ, Huang D, Monovich L, et al. Tumoral TP53 and/or CDKN2A alterations are not reliable prognostic biomarkers in patients with localized Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatric blood & cancer*. 2015;62:759-65.
59. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*. 2000;12:611-20.
60. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104:487-501.
61. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, et al. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:46639-46.
62. Ashkenazi A, Herbst RS. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118:1979-90.
63. Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG. Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26:3621-30.
64. Hughes DP. Novel agents in development for pediatric sarcomas. *Current opinion in oncology*. 2009;21:332-7.
65. Hughes JB, Berger C, Rodland MS, Hasmann M, Stang E, Madshus IH. Pertuzumab increases epidermal growth factor receptor down-regulation by counteracting epidermal growth factor receptor-ErbB2 heterodimerization. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8:1885-92.
66. Kang Z, Goldstein SD, Yu Y, Meltzer PS, Loeb DM, Cao L. Caspase-8 expression is predictive of tumour response to death receptor 5 agonist antibody in Ewing's sarcoma. *British journal of cancer*. 2015;113:894-901.
67. Machado I, Navarro S, Giner F, Alberghini M, Bertoni F, Llombart-Bosch A. Ezrin immunohistochemical expression in chondrosarcomas, osteosarcomas and Ewing sarcoma family of tumors. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2010;457:87-9.
68. Kim C, Shin E, Hong S, Chon HJ, Kim HR, Ahn JR, et al. Clinical value of ezrin expression in primary osteosarcoma. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association*. 2009;41:138-44.

69. Salas S, de Pinieux G, Gomez-Brouchet A, Larrousserie F, Leroy X, Aubert S, et al. Ezrin immunohistochemical expression in cartilaginous tumours: a useful tool for differential diagnosis between chondroblastic osteosarcoma and chondrosarcoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2009;454:81-7.
70. Cash T, Yin H, McCracken C, Geng Z, DuBois SG, Shehata BM, et al. Correlation of Ezrin Expression Pattern and Clinical Outcomes in Ewing Sarcoma. *Sarcoma*. 2017;2017:8758623.
71. Garces C, Ruiz-Hidalgo MJ, Font de Mora J, Park C, Miele L, Goldstein J, et al. Notch-1 controls the expression of fatty acid-activated transcription factors and is required for adipogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272:29729-34.
72. Ban J, Bennani-Baiti IM, Kauer M, Schaefer KL, Poremba C, Jug G, et al. EWS-FLI1 suppresses NOTCH-activated p53 in Ewing's sarcoma. *Cancer research*. 2008;68:7100-9.
73. Guarani V, Deflorian G, Franco CA, Kruger M, Phng LK, Bentley K, et al. Acetylation-dependent regulation of endothelial Notch signalling by the SIRT1 deacetylase. *Nature*. 2011;473:234-8.
74. Bennani-Baiti IM, Aryee DN, Ban J, Machado I, Kauer M, Muhlbacher K, et al. Notch signalling is off and is uncoupled from HES1 expression in Ewing's sarcoma. *The Journal of pathology*. 2011;225:353-63.
75. Baliko F, Bright T, Poon R, Cohen B, Egan SE, Alman BA. Inhibition of notch signaling induces neural differentiation in Ewing sarcoma. *The American journal of pathology*. 2007;170:1686-94.
76. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13:225-38.
77. Dickson BC, Riddle ND, Brooks JS, Pasha TL, Zhang PJ. Sirtuin 1 (SIRT1): a potential immunohistochemical marker and therapeutic target in soft tissue neoplasms with myoid differentiation. *Human pathology*. 2013;44:1125-30.
78. Ban J, Aryee DN, Fourtouna A, van der Ent W, Kauer M, Niedan S, et al. Suppression of deacetylase SIRT1 mediates tumor-suppressive NOTCH response and offers a novel treatment option in metastatic Ewing sarcoma. *Cancer research*. 2014;74:6578-88.
79. Marx C, Marx-Blumel L, Lindig N, Thierbach R, Hoelzer D, Becker S, et al. The sirtuin 1/2 inhibitor tenovin-1 induces a nonlinear apoptosis-inducing factor-dependent cell death in a p53 null Ewing's sarcoma cell line. *Investigational new drugs*. 2017.
80. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 2004;119:941-53.

81. Theisen ER, Pishas KI, Saund RS, Lessnick SL. Therapeutic opportunities in Ewing sarcoma: EWS-FLI inhibition via LSD1 targeting. *Oncotarget*. 2016;7:17616-30.
82. Huang J, Sengupta R, Espejo AB, Lee MG, Dorsey JA, Richter M, et al. p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature*. 2007;449:105-8.
83. Kontaki H, Talianidis I. Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Molecular cell*. 2010;39:152-60.
84. Sankar S, Theisen ER, Bearss J, Mulvihill T, Hoffman LM, Sorna V, et al. Reversible LSD1 inhibition interferes with global EWS/ETS transcriptional activity and impedes Ewing sarcoma tumor growth. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20:4584-97.
85. Mora J, Rodriguez E, de Torres C, Cardesa T, Rios J, Hernandez T, et al. Activated growth signaling pathway expression in Ewing sarcoma and clinical outcome. *Pediatric blood & cancer*. 2012;58:532-8.
86. Demetri GD, Le Cesne A, Chawla SP, Brodowicz T, Maki RG, Bach BA, et al. First-line treatment of metastatic or locally advanced unresectable soft tissue sarcomas with conatumumab in combination with doxorubicin or doxorubicin alone: a phase I/II open-label and double-blind study. *European journal of cancer*. 2012;48:547-63.
87. Kolb EA, Gorlick R, Lock R, Carol H, Morton CL, Keir ST, et al. Initial testing (stage 1) of the IGF-1 receptor inhibitor BMS-754807 by the pediatric preclinical testing program. *Pediatric blood & cancer*. 2011;56:595-603.
88. Mateo-Lozano S, Tirado OM, Notario V. Rapamycin induces the fusion-type independent downregulation of the EWS/FLI-1 proteins and inhibits Ewing's sarcoma cell proliferation. *Oncogene*. 2003;22:9282-7.
89. Scotlandi K, Benini S, Sarti M, Serra M, Lollini PL, Maurici D, et al. Insulin-like growth factor I receptor-mediated circuit in Ewing's sarcoma/peripheral neuroectodermal tumor: a possible therapeutic target. *Cancer research*. 1996;56:4570-4.
90. Pires BRB, Silva R, Ferreira GM, Abdelhay E. NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. *Genes*. 2018;9.
91. Javelaud D, Besancon F. NF-kappa B activation results in rapid inactivation of JNK in TNF alpha-treated Ewing sarcoma cells: a mechanism for the anti-apoptotic effect of NF-kappa B. *Oncogene*. 2001;20:4365-72.
92. Javelaud D, Poupon MF, Wietzerbin J, Besancon F. Inhibition of constitutive NF-kappa B activity suppresses tumorigenicity of Ewing sarcoma EW7 cells. *International journal of cancer*. 2002;98:193-8.
93. Blanes M, Gonzalez JD, Lahuerta JJ, Ribas P, Lorenzo I, Boluda B, et al. Bortezomib-based induction therapy followed by intravenous busulfan-

- melphalan as conditioning regimen for patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma*. 2015;56:415-9.
94. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, et al. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:16639-47.
 95. Ventura S, Aryee DN, Felicetti F, De Feo A, Mancarella C, Manara MC, et al. CD99 regulates neural differentiation of Ewing sarcoma cells through miR-34a-Notch-mediated control of NF-kappaB signaling. *Oncogene*. 2016;35:3944-54.
 96. Kang HG, Jenabi JM, Zhang J, Keshelava N, Shimada H, May WA, et al. E-cadherin cell-cell adhesion in ewing tumor cells mediates suppression of anoikis through activation of the ErbB4 tyrosine kinase. *Cancer research*. 2007;67:3094-105.
 97. Mendoza-Naranjo A, El-Naggar A, Wai DH, Mistry P, Lazic N, Ayala FR, et al. ERBB4 confers metastatic capacity in Ewing sarcoma. *EMBO molecular medicine*. 2013;5:1087-102.
 98. Shats I, Gatzka ML, Liu B, Angus SP, You L, Nevins JR. FOXO transcription factors control E2F1 transcriptional specificity and apoptotic function. *Cancer research*. 2013;73:6056-67.
 99. Paik JH, Kollipara R, Chu G, Ji H, Xiao Y, Ding Z, et al. FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell*. 2007;128:309-23.
 100. Chansky HA, Barahmand-Pour F, Mei Q, Kahn-Farooqi W, Zielinska-Kwiatkowska A, Blackburn M, et al. Targeting of EWS/FLI-1 by RNA interference attenuates the tumor phenotype of Ewing's sarcoma cells in vitro. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2004;22:910-7.
 101. Yang L, Hu HM, Zielinska-Kwiatkowska A, Chansky HA. FOXO1 is a direct target of EWS-Fli1 oncogenic fusion protein in Ewing's sarcoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;402:129-34.
 102. Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, Klompmaker R, Kops GJ, Lam EW, et al. Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Molecular and cellular biology*. 2002;22:7842-52.
 103. Mangerich A, Burkle A. How to kill tumor cells with inhibitors of poly(ADP-ribosyl)ation. *International journal of cancer*. 2011;128:251-65.
 104. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*. 2005;434:913-7.

105. Bieche I, de Murcia G, Lidereau R. Poly(ADP-ribose) polymerase gene expression status and genomic instability in human breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1996;2:1163-7.
106. Brenner JC, Ateeq B, Li Y, Yocum AK, Cao Q, Asangani IA, et al. Mechanistic rationale for inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in ETS gene fusion-positive prostate cancer. *Cancer cell*. 2011;19:664-78.
107. Sanmartin E, Munoz L, Piqueras M, Sirerol JA, Berlanga P, Canete A, et al. Deletion of 11q in Neuroblastomas Drives Sensitivity to PARP Inhibition. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017;23:6875-87.
108. Wharton SB, McNelis U, Bell HS, Whittle IR. Expression of poly(ADP-ribose) polymerase and distribution of poly(ADP-ribosyl)ation in glioblastoma and in a glioma multicellular tumour spheroid model. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2000;26:528-35.
109. Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, D'Amati G, Vergati M, Portarena I, et al. Systemic administration of GPI 15427, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, increases the antitumor activity of temozolomide against intracranial melanoma, glioma, lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9:5370-9.
110. Brenner JC, Feng FY, Han S, Patel S, Goyal SV, Bou-Maroun LM, et al. PARP-1 inhibition as a targeted strategy to treat Ewing's sarcoma. *Cancer research*. 2012;72:1608-13.
111. Gill SJ, Travers J, Pshenichnaya I, Kogera FA, Barthorpe S, Mironenko T, et al. Combinations of PARP Inhibitors with Temozolomide Drive PARP1 Trapping and Apoptosis in Ewing's Sarcoma. *PloS one*. 2015;10:e0140988.
112. Ordonez JL, Amaral AT, Carcaboso AM, Herrero-Martin D, del Carmen Garcia-Macias M, Sevillano V, et al. The PARP inhibitor olaparib enhances the sensitivity of Ewing sarcoma to trabectedin. *Oncotarget*. 2015;6:18875-90.
113. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 2012;481:287-94.
114. Wagner LM, McAllister N, Goldsby RE, Rausen AR, McNall-Knapp RY, McCarville MB, et al. Temozolomide and intravenous irinotecan for treatment of advanced Ewing sarcoma. *Pediatric blood & cancer*. 2007;48:132-9.
115. Remeseiro S, Cuadrado A, Gomez-Lopez G, Pisano DG, Losada A. A unique role of cohesin-SA1 in gene regulation and development. *The EMBO journal*. 2012;31:2090-102.

116. Losada A, Yokochi T, Kobayashi R, Hirano T. Identification and characterization of SA/Scs3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes. *The Journal of cell biology*. 2000;150:405-16.
117. Canudas S, Smith S. Differential regulation of telomere and centromere cohesion by the Scs3 homologues SA1 and SA2, respectively, in human cells. *The Journal of cell biology*. 2009;187:165-73.
118. Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, Fair J, Elkahloun AG, Harris BT, et al. Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science*. 2011;333:1039-43.
119. Repo H, Loyttyniemi E, Nykanen M, Lintunen M, Karra H, Pitkanen R, et al. The Expression of Cohesin Subunit SA2 Predicts Breast Cancer Survival. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2016;24:615-21.
120. Brohl AS, Solomon DA, Chang W, Wang J, Song Y, Sindiri S, et al. The genomic landscape of the Ewing Sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation. *PLoS genetics*. 2014;10:e1004475.
121. Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ, Denny CT. A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nature genetics*. 1994;6:146-51.
122. Lessnick SL, Ladanyi M. Molecular pathogenesis of Ewing sarcoma: new therapeutic and transcriptional targets. *Annual review of pathology*. 2012;7:145-59.
123. Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A, Delorme B, Charbord P, Delattre O. Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer cell*. 2007;11:421-9.
124. Crompton BD, Stewart C, Taylor-Weiner A, Alexe G, Kurek KC, Calicchio ML, et al. The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer discovery*. 2014;4:1326-41.
125. Tirode F, Surdez D, Ma X, Parker M, Le Deley MC, Bahrami A, et al. Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations. *Cancer discovery*. 2014;4:1342-53.
126. Huang HY, Illei PB, Zhao Z, Mazumdar M, Huvos AG, Healey JH, et al. Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23:548-58.
127. Lopez-Guerrero JA, Pellin A, Noguera R, Carda C, Llombart-Bosch A. Molecular analysis of the 9p21 locus and p53 genes in Ewing family tumors. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2001;81:803-14.

128. Sorbye SW, Kilvaer TK, Valkov A, Donnem T, Smeland E, Al-Shibli K, et al. Prognostic impact of Jab1, p16, p21, p62, Ki67 and Skp2 in soft tissue sarcomas. *PLoS one*. 2012;7:e47068.
129. Kovar H, Jug G, Aryee DN, Zoubek A, Ambros P, Gruber B, et al. Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene*. 1997;15:2225-32.
130. de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA, Huvos AG, et al. Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer*. 2000;89:783-92.
131. Honoki K, Stojanovski E, McEvoy M, Fujii H, Tsujiuchi T, Kido A, et al. Prognostic significance of p16 INK4a alteration for Ewing sarcoma: a meta-analysis. *Cancer*. 2007;110:1351-60.
132. Lopez-Guerrero JA, Machado I, Scotlandi K, Noguera R, Pellin A, Navarro S, et al. Clinicopathological significance of cell cycle regulation markers in a large series of genetically confirmed Ewing's sarcoma family of tumors. *International journal of cancer*. 2011;128:1139-50.
133. Sollazzo MR, Benassi MS, Magagnoli G, Gamberi G, Molendini L, Ragazzini P, et al. Increased c-myc oncogene expression in Ewing's sarcoma: correlation with Ki67 proliferation index. *Tumori*. 1999;85:167-73.
134. de Alava E, Panizo A, Antonescu CR, Huvos AG, Pardo-Mindan FJ, Barr FG, et al. Association of EWS-FLI1 type 1 fusion with lower proliferative rate in Ewing's sarcoma. *The American journal of pathology*. 2000;156:849-55.
135. Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, et al. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*. 1994;78:59-66.
136. Matsumoto Y, Tanaka K, Nakatani F, Matsunobu T, Matsuda S, Iwamoto Y. Downregulation and forced expression of EWS-Fli1 fusion gene results in changes in the expression of G(1)regulatory genes. *British journal of cancer*. 2001;84:768-75.
137. Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature reviews Cancer*. 2006;6:729-34.
138. Matsunobu T, Tanaka K, Matsumoto Y, Nakatani F, Sakimura R, Hanada M, et al. The prognostic and therapeutic relevance of p27kip1 in Ewing's family tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10:1003-12.
139. Evdokimova V, Ovchinnikov LP, Sorensen PH. Y-box binding protein 1: providing a new angle on translational regulation. *Cell cycle*. 2006;5:1143-7.
140. Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M, Kuwano M. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2003;25:691-8.

141. Evdokimova V, Tognon C, Ng T, Sorensen PH. Reduced proliferation and enhanced migration: two sides of the same coin? Molecular mechanisms of metastatic progression by YB-1. *Cell cycle*. 2009;8:2901-6.
142. Gimenez-Bonafe P, Fedoruk MN, Whitmore TG, Akbari M, Ralph JL, Ettinger S, et al. YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-glycoprotein activity. *The Prostate*. 2004;59:337-49.
143. Hsieh TC, Lin CY, Lin HY, Wu JM. AKT/mTOR as Novel Targets of Polyphenol Piceatannol Possibly Contributing to Inhibition of Proliferation of Cultured Prostate Cancer Cells. *ISRN urology*. 2012;2012:272697.
144. El-Naggar AM, Veinotte CJ, Cheng H, Grunewald TG, Negri GL, Somasekharan SP, et al. Translational Activation of HIF1alpha by YB-1 Promotes Sarcoma Metastasis. *Cancer cell*. 2015;27:682-97.
145. Parafioriti A, Bason C, Armiraglio E, Calciano L, Daolio PA, Berardocco M, et al. Ewing's Sarcoma: An Analysis of miRNA Expression Profiles and Target Genes in Paraffin-Embedded Primary Tumor Tissue. *International journal of molecular sciences*. 2016;17.
146. Dylla L, Moore C, Jedlicka P. MicroRNAs in Ewing Sarcoma. *Frontiers in oncology*. 2013;3:65.
147. Im YH, Kim HT, Lee C, Poulin D, Welford S, Sorensen PH, et al. EWS-FLI1, EWS-ERG, and EWS-ETV1 oncoproteins of Ewing tumor family all suppress transcription of transforming growth factor beta type II receptor gene. *Cancer research*. 2000;60:1536-40.
148. Landuzzi L, De Giovanni C, Nicoletti G, Rossi I, Ricci C, Astolfi A, et al. The metastatic ability of Ewing's sarcoma cells is modulated by stem cell factor and by its receptor c-kit. *The American journal of pathology*. 2000;157:2123-31.
149. Navarro S, Giraudo P, Karseladze AI, Smirnov A, Petrovichev N, Savelov N, et al. Immunophenotypic profile of biomarkers related to anti-apoptotic and neural development pathways in the Ewing's family of tumors (EFT) and their therapeutic implications. *Anticancer research*. 2007;27:2457-63.
150. Gonzalez I, Andreu EJ, Panizo A, Inoges S, Fontalba A, Fernandez-Luna JL, et al. Imatinib inhibits proliferation of Ewing tumor cells mediated by the stem cell factor/KIT receptor pathway, and sensitizes cells to vincristine and doxorubicin-induced apoptosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10:751-61.
151. Grimberg A, Cohen P. Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *Journal of cellular physiology*. 2000;183:1-9.
152. Herrero-Martin D, Osuna D, Ordonez JL, Sevillano V, Martins AS, Mackintosh C, et al. Stable interference of EWS-FLI1 in an Ewing sarcoma cell line impairs

- IGF-1/IGF-1R signalling and reveals TOPK as a new target. *British journal of cancer*. 2009;101:80-90.
153. Prieur A, Tirode F, Cohen P, Delattre O. EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Molecular and cellular biology*. 2004;24:7275-83.
 154. France KA, Anderson JL, Park A, Denny CT. Oncogenic fusion protein EWS/FLI1 down-regulates gene expression by both transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:22750-7.
 155. Scotlandi K, Manara MC, Serra M, Marino MT, Ventura S, Garofalo C, et al. Expression of insulin-like growth factor system components in Ewing's sarcoma and their association with survival. *European journal of cancer*. 2011;47:1258-66.
 156. Malempati S, Weigel B, Ingle AM, Ahern CH, Carroll JM, Roberts CT, et al. Phase I/II trial and pharmacokinetic study of cixutumumab in pediatric patients with refractory solid tumors and Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30:256-62.
 157. Tap WD, Demetri G, Barnette P, Desai J, Kavan P, Tozer R, et al. Phase II study of ganitumab, a fully human anti-type-1 insulin-like growth factor receptor antibody, in patients with metastatic Ewing family tumors or desmoplastic small round cell tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30:1849-56.
 158. Amaral AT, Garofalo C, Frapolli R, Manara MC, Mancarella C, Uboldi S, et al. Trabectedin efficacy in Ewing sarcoma is greatly increased by combination with anti-IGF signaling agents. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21:1373-82.
 159. Garofalo C, Manara MC, Nicoletti G, Marino MT, Lollini PL, Astolfi A, et al. Efficacy of and resistance to anti-IGF-1R therapies in Ewing's sarcoma is dependent on insulin receptor signaling. *Oncogene*. 2011;30:2730-40.
 160. Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, et al. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer cell*. 2010;18:683-95.
 161. Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene*. 2007;26:1932-40.
 162. Kolb EA, Gorlick R, Maris JM, Keir ST, Morton CL, Wu J, et al. Combination testing (Stage 2) of the Anti-IGF-1 receptor antibody IMC-A12 with rapamycin

- by the pediatric preclinical testing program. *Pediatric blood & cancer*. 2012;58:729-35.
163. Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma. *Current opinion in oncology*. 2008;20:183-9.
 164. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer cell*. 2004;6:313-9.
 165. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417:949-54.
 166. Ahmed AA, Sherman AK, Pawel BR. Expression of therapeutic targets in Ewing sarcoma family tumors. *Human pathology*. 2012;43:1077-83.
 167. Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJ, Pritchard DJ, et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *The New England journal of medicine*. 2003;348:694-701.
 168. May WA, Arvand A, Thompson AD, Braun BS, Wright M, Denny CT. EWS/FLI1-induced manic fringe renders NIH 3T3 cells tumorigenic. *Nature genetics*. 1997;17:495-7.
 169. Amsellem V, Kryszke MH, Hervy M, Subra F, Athman R, Leh H, et al. The actin cytoskeleton-associated protein zyxin acts as a tumor suppressor in Ewing tumor cells. *Experimental cell research*. 2005;304:443-56.
 170. Dauphinot L, De Oliveira C, Melot T, Sevenet N, Thomas V, Weissman BE, et al. Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene*. 2001;20:3258-65.
 171. Mendiola M, Carrillo J, Garcia E, Lalli E, Hernandez T, de Alava E, et al. The orphan nuclear receptor DAX1 is up-regulated by the EWS/FLI1 oncoprotein and is highly expressed in Ewing tumors. *International journal of cancer*. 2006;118:1381-9.
 172. Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir GM. Chromosome study of Ewing's sarcoma (ES) cell lines. Consistency of a reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12). *Cancer genetics and cytogenetics*. 1984;12:1-19.
 173. Urano F, Umezawa A, Hong W, Kikuchi H, Hata J. A novel chimera gene between EWS and E1A-F, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extraosseous Ewing's sarcoma. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996;219:608-12.
 174. Deng FM, Galvan K, de la Roza G, Zhang S, Souid AK, Stein CK. Molecular characterization of an EWSR1-POU5F1 fusion associated with a t(6;22) in an undifferentiated soft tissue sarcoma. *Cancer genetics*. 2011;204:423-9.
 175. Mertens F, Wiebe T, Adlercreutz C, Mandahl N, French CA. Successful treatment of a child with t(15;19)-positive tumor. *Pediatric blood & cancer*. 2007;49:1015-7.

176. Machado I, Cruz J, Lavernia J, Rubio L, Campos J, Barrios M, et al. Superficial EWSR1-negative undifferentiated small round cell sarcoma with CIC/DUX4 gene fusion: a new variant of Ewing-like tumors with locoregional lymph node metastasis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2013;463:837-42.
177. Stanta G, Bonin S, Machado I, Llombart-Bosch A. Models of biobanking and tissue preservation: RNA quality in archival samples in pathology laboratories and "in vivo biobanking" by tumor xenografts in nude mice-two models of quality assurance in pathology. *Biopreservation and biobanking*. 2011;9:149-55.
178. Giner F, Machado I, Noguera R, Villamon E, Pellin A, Calabuig-Farinas S, et al. The epithelial mesenchymal transition process in wilms tumor: a study based on a xenograft model. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2011;19:369-75.
179. Giner F, Lopez-Guerrero JA, Machado I, Garcia-Casado Z, Peydro-Olaya A, Llombart-Bosch A. The early stages of tumor angiogenesis in human osteosarcoma: a nude mice xenotransplant model. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2015;467:193-201.
180. Machado I, Giner F, Mayordomo E, Carda C, Navarro S, Llombart-Bosch A. Tissue microarrays analysis in chondrosarcomas: light microscopy, immunohistochemistry and xenograft study. *Diagnostic pathology*. 2008;3 Suppl 1:S25.
181. Mayordomo E, Machado I, Giner F, Kresse SH, Myklebost O, Carda C, et al. A tissue microarray study of osteosarcoma: histopathologic and immunohistochemical validation of xenotransplanted tumors as preclinical models. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. 2010;18:453-61.
182. Mayordomo-Aranda Empar IM, Lara Navarro, Rosario Gil-Benso, Amando Peydro, Antonio Pellín and Antonio Llombart-, Bosch. Human Angiosarcoma: A Histological and Biological Phenotyping Using Xenografts in Nude Mice: Analysis of Five Cases. *J Clin Exp Pathol*. 2015;5:1-9.
183. Subramaniam MM, Navarro S, Pellin A, Lopez-Guerrero JA, Carda C, Heredia Alvaro JA, et al. Tissue microarray profiling of primary and xenotransplanted synovial sarcomas demonstrates the immunophenotypic similarities existing between SYT-SSX fusion gene confirmed, biphasic, and monophasic fibrous variants. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2006;449:435-47.
184. Subramaniam MM, Noguera R, Piqueras M, Navarro S, Carda C, Pellin A, et al. Evaluation of genetic stability of the SYT gene rearrangement by break-apart

- FISH in primary and xenotransplanted synovial sarcomas. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2007;172:23-8.
185. Kuijjer ML, Namlos HM, Hauben EI, Machado I, Kresse SH, Serra M, et al. mRNA expression profiles of primary high-grade central osteosarcoma are preserved in cell lines and xenografts. *BMC medical genomics*. 2011;4:66.
 186. Cho SY, Kang W, Han JY, Min S, Kang J, Lee A, et al. An Integrative Approach to Precision Cancer Medicine Using Patient-Derived Xenografts. *Molecules and cells*. 2016;39:77-86.
 187. Kresse SH, Meza-Zepeda LA, Machado I, Llombart-Bosch A, Myklebost O. Preclinical xenograft models of human sarcoma show nonrandom loss of aberrations. *Cancer*. 2012;118:558-70.
 188. Machado I, Mayordomo-Aranda E, Giner F, Llombart-Bosch A. The Role of Immunohistochemistry in Rhabdomyosarcoma Diagnosis Using Tissue Microarray Technology and a Xenograft Model. *Fetal and pediatric pathology*. 2015;34:271-81.
 189. Mosakhani N, Guled M, Leen G, Calabuig-Farinas S, Niini T, Machado I, et al. An integrated analysis of miRNA and gene copy numbers in xenografts of Ewing's sarcoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2012;31:24.
 190. Noguera R, Villamon E, Berbegall A, Machado I, Giner F, Tadeo I, et al. Gain of MYCN region in a Wilms tumor-derived xenotransplanted cell line. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 2010;19:33-9.
 191. Savola S, Klami A, Tripathi A, Niini T, Serra M, Picci P, et al. Combined use of expression and CGH arrays pinpoints novel candidate genes in Ewing sarcoma family of tumors. *BMC cancer*. 2009;9:17.
 192. Kopetz S, Lemos R, Powis G. The promise of patient-derived xenografts: the best laid plans of mice and men. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18:5160-2.
 193. Gao D, Chen Y. Organoid development in cancer genome discovery. *Current opinion in genetics & development*. 2015;30:42-8.
 194. Scotlandi K, Benini S, Manara MC, Serra M, Nanni P, Lollini PL, et al. Murine model for skeletal metastases of Ewing's sarcoma. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2000;18:959-66.
 195. Gendy AS, Lipskar A, Glick RD, Steinberg BM, Edelman M, Soffer SZ. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses metastatic disease without affecting primary tumor growth in a murine model of Ewing sarcoma. *Journal of pediatric surgery*. 2011;46:108-14.

196. Edlund K, Lindskog C, Saito A, Berglund A, Ponten F, Goransson-Kultima H, et al. CD99 is a novel prognostic stromal marker in non-small cell lung cancer. *International journal of cancer*. 2012;131:2264-73.
197. Kavalari R, Pohar Marinsek Z, Jereb B, Cagran B, Golouh R. Prognostic value of immunohistochemistry in the Ewing's sarcoma family of tumors. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2009;15:CR442-52.
198. Fellingner EJ, Garin-Chesa P, Triche TJ, Huvos AG, Rettig WJ. Immunohistochemical analysis of Ewing's sarcoma cell surface antigen p30/32MIC2. *The American journal of pathology*. 1991;139:317-25.
199. Manara MC, Bernard G, Lollini PL, Nanni P, Zuntini M, Landuzzi L, et al. CD99 acts as an oncosuppressor in osteosarcoma. *Molecular biology of the cell*. 2006;17:1910-21.
200. Li Y, Luo H, Liu T, Zacksenhaus E, Ben-David Y. The ets transcription factor Fli-1 in development, cancer and disease. *Oncogene*. 2015;34:2022-31.
201. Suzuki-Anekoji M, Suzuki M, Kobayashi T, Sato Y, Nakayama J, Suzuki A, et al. HNK-1 glycan functions as a tumor suppressor for astrocytic tumor. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:32824-33.
202. Baird K, Davis S, Antonescu CR, Harper UL, Walker RL, Chen Y, et al. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer research*. 2005;65:9226-35.
203. Stewart E, Goshorn R, Bradley C, Griffiths LM, Benavente C, Twarog NR, et al. Targeting the DNA repair pathway in Ewing sarcoma. *Cell reports*. 2014;9:829-41.
204. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408:307-10.
205. Wang LL. Biology of osteogenic sarcoma. *Cancer journal*. 2005;11:294-305.
206. Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*. 2004;119:591-602.
207. Ito M, Barys L, O'Reilly T, Young S, Gorbacheva B, Monahan J, et al. Comprehensive mapping of p53 pathway alterations reveals an apparent role for both SNP309 and MDM2 amplification in sarcomagenesis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17:416-26.
208. Miao J, Kusafuka T, Fukuzawa M. Hotspot mutations of BRAF gene are not associated with pediatric solid neoplasms. *Oncology reports*. 2004;12:1269-72.

209. Izycka-Swieszewska E, Wozniak A, Drozynska E, Kot J, Grajkowska W, Klepacka T, et al. Expression and significance of HER family receptors in neuroblastic tumors. *Clinical & experimental metastasis*. 2011;28:271-82.