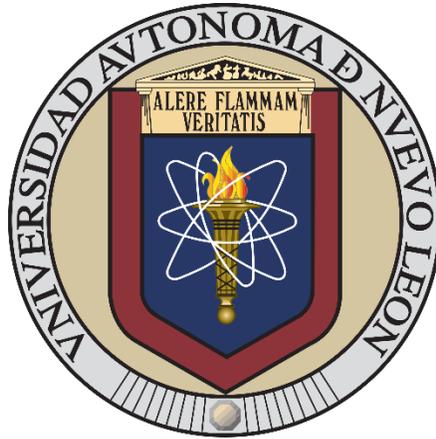


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN



**“CATEGORIZACIÓN DE LOS TUMORES EWING LIKE DE ACUERDO CON
LAS VARIACIONES EN EL PERFIL INMUNOFENOTÍPICO E
HISTOPATOLÓGICO EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL DEL NORESTE
DE MÉXICO”**

POR

DR. JOSÉ ANTONIO GARCÍA MUÑIZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN ANATOMIA PATOLÓGICA**

MONTERREY, N.L, MÉXICO

DICIEMBRE 2024

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL UNIVERSITARIO “DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ”

DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA



**“CATEGORIZACIÓN DE LOS TUMORES EWING LIKE DE ACUERDO CON
LAS VARIACIONES EN EL PERFIL INMUNOFENOTÍPICO E
HISTOPATOLÓGICO EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL DEL NORESTE
DE MÉXICO”**

POR

DR. JOSÉ ANTONIO GARCÍA MUÑIZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN ANATOMIA PATOLÓGICA**

DIRECTOR: DR. MED. MARCO ANTONIO PONCE CAMACHO

CODIRECTORES:

DR.MED. JUAN PABLO FLORES GUTIERREZ

DR. EDWARS RODRIGUEZ HINOJOSA

MONTERREY, N.L, MÉXICO

DICIEMBRE 2024

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

HOSPITAL UNIVERSITARIO "DR. JOSÉ ELEUTERIO GONZÁLEZ"

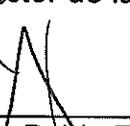
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA Y CITOPATOLOGÍA

**"CATEGORIZACIÓN DE LOS TUMORES EWING LIKE DE ACUERDO CON LAS
VARIACIONES EN EL PERFIL INMUNOFENOTÍPICO E HISTOPATOLÓGICO EN UN
HOSPITAL DE TERCER NIVEL DEL NORESTE DE MÉXICO"**

Aprobación de Tesis:



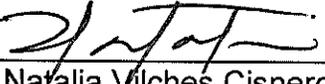
Dr. med. Marco Antonio Ponce Camacho
Director de la tesis



Dr. med. Juan Pablo Flores Gutiérrez
Codirector de la tesis



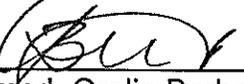
Dr. Edwards Rodríguez Hinojosa
Codirector de la tesis



Dra. Natalia Vilches Cisneros
Coordinador de Enseñanza



Dr. med. Juan Pablo Flores Gutiérrez
Coordinador de Investigación



Dra. med. Oralia Barboza Quintana
Jefe de Servicio o Departamento



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por ser siempre mi soporte y motivación para continuar adelante, sin ellos jamás hubiera llegado hasta donde estoy. Por otro lado, también agradezco a mis profesores que siempre han inculcado la idea de la excelencia, rompiendo paradigmas o limitantes que no sabía que tenía, gracias a la exigencia y el apoyo que me brindaron durante este periodo logre cosas que no habría imaginado que lograría.

Contenido

Capítulo I

1. MARCO TEORICO	1
1.1 Introducción a los tumores de células redondas (Ewing like).....	1
1.2 Epidemiología y antecedentes.....	2
1.3 Etiología, patogenia y aspectos genómicos.....	3
1.3.1 Sarcoma de Ewing.....	5
1.3.2 Sarcoma con rearrreglos en CIC.....	7
1.3.3 Sarcomas con alteraciones genómicas en BCOR.....	9
1.3.4 Sarcomas con fusiones en EWSR1 no ETS	11
1.4 Cuadro clínico	13
1.5 Estudios de imagen	14
1.6 Histopatología	14
1.7 Abordaje diagnóstico a través de marcadores tumorales por medio de inmunohistoquímica y biología molecular.....	15
1.8 Pronóstico y tratamiento.....	16

Capitulo II

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
------------------------------------	----

Capitulo III

3. JUSTIFICACIÓN	20
------------------------	----

Capitulo IV

4. HIPOTESIS	21
4.1 Hipótesis alternativa (Hi)	21
4.2 Hipótesis nula (Hn)	21

Capitulo V

5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	21
5.1 Principal	21
5.2 Secundarias	21

Capitulo VI

6. OBJETIVOS	22
6.1 Generales.....	22
6.2 Específicos	22

Capitulo VII

7. MATERIALES Y MÉTODOS	22
-------------------------------	----

7.1 Tipo y diseño de estudio.....	22
7.2 Tamaño mínimo de la muestra	22
7.3 Variables	23
7.3.1 Características demográficas	23
7.3.2 Características de la neoplasia.....	23
7.3.3 Variables independientes.....	24
7.3.4 Terceras variables.....	24
7.4 Tipo y técnica de muestreo.....	24
7.5 Criterios de selección	25
7.5.1 Criterios de inclusión	25
7.5.2 Criterios de exclusión.....	25
7.6 Realización del estudio.....	25
7.6.1 Muestras del estudio y preparación de muestra.....	25
7.6.2 Microarreglos de tejidos (TMA)	26
7.6.3 Estudios de inmunohistoquímica.....	26
7.6.3.1 CD99	26
7.6.3.2 Nkx 2.2	27
7.6.3.3 WT-1	27
7.6.3.4 FLI-1	27
7.6.3.5 BCOR.....	28
7.6.3.6 SATB2.....	28
7.6.3.7 Ciclina-D1	28
7.6.4 Hibridación por inmunofluorescencia in situ (FISH).....	29
7.7 Análisis de la expresión de los anticuerpos por inmunohistoquímica.....	30
7.7.1 CD99	30
7.7.2 NKX 2.2	30
7.7.3 WT1.....	30
7.7.4 FLI-1	30
7.7.5 BCOR.....	31
7.7.6 SATB2.....	31
7.7.7 Ciclina D1	31
7.8 Análisis de los estudios de inmunofluorescencia FISH Break Apart.....	32
7.8.1 EWSR1.....	32
7.8.2 CIC	32

8. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	32
8.1 Definición de las variables	32
8.2 Definición operacional	35
Capitulo IX	
9. ANALISIS ESTADISTICO.....	38
Capitulo X	
10. CONSIDERACIONES ETICAS.....	38
Capitulo XI	
11. CRONOGRAMA	39
Capitulo XII	
12. RECURSOS	40
12.1 Recursos Humanos.....	40
12.2 Recursos financieros	40
12.3 Recursos materiales.....	40
Capitulo XIII	
13. RESULTADOS.....	41
Capitulo XIV	
14. CONCLUSIONES	45
Capitulo XV	
15. ANEXOS.....	45
Capitulo XVI	
16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

INDICE DE TABLAS

1. Tamaño de muestra.....	45
2. Caracterización de los casos reclasificados a través de estudios de inmunohistoquímica e hibridación fluorescente in situ.....	51
3. Casos que mostraron alguna alteración en EWSR1.....	52
4. Casos que mostraron alguna alteración en CIC.....	52
5. Caracterización de los casos clasificados como Sarcoma de Ewing clásico.....	53
6. Tabla de asociación entre los marcadores realizados y el grupo 1 (Sarcoma de Ewing clásico).....	53
7. Tabla de Precisión diagnóstica de los marcadores de inmunohistoquímica con respecto al grupo 1 (Sarcoma de Ewing clásico).....	53
8. Caracterización de los casos clasificados como Sarcomas con rearrreglos en CIC.....	54
9. Tabla de asociación entre los marcadores realizados y el grupo 2 (Sarcomas con rearrreglos en CIC).....	54
10. Tabla de Precisión diagnóstica de los marcadores de inmunohistoquímica con respecto al grupo 2 (Sarcoma con rearrreglos en CIC).....	55
11. Tabla de Precisión diagnóstica de los marcadores de inmunohistoquímica con respecto al grupo 2 (Sarcoma con rearrreglos en CIC).....	55

12. Tabla de asociación entre los marcadores realizados y el grupo 3 (Sarcomas con alteraciones genéticas en BCOR).....	56
13. Tabla de Precisión diagnóstica de los marcadores de inmunohistoquímica con respecto al grupo 3 (Sarcoma con alteraciones genéticas en BCOR).....	56

INDICE DE FIGURAS

1. Materiales y métodos. Diagrama del flujo de trabajo.....	46
2. Categorías de diagnóstico finales establecidas.....	46
3. Grafica con la frecuencia de casos recolectados en los últimos 10 años.....	47
4. Proporción de casos con relación a los grupos de edad.....	47
5. Proporción de casos con relación a rangos de edad.....	48
6. Proporción de casos en relación con el género.....	48
7. Proporción de casos en relación con el sitio de origen tumoral.....	49
8. Proporción de casos con relación a los diagnósticos iniciales considerados.....	49
9. <i>Proporción de casos en relación con el patrón morfológico observado.....</i>	<i>50</i>
10. Proporción de casos agrupados en las categorías resultantes finales.	50
11. Diagrama de algoritmo diagnóstico propuesto.....	57
12. Panorama de interacción entre proteínas asociadas a los Tumores de la familia de Ewing y otras neoplasias	57

LISTA DE ABREVIATURAS

PNET: Tumor Neuro Ectodérmico Primitivo.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

SE: Sarcoma de Ewing.

SFE: Sarcomas de la Familia de Ewing.

Qt: Quimioterapia.

Rt: Radioterapia.

NGS: Secuenciación de Siguiete Generación.

PitNET: Tumor neuroendocrino Pituitario.

WT-1: Tumor de Wilms 1.

TFS: Tumor Fibroso Solitario.

SNC: Sistema Nervioso Central.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

TC: Tomografía Computarizada.

PET-FDG: Tomografía por Emisión de positrones/Desoxifluoroglucosa.

PAS: Acido Periódico de Shift.

TMVNP: Tumor Maligno de la Vaina Nerviosa Periférica.

SS: Sarcoma Sinovial.

CCG-POG: Childern´s Cancer Group-Pediatric Oncology Group.

USA: United States of America.

IE: Ifosfamida con etopósido.

VCD: vincristina, doxorubicina y ciclofosfamida.

VIDE: Vincristina, Ifosfamida, Doxorubicina y Etopósido

VAI: Vincristina, Actinomicina-D, Ifosfamida.

VAC: Vincristina, Actinomicina-D, Ciclofosfamida.

BuMel: Busulfan y Melfalan.

VDC: Ciclofosfamida, Doxorubicina y Vincristina.

GD2: Anti-gangliósido 2.

SGM: Supervivencia Global Media.

RTK: Receptor de la Tirosina Cinasa.

VEGF: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial.

PCR: Reacción de la Cadena de Polimerasa.

FISH: Hibridación Inmunofluorescente in Situ.

1. MARCO TEORICO

1.1 Introducción a los tumores de células redondas (Ewing like)

Los tumores de Ewing fueron descritos inicialmente en el año 1921 por James Ewing en casos que se localizaban anatómicamente en hueso de pacientes pediátricos fueron definidos como una neoplasia maligna de alto grado osteolítica y llamado “*Endotelioma óseo difuso*” (1, 2). Ha transcurrido más de un siglo desde la primera descripción y si bien, entendemos que este tumor inicialmente descrito James Ewing no es propiamente un tumor, si no un espectro de tumores que muestran múltiples características, clínicas, morfológicas, inmunofenotípicas, moleculares y pronósticas que se traslapan entre sí, aun no terminamos por discernir completamente lo que hoy sabemos que es una familia de tumores, de ahí que utilizamos el adjetivo *Ewing-like*. Los tumores de origen mesenquimal han sufrido cambios sustanciales para su clasificación, lo cual tiene como objetivo entender mejor estas neoplasias y como consecuencia estratificar diferentes grupos de diagnóstico, pronóstico, manejo y supervivencia (3). Si bien el término “*tumores de la familia de Ewing*” se ha empleado por un tiempo considerable, los miembros han ido cambiando con el tiempo con términos que actualmente están quedando en desuso como el tumor de Askin o el Tumor neuroectodermico primitivo (PNET) (4). De acuerdo con la actualización más reciente del libro de la Organización mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico de tumores de tejidos blandos y hueso, los sarcomas con morfología de células redondas se subcategorizaron en distintas entidades dependiendo de las alteraciones moleculares que muestran (3). Previo a esta actualización muchos de estos tumores se encontraban en una zona gris por no cumplir los criterios diagnósticos y clínicos que en ese momento se consideraban esenciales y deseables para ser diagnosticados como Sarcomas de Ewing, por lo que en las últimas dos décadas se ancló el término “*Sarcoma de Ewing atípico*” para agrupar ese grupo de tumores (5). Morfológicamente este grupo de sarcomas está compuesto por células pequeñas, redondas y de aspecto basófilo, a las cuales se les confiere un origen neuroectodérmico con grados de diferenciación distintos, sin embargo, para términos prácticos estos tumores se consideran morfológicamente indiferenciados (3, 6). A partir de un trabajo realizado en 2012 por Antoine Italiano et al. El cual aborda la problemática al momento de diagnosticar este grupo de tumores (Ewing like) en niños y adultos con tumores de células redondas que mostraban

con un espectro de morfología histológica amplio el cual podía ser el de un Sarcoma de Ewing clásico o imitar desde un tumor fibroso solitario, rhabdomyosarcoma alveolar, liposarcoma mixoide o un sarcoma sinovial y que no mostraban rearrreglos genómicos propios de una entidad (EWSR1, SS18, DDIT3, FOXO1, STAT6), incluyendo 22 pacientes, encontró que hasta el 68% mostraba rearrreglos en el gen CIC (7). Actualmente el término Sarcoma indiferenciado de células redondas se considera una categoría obsoleta donde se agrupaban todos los tumores con esa morfología de significado desconocido (8). Posteriormente surgieron múltiples líneas de investigación en el mundo que abrieron puerta al afianzamiento y descubrimiento de múltiples genes involucrados en el desarrollo de estas neoplasias, de tal modo que a nivel genómico estos se pueden categorizar como Sarcomas de Ewing (SE) si muestra translocaciones cromosómicas recíprocas y rearrreglos del gen que involucra la región 1 de quiebre del Sarcoma de Ewing (EWSR1) localizado en el cromosoma 22q12 con algún miembro de la familia ETS como lo es FLI-1 (85% de los casos) (9, 10, 11). Por otra parte, actualmente están descritos 4 subcategorías principales de Sarcomas Ewing like: Sarcomas con rearrreglos en el gen CIC, sarcomas con rearrreglos en BCOR, sarcomas con fusión de EWSR1 con otro gen que no pertenezca a la familia ETS y sarcomas no clasificables (5, 9, 12).

1.2 Epidemiología y antecedentes

Los sarcomas de la familia Ewing (SFE) comprende un subgrupo pequeño de los sarcomas (menos del 1%), los SE clásicos se presentan con mayor frecuencia en hueso (Pelvis, costillas y diáfisis de huesos largos) y del 20-30% en sitios extra esqueléticos como tejidos blandos, órganos sólidos u otros sitios poco frecuentes que se comenzaron a reportar y esto es variable dependiendo del Sarcoma *Ewing like* en cuestión, como lo muestra Terrier-Lacombe et al. en una serie publicada en 2009 de 14 casos caracterizados como sarcomas de Ewing superficiales (cutáneos/subcutáneos) con rearrreglos en EWSR1, una media de edad de 17 años y con algunos hallazgos morfológicos que por lo menos son de llamar la atención, como lo fueron extensas áreas hemorrágicas, aspecto angiomatoso, distribución en sabanas y nidos de células redondas pequeñas y azules que es algo más típico, lo más interesante de esta serie de casos es que se mostró un comportamiento clínico patológico distinto a los SE clásicos con mejor pronóstico y supervivencia de los pacientes, en donde de los 14, 11 tuvieron

seguimiento los cuales se les trato con un régimen basado en quimioterapia (Qt) y radioterapia (Rt) logrando remisión completa hasta el último seguimiento, esta serie de casos nos comienza a mostrar marcadas diferencias de comportamiento biológico, clínicas y patológicas en estos tumores siendo entidades por separado que en su momento aún no se encontraban categorizadas molecularmente como tal (2, 3, 13, 14, 15, 16). Los SFE afectan pacientes pediátricos y adultos, y si bien no se encuentra definido el punto de corte para considerar adulto al paciente con respecto a esta familia de tumores, la mayoría de los estudios utilizan la edad de 16 años, aunque esto es variable ya que en los estudios con mayor población involucrada se utiliza como punto de corte los 18 años (14, 17). El pico de incidencia son los 15 años en promedio, los hombres se encuentran más afectados que las mujeres con una relación 3:2 y se ha observado que este grupo de tumores afecta predominantemente población con descendencia europea (1.5 casos por millón de niños, adolescentes y adultos jóvenes), en contraste con la población que tiene descendencia asiática o africana las cuales tienen menor incidencia (0.8 y 0.2 casos por millón por año respectivamente) (2, 18). Constituyen el 5% de los tumores malignos primarios óseos en niños y adolescentes, alrededor de la mitad surgen de tejidos blandos y aproximadamente un cuarto de los pacientes tienen metástasis al momento de diagnóstico, siendo el pulmón el sitio más frecuente (50%), seguido por el hueso (25%) y medula ósea (20%), otro sitio que se debe considerar es cabeza y cuello (tracto sino nasal) de donde se originan hasta el 10% de los sarcomas de Ewing (4, 19). Hasta donde es nuestro conocimiento, actualmente no existen en México publicaciones previas que categoricen de acuerdo con los últimos subgrupos publicados en la Organización Mundial de la Salud (OMS) a esta familia de sarcomas (Ewing like) y su comportamiento biológico en nuestra población.

1.3 Etiología, patogenia y aspectos genómicos

Los sarcomas indiferenciados no clasificables conforman una categoría de tumores mesenquimales raros que no están distinguidos por una línea de diferenciación demostrable por algún método (20). Por décadas, se ha debatido el origen de los SE/Ewing like sin concluir si las células de origen son células madre derivadas de la cresta neural o mesenquimales (2). Histológicamente hace años esta categoría se podía subdividir en fusocelular, células redondas, epitelioides y pleomórfica, sin embargo, los patrones

histológicos no son mutuamente excluyentes y pueden coexistir lo cual le brinda una heterogeneidad histológica y vuelve más compleja su traducción diagnóstica (20). Desde el descubrimiento de EWSR1-ETS muchos de los sarcomas óseos que terminaban en categoría de no clasificable pudieron ser categorizados y a lo largo de las últimas décadas el descubrimiento de nuevos re-arreglos genómicos (inversiones, deleciones y duplicaciones segmentarias) que se traducen en genes de fusión oncogénicos, dando lugar a nuevas categorías con significancia clínica gracias a la biología molecular y el desarrollo de nuevas tecnologías/metodologías de detección, particularmente para RNA/DNA (20).

En principio los sarcomas de la familia Ewing son la consecuencia de una translocación genética, sin embargo, las vías conductoras hacia esto son múltiples y complejas. Las translocaciones son el sello distintivo de muchas neoplasias malignas derivadas de distintas capas embrionarias y se han estudiado ampliamente, así como otro tipo de re-arreglos genómicos con el fin de desarrollar estrategias terapéuticas distintas o nuevos blancos terapéuticos accionables (21). Un ejemplo de esto es que los SFE tienen fusiones específicas EWSR1-ETS, principalmente con los socios de fusión FLI-1, ERG o en el caso del tumor desmoplásico de células redondas EWSR1-WT1 (22). Es sabido que en el espectro de sarcomas *Ewing like* tienen fusiones entre genes de la familia TET/FET y además con genes que no pertenecen a la familia TET, lo que resulta en fusiones EWSR1-ZSG ó EWSR1-POU5F1 por citar algunos ejemplos (23). Los estudios de Secuenciación de Siguiete Generación (NGS) han revelado que esta familia de tumores de células redondas y azules también muestran sellos mutacionales distintivos a base de fusiones dando lugar a grupos que reflejan características clínicas particulares y diferentes a los SE clásicos, como lo son los que tienen re-arreglos genómicos en CIC, BCOR o fusiones en genes No-ETS (23, 24).

Durante la tumorigenesis los cambios en el patrón de DNAm con hipometilación/hipermetilación de las islas CPG conduce a un silenciamiento anormal de muchos genes entre ellos supresores tumorales (25). La proteína derivada de la fusión de los genes mencionados funciona como un factor de transcripción que aumenta la expresión de múltiples blancos involucrados en el crecimiento y supervivencia tumoral como IGF1, GLI-1, Myc e ID2 mientras disminuye la expresión de reguladores del ciclo celular y genes pro apoptóticos como TGFB2, p21, IGFP3; aunado a esto la proteína de fusión juega un

importante papel promoviendo la diferenciación celular con una regulación al alza de genes como EZH2 y SOX2 (26).

Se ha descrito la dependencia del SE al represor transcripcional ETV6 y su interacción con la proteína de fusión oncogénica EWS-FLI1 utilizando tecnología con CRISPR enfocado en dominios para identificar dependencias transcripcionales junto con ensayos bioquímicos y epi genómicos, observando principalmente la competencia de ETV6 con EWS-FLI1 para unirse a elementos de ADN enriquecidos con secuencias cortas y repetitivas de GGAA (microsatélites), la subsecuente inactivación de ETV6 promueve la diferenciación mesenquimal y SOX-11 juega un papel clave en este proceso (27).

1.3.1 Sarcoma de Ewing

Para el patólogo distinguir entre un SE o un SFE es algo sumamente retador debido a la amplia variedad de similitudes de las características inmunofenotípicas y morfológicas (22). Los SE son la consecuencia y se encuentran definidos por la translocación t(11;22) (q24;q12) de la porción terminal N del gen EWSR1 con la porción terminal C del gen FLI 1, lo que da como resultado la proteína de fusión EWS/FLI1 que se une a la RNA helicasa A y altera la actividad para elementos potenciadores esenciales para el crecimiento tumoral, además de inhibir la muerte celular programada (21). Las fusiones recurrentes de los genes EWSR1 o FUS con varios miembros de la familia de los factores de transcripción ETS (Mas comúnmente FLI-1 o ERG) es el sello molecular de SE clásico (28). Otros eventos como la inactivación de TP53 y CDKN2A causan una desregulación a diferentes niveles incluyendo la proliferación celular, invasión y reprogramación metabólica (21). Para su diagnóstico de acuerdo con la OMS debe de cumplir con una morfología de células pequeñas y redondas asociada a positividad para el anticuerpo CD99 como criterios esenciales y demostrar la detección de la fusión FET-ETS a través de RT-PCR o FISH como criterio deseable, aunque encontrar rearrreglos solamente en el gen EWSR1 no es específico de SE clásico por lo que en el caso de solo contar con este tipo de prueba es importante una correlación clínico-patológica adecuada (11,26).

Otro marcador de inmunohistoquímica que ha tomado gran relevancia en los últimos años para el diagnóstico de SE clásico es el NKX 2.2, un factor de transcripción de homeodominio

involucrado en la diferenciación neuroendocrina/neuroglial, siendo un blanco de marcaje a la baja de EWSR1-FLI1 (11). En principio este marcador se consideraba diagnóstico para SE clásico sin embargo diversos estudios han reportado que también puede mostrar inmunorreactividad en otro tipo de neoplasias como lo son el neuroblastoma olfatorio (esto puede ser explicado por la coactivación oncogénica de la vía de señalización Sonic-Hedgehog) o el condrosarcoma mesenquimal por mencionar algunos ejemplos (11). Por sí solo, este marcador es altamente sensible (96%), pero menos específico de lo que se creía en un inicio, siendo imperfecto como marcador confirmatorio, sin embargo la combinación de este con otros marcadores como CD99 y FLI-1 aumenta el rendimiento diagnóstico de los SE clásicos con respecto a sus imitadores histológicos más comunes, incluyendo los Sarcomas con rearrreglos en CIC, alteraciones genéticas en BCOR y los que muestran fusión en FET-no ETS (29).

Aunque en un inicio los SE clásicos se describieron en hueso, actualmente la variedad de sitios primarios que se han descritos es muy amplia con reportes en la literatura en sitios sumamente atípicos como órganos sólidos/huecos viscerales, especialmente en tracto digestivo en el cual se ha observado una prevalencia aproximadamente del 3% con predominio hacia intestino delgado con similares rangos de mortalidad a los SE clásicos originados en hueso o tejidos blandos (16, 30).

En tracto sino nasal el diagnóstico diferencial es igual de amplio que en otros sitios primarios, con algunos otros a considerar, entre ellos se encuentran el Melanoma asociado a mucosas, Rbdomiosarcoma, Carcinoma sino nasal indiferenciado, NUT carcinoma, Carcinoma neuroendocrino, Linfoma NK/T extra nodal de tipo nasal, Neuroblastoma olfatorio y los Tumores neuroendocrinos pituitarios (PitNET) (19).

Como se mencionó previamente, hasta un 25% de los pacientes con SE clásico tienen metástasis al momento del diagnóstico, dada su etiopatogenia las células tumorales con alta expresión de EWS-FLI1 al estar sumamente indiferenciadas, tienen un alto índice de proliferación, por otro lado las que muestran una baja expresión de EWS-FLI1 cuentan con un fenotipo mesenquimatoso con tendencia a la migración y metástasis, esto se explica debido a la pérdida de expresión de E-cadherina lo que favorece una alta expresión de marcadores mesenquimales como N-cadherina, por lo que en este contexto se ha observado

que la fusión EWS-FLI1 también funciona como un inductor metastásico por su papel de organización en el citoesqueleto de actina, además su silenciamiento provoca una pérdida de expresión de proteínas de unión como Claudina-1, Ocludina o desmosomas (Desmoplakina, Paloplakina) (2).

Existen una serie de tumores relacionados a pacientes con mutaciones germinales en DICER1, entre ellos los Sarcomas asociados a DICER1 los cuales histológicamente muestran un patrón que imita al Blastoma Pleuropulmonar independientemente de su sitio de origen, con células pequeñas, redondas y azules, áreas fusos celulares poco diferenciadas, pleomórficas con diferenciación rabiomioblastica/condroide e inclusive con calcificaciones o formación de osteoide, independientemente de su rareza, se deben de considerar en el diagnóstico diferencial de los SFE (31).

1.3.2 Sarcoma con rearreglos en CIC

Desde hace más de 20 años se ha visto que ciertos grupos de sarcomas tienen una amplia expresión de marcadores de inmunohistoquímica, por ejemplo, los rabiomiomas, desde el 2002 se ha descrito que tienen expresión de Tumor de Wilms 1 (WT-1), una proteína con cuatro dedos de zinc del tipo-Kruppel en la región guanidina-citidina (GC) secuencia consensada rica en “EGR1” la cual es requerida para la diferenciación y proliferación tisular con un rol importante en el desarrollo de tejidos derivados del mesodermo por lo que su expresión aberrante se puede encontrar además en una gran cantidad de neoplasias malignas originadas de esta capa embrionaria (32). Cuando inicialmente Carpentieri et al. Describieron la expresión de este marcador en los rabiomiomas sugirieron que podía existir una asociación entre los tumores de Wilms, la diferenciación miogénica y los rabiomiomas e incluso que podía ser útil en ese tiempo para la diferenciación entre Rabiomiomas y SE (32).

El sarcoma con t(4;19)(q35;q13.1) asociada fue descrito en 1996 por Richkind et al. En un paciente pediátrico de 12 años con un gran tumor en el tobillo que tenía metástasis a pulmón en el momento del diagnóstico, el cual tuvo una Sobrevida Global (SG) de 10 meses (33). Posteriormente otro grupo de trabajo encabezado por Kawamura et al. Identifico los genes resultantes de esas translocaciones, CIC (19q13) y DUX4 (4q35) (33).

En 2014 Shintaro et al. Describieron el primer sarcoma con fusión en CIC-FOXO4, en un paciente de 63 años con origen primario en tejidos blandos de cuello, este socio de fusión perteneciente al cromosoma X es miembro de la familia de genes Forkhead y algunas neoplasias presentan fusiones quiméricas con este gen como el rhabdomyosarcoma alveolar (FOXO4/PAX3) y la leucemia mieloide aguda (FOXO4/AFX-MLL) (22).

Alrededor del 2012 se comenzaron a integrar los sarcomas que mostraban rearrreglos en el gen CIC dentro de los tumores SFE, siempre y cuando no mostraran rearrreglos EWSR1-ETS (22).

Generalmente los sarcomas de este grupo se presentan en pacientes de mayor edad (37 años en promedio), aunque el rango es amplio e inicialmente se describieron en pacientes pediátricos siendo igual o más agresivos que los SE y su proporción con respecto a los demás grupos SFE (*Ewing like*) ronda del 15-20% (10, 24, 34, 38). Su origen puede ser en tejidos blandos superficiales, profundos, órganos sólidos o cerebro de forma menos habitual, aunque existen reportes de sitios sumamente inusuales como en pleura donde el diagnóstico diferencial se vuelve complejo al querer distinguirlo de un mesotelioma (Calretinina y WT-1 positivos) o un Sarcoma sinovial monofásico (CD99, FLI-1, TLE-1 positivos) los cuales muestran un inmunofenotipo que imita al de este grupo de sarcomas (34, 38). También se han visto casos diagnosticados inicialmente como angiosarcomas o angiosarcomas epitelioides con co-expresión de CD31 y ERG que muestran rearrreglos en CIC y terminaron siendo reclasificados a este grupo de sarcomas (34).

Actualmente los sarcomas del grupo CIC comprenden el segundo grupo de los SFE, después de los SE clásicos (34), se caracterizan por translocaciones recurrentes t(4;19) (q35;13) que resultan en la fusión entre el gen CIC (Represor transcripcional Capicua) y DUX4/DUX4L, un gen de homeodominio doble (35, 36). La fusión de CIC-DUX4 actúa como un factor de transcripción aberrante activando fuertemente dianas CIC corriente abajo, la oncoproteína resultante regula al alza varios genes de la familia ETS (ETV1, ETV4, ETV5) y de la subfamilia PEA3 (Activador potenciador del Polioma 3) involucrado en la embriogénesis y morfogénesis ramificada de las estructuras epiteliales incluidas yemas uroteliales y de las extremidades (29, 33). El gen CIC puede tener distintos socios de fusión, tales como FOXO4, LEUTX, NUTM2A, NUTM1 siendo los más habituales, pero también recientemente se han

descrito distintos genes como AXL, CITED1 y SYK, además este grupo de sarcomas tiene una tasa de mutaciones baja (34, 37). Para su diagnóstico de acuerdo con la OMS debe de cumplir como criterios esenciales un fenotipo predominantemente de células redondas, leve pleomorfismo nuclear, componentes epitelioides y/o fusocelulares, estroma variablemente mixoide y un inmunofenotipo con expresión variable para CD99 (Expresión débil y membranosa) y frecuentemente son positivos para WT1 (95% sensible y 81% específico) (utilizando de preferencia WT1 C-terminal sobre N-terminal el cual puede dar falsos negativos y una interpretación más difícil) y/o ETV4 (90% sensible y 95% específico), en casos selectos realizar el rearreglo del gen CIC se considera un criterio deseable (24, 29, 33, 34,). Morfológicamente también puede mostrar componente de células claras, características de alto grado, nidos septados por bandas de tejido fibroconectivo y necrosis (34, 36). SC Smith et al. Han descrito en un trabajo que existe inmuno reactividad para FLI-1 y ERG en algunos casos CIC-DUX4 confirmados, imitando el inmunofenotipo que muestra el tumor desmoplásico de células redondas y a su vez dificultando la distinción, además en el mismo trabajo se comienza a dar mayor relevancia a la separación de los Sarcomas con rearreglos en CIC debido a que pueden responder tener una mejor tasa de respuesta inicial al esquema multi droga para SE, sin embargo, desarrollan rápida resistencia (36, 34). Además, se ha observado que este grupo de tumores muestra amplificaciones en el gen MYC, GLI 1 o NR0B1 con expresión variable que en ensayos clínicos posteriores podría representar una alternativa terapéutica (2, 36).

1.3.3 Sarcomas con alteraciones genómicas en BCOR

El gen de fusión BCOR-CNNB3 resulta de una inversión para céntrica del cromosoma X y le confiere un perfil genómico distinto a los sarcomas con re-arreglos en EWSR1 o CIC, mencionados anteriormente (20). Este subgrupo de sarcomas muestra una fuerte predilección por aparecer en hombres, generalmente tienen un origen óseo/tejidos blandos en adolescentes y adultos jóvenes, constituyendo el tercer grupo en frecuencia de los SFE (*Ewing-like*) con una frecuencia estimada del 5-10 % (10, 20).

Aunque inicialmente la función que determinaba los sarcomas con fusión en BCOR-CCNB3, se ha postulado que CCNB3 es una ciclina meiótica restringida a los espermatozoides mientras que el gen de BCOR inicialmente se identificó por codificar un co-represor de BCL-6 que

regula la función de las células madre mesenquimales mediante una modificación epigenética de la metilación de las histonas lo cual puede tener relación con este subgrupo de sarcomas (20).

Molecularmente los sarcomas con alteraciones en BCOR son sumamente diversos y estos pueden tener translocaciones, mutaciones activadoras, así como fusiones con distintos socios tales como CCNB3, MAML3, ZC3H7B, CHD9, CIITA y KMT2D (37). Este gen puede ser activado por una vía alterna a través de duplicaciones internas en tándem (DIT) del exón 15, además este codifica la subunidad de una proteína del complejo múltiple (polycomb) represivo 1 (37).

Antonescu et al. En un trabajo realizado en 2020 público que junto con las alteraciones genéticas en BCOR identificadas a través de ITD también se han detectado de forma mucho menos frecuente fusiones alternativas como YWHAE-NUTM2B/E en hasta la mitad de los tumores indiferenciados de células redondas conocidos como *Tumores primitivos mixoides mesenquimales de la infancia (TPMMI)*, esto reforzó la idea de que estos tumores tenían la misma vía patogénica y molecular que el sarcoma de células claras renal el cual tiene alteraciones genéticas e inmunofenotípicas similares (BCOR, Ciclina D1, SATB2 positivos) abriendo un panorama distinto por esta vía oncogénica del subgrupo no conocida con supervivencias globales sin diferencias estadísticamente significativas (8).

El conductor oncogénico y el tipo de mutación tiene traducción clínico-patológica, los Sarcomas Ewing like positivos para BCOR-ITD junto con los TPMMI se presentan más comúnmente en niños originándose en tórax o tejidos blandos intrabdominales, por otro lado, los Sarcomas de células claras surgen del riñón surgen en niños de 2-4 años y por último los tumores con fusión BCOR-CCNB3 tienen predilección por el esqueleto en adolescentes (8). La asociación entre los Sarcomas BCOR-ITD, TPMMI y el Sarcoma de células claras del riñón se ha observado y reforzado en otros estudios que han realizado en casos confirmados molecularmente perfiles de metilación los cuales han resultado similares, por lo tanto los Sarcomas de tejidos blandos y renales BCOR coinciden con las clases de metilación de *sarcomas BCOR alterados*, esto le da importancia al perfil de metilación de ADN (mDNA) como una herramienta diagnóstica con traducción clínica útil (25). Mas de dos alteraciones de tipo CNV le confieren peor pronóstico (25).

En el grupo de tumores con alteraciones en BCOR, actualmente se reconocen tres clases de metilación: Tumores de células pequeñas redondas y azules con alteraciones en BCOR (SBRCT-BCOR), Sarcoma de células claras renal (CCSK) y Sarcoma del estroma endometrial de alto grado (EES-HG) (25).

Como criterios esenciales para su diagnóstico la OMS indica que este grupo debe de tener una morfología de células primitivas redondas a fuso celulares que se agrupan en nidos, sabanas o tienen un crecimiento fascicular, con ocasionales células discohesivas, un estroma variablemente mixoide con una vasculatura delicada y positividad por inmunohistoquímica para BCOR, SATB2 y Ciclina D1 (20, 24). Como criterios deseables se recomienda realizar una confirmación molecular para anomalías genéticas en el gen de BCOR (Fusión en BCOR o Duplicaciones internas en tándem) (24).

En el diagnóstico diferencial este grupo de sarcomas puede imitar una gran variedad de neoplasias fuso celulares/mixoides como lo son el TPMMI, sarcoma de células claras renal, sarcoma sinovial, TMVNP, dermatofibrosarcoma protuberans o el sarcoma fibromixoide de bajo grado y algunos tumores en Sistema Nervioso Central (SNC), aunque, estos solo son ejemplos representativos ya que la lista de imitadores es mucho más amplia (8, 20).

1.3.4 Sarcomas con fusiones en EWSR1 no ETS

En este grupo se engloban principalmente dos sub categorías, los sarcomas *EWSR1::PATZ1* y los sarcomas *EWSR1::NFATc2*. *PATZ1* se localiza en el cromosoma 22 y se encuentra a 2 mega bases de distancia del gen *EWSR1*, la fusión de ambos implica una translocación intra cromosómica con inversión peri céntrica (37). Por otro lado, los sarcomas *NFATc2* se asocian a translocaciones no balanceadas con perfiles genéticos complejos que frecuentemente involucran otras vías moleculares como por ejemplo deleciones concomitantes en *CDKN2A/B* lo que les confiere la expresión de múltiples proteínas siendo también conocidos como sarcomas poli fenotípicos (37). Este es el cuarto grupo en frecuencia de los SFE (*Ewing like*) el cual constituye menos del 1% de los casos; El estudio clínico-patológico de los Sarcomas con fusión *EWSR1::PATZ1* más grande reportado por Michal et al. En 2021 fue de 9 casos, los rangos de edades que iban desde los 8 hasta los 81 años (Edad promedio 49 años) con características morfológicas de bajo, intermedio o sarcomas de alto

grado, heterogéneos, compuestos por células fuso celulares entremezcladas con células ovoides, epitelioides y redondas, que en ocasiones suele tener un estroma mixo-hialino con depósito de colágeno denso, cambios micro quísticos, reticulares y vasos de neoformación de tipo hemangiopericitoma (28). El perfil inmunofenotípico expresa S-100, GFAP, MyoD1, Pax-7, Desmina y citoqueratinas AE1/AE3 por lo que tanto a este subgrupo como al que tiene el socio de fusión NFATC2 también son conocidos como poli fenotípicos (28).

En este grupo de SFE (*Ewing-like*) la OMS recomienda para su diagnóstico como criterios esenciales una morfología de células fuso celulares a redondas, características de bajo grado (aunque existen algunos casos de alto grado) y cambios fibroestromales (24). La prueba de FISH EWSR1 break appart muestra amplificación del extremo 5' en sarcomas con rearrreglos en EWSR1-NFATC2, por lo que la identificación de la fusión siempre será considerada el gold standard (24). Como criterios deseables la mayoría de los tumores con rearrreglos en NFATC2 se localizarán en huesos largos, además los sarcomas con rearrreglos en PATZ-1 deben mostrar una morfología de células redondas a fusocelulares con un fenotipo divergente que involucre origen miogénico y neurogénico (24).

Una de las características de estos subgrupos de sarcomas poco frecuentes es su predilección por surgir de tejidos blandos torácicos y/o pulmón, ya que alrededor del 50% de los casos reportados a la fecha se originan de ese sitio; Otros orígenes reportados con menos frecuencia son los tejidos blandos de la pared abdominal, tejidos blandos abdominales profundos y órganos viscerales (28).

Debido a que morfológicamente este grupo de SFE (*Ewing Like*) son sumamente heterogéneos Michal et al. Propuso un abordaje para el diagnóstico de estas neoplasias basados inicialmente en la morfología y estratificación por grupos, el primer grupo lo componen tumores de aparente bajo grado, con morfología fusocelular, ovoide, células redondas y epitelioides con un marcado estroma hialino, esto puede recordar tumores como el Tumor fibroso solitario (TFS) o los Mioepiteliomas; el segundo grupo comprende los tumores de grado intermedio/alto con células redondas u ovoides con muy escaso componente estromal o fuso celular; por último el tercer grupo fue determinado por sarcomas puramente de alto grado con morfología mixta en donde los principales diagnósticos diferenciales incluían los Rbdomiosarcomas, Sarcomas con alteraciones genéticas en BCOR

o rearrreglos en el gen CIC; este abordaje desde la morfología puede ser practico en el momento de cribado de tumores Ewing-like sobre todo cuando ya se han descartado los grupos más frecuentes mencionados en apartados anteriores (28).

1.4 Cuadro clínico

Los SE afectan predominantemente la metáfisis de los huesos largos (80% de los casos) con picos de incidencia entre la primera y segunda década de vida, por otra parte, cuando se presentan en adultos clínicamente tienden a debutar en tejidos blandos profundos de la región paravertebral, la porción proximal de las extremidades y de forma mucho menos frecuente en órganos sólidos, esto es variable dependiendo de la categoría de SFE (*Ewing like*) que abordemos (3). El segundo grupo en frecuencia de los tumores Ewing like son los sarcomas con re-arreglos en CIC, este grupo es más frecuente en niños y adultos jóvenes con un promedio de incidencia en la segunda década, sin embargo, se han reportado casos en un amplio rango de edades (3, 35). La mayoría surgen de tejidos blandos profundos en la región del tronco, extremidades o en cabeza y cuello, también pueden surgir de tejidos blandos superficiales u órganos sólidos en el 10% de los casos y su incidencia en hueso es extremadamente rara (3, 35). La fusión *CIC::NUTM1* que fue descrita recientemente muestra cierto tropismo por tumores de este grupo localizados en sistema nervioso central (SNC) (3). El tercer grupo en frecuencia son los sarcomas con re arreglos en BCOR los cuales se originan predominantemente en hueso, seguido de los tejidos blandos, constituyendo el 5% de los sarcomas *Ewing like*, muestran un pico de incidencia en la segunda década de vida y se ha reportado que cuando existe la fusión *BCOR::CCNB3* estos tienden a surgir en la pelvis, extremidades inferiores y la región para espinal (3). La localización en órganos sólidos de este grupo se ha reportado, sin embargo, es extremadamente rara (3). Los SE con socios de fusión que no pertenecen a la familia ETS son el grupo más infrecuente de estas categorías constituyendo menos del 1%, en comparación con las otras categorías este se caracteriza por ocurrir en pacientes de mayor edad con un rango de incidencia muy amplio (edad promedio de 49 años) (3, 28, 37). La localización de estos tumores es variable, se ha descrito que los sarcomas con fusión en *EWSR1::FUS-NFATc2* tienden a surgir en la metáfisis o diáfisis de huesos largos afectando a pacientes con una edad promedio de 39 años, mientras que los

sarcomas con fusión en EWSR1::PATZ1 ocurren en tejidos blandos profundos y la pared abdominal (3, 28, 37).

1.5 Estudios de imagen

Para una adecuada estadificación del paciente se utilizan técnicas de imagen combinadas, entre ellas están la Tomografía por emisión de positrones con desoxifluoroglucosa (PET-FDG), Resonancia magnética nuclear (RMN) y la Tomografía computarizada (TC), siendo el actual standard la RMN ya que es más sensible que la TC para la detección de metástasis y en algunos estudios se ha visto que tiene equivalencia en cuanto a sensibilidad para la detección de metástasis que el PET-FDG (4).

1.6 Histopatología

La morfología de estos tumores es diversa, siendo un verdadero reto para los patólogos más expertos, sin embargo, sigue siendo el origen para un abordaje diagnóstico complejo, por sí sola se encuentra sumamente limitada para el mismo, aunque es importante reconocer la variedad de patrones que se pueden encontrar para realizar un abordaje diagnóstico dirigido con implicaciones pronósticas y terapéuticas para el paciente. El 80% de los SE muestran patrones clásicos donde existe una proliferación difusa de células pequeñas, redondas, de núcleo basófilo las cuales son discohesivas y monótonas, con un patrón de cromatina granular fino y de uno a tres nucleolos, estas células tienden a tener un citoplasma amplio de tinte eosinofílico que es positivo para la tinción de Ácido Periódico de Schiff (PAS) (24, 39). Además, muestran necrosis geográfica y un elevado conteo mitótico (24, 39). Los patrones no clásicos del SE descritos son el patrón de tumor neuro ectodérmico primitivo (PNET), alveolar, fuso celular, reticular en un trasfondo mixoide-hialinizado, anidado-epitelioide y el patrón de tipo adamantinoma (este último subtipo tiene afinidad por el tracto sino nasal) (19, 35, 39). El grupo de sarcomas con rearrreglos en CIC son relativamente bien circunscritos, con necrosis y hemorragia prominentes, generalmente son tumores lobulados con un estroma escleroso a menos que se encuentren localizados en SNC, morfológicamente están compuestos por sabanas difusas de células pequeñas y redondas, tienden a tener un citoplasma mucho más amplio y mayor cohesividad intercelular que los SE, los núcleos son de cromatina vesicular prominente y mitosis atípicas muy abundantes, en algunos casos

adoptan una configuración epitelioides y se confunden con carcinomas o el sarcoma epitelioides, una característica particular de este grupo es que muestran cambios mixoides focales con un crecimiento arquitectural en cordones hasta en el 50% de los casos y puede imitar a otros tumores como el condrosarcoma extra esquelético mixoide, los tumores mioepiteliales, sarcoma sinovial, liposarcoma mixoide, rhabdomyosarcomas, tumor desmoplásico de células redondas, Carcinomas (Células pequeñas, NUT, Células de Merkel), Linfoma linfoblástico, melanomas y tumores pediátricos (neuroblastomas o tumor de Wilms) (11, 29, 39). Los sarcomas BCOR se pueden presentar con morfología pura de células redondas y azules, similar al SE clásico, pero la mayoría de las veces estos muestran una morfología fusocelular y no es infrecuente que se confundan con un sarcoma sinovial (SS) o un tumor maligno de la vaina nerviosa periférica (TMVNP), también pueden mostrar un patrón estoriforme, fibrilar e hipo celular asemejando tumores fibroblásticos, el estroma puede ser de edematoso a mixoide y vascularizado, en este grupo es raro ver un patrón de crecimiento organoide y pueden tener focos de diferenciación osteoblástica lo cual puede confundir con un osteosarcoma de células pequeñas (37, 39, 40). El sarcoma *EWSR1::NFATc2* es una neoplasia bien circunscrita compuesta por células organizadas en cordones, nidos o pseudoacinos en el trasfondo de un estroma mixoide, hialino o fibroso, las células son ovaladas a fuso celulares y variablemente uniformes, un hallazgo descrito pero inconsistente es que muestran un abundante infiltrado por eosinófilos (37, 39). El sarcoma *EWSR1::PATZ1* muestran una morfología muy heterogénea que puede tener componentes de células fuso celulares y redondas, que nuclearmente pueden ser de bajo o alto grado dependiendo del contexto y al igual que otros grupos pueden tener un estroma fibroso, hialino o mixohialino (37).

1.7 Abordaje diagnóstico a través de marcadores tumorales por medio de inmunohistoquímica y biología molecular

Este grupo de neoplasias es de las que más ha tenido modificaciones en cuanto a los marcadores diagnósticos. Por lo que no existe un panel predefinido para el diagnóstico preciso y en muchas de las ocasiones utilizar solo marcadores de inmunohistoquímica puede ser insuficiente dentro del panel diagnóstico y es necesario utilizar estudios moleculares o NGS con paneles definidos para sarcomas de tal modo que es importante individualizar cada

caso desde la presentación clínica, las variables demográficas de cada paciente y la histopatología (41). Idealmente, comenzando por estudios de inmunohistoquímica un panel debe de incluir marcadores como CD99, NKX 2.2, FLI1, WT1, ETV 4, DUX 4, SMARCB1/INI1, Agreccan, Ciclina D1, BCOR y SATB2, estos marcadores en el contexto adecuado ayudan a distinguir entre las tres principales categorías de esta familia de tumores (35, 37, 39, 42, 43). Un algoritmo diagnóstico adecuado se define a partir del contexto clínico y morfológico de la neoplasia, excluyendo con marcadores altamente sensibles y específicos los diagnósticos diferenciales a considerar incluyendo marcadores que demuestran diferenciación miogénica como Miogenina, desmina o MYOD1, melánicos o de marcaje neurogénico como SOX10 o S100, de origen epitelial como citoqueratinas o marcadores de diferenciación linfoide (37, 39). Cuando un panel de inmunohistoquímica y citogenética es insuficiente se pueden aplicar tecnologías como el NGS con paneles de secuenciación personalizados para sarcomas que evalúen los principales genes de interés para estas neoplasias en cuanto a diagnóstico y alternativas terapéuticas, siendo actualmente el gold-standard (con una sensibilidad del 97% y especificidad del 100%) como el que diseño McConell et al. Con un panel enfocado específicamente en el diagnóstico de sarcomas de tejidos blandos el cual detecta tanto genes de fusión como las variaciones en número de copias (CNVs) más comunes, abarcando 202 fusiones únicas que se asocian a 87 tipos de sarcomas y 7 genes con CNVs conocidas en sarcomas (41).

1.8 Pronóstico y tratamiento

Previo al 2010 se habían hecho avances considerables en el tratamiento de este grupo de sarcomas, en particular para los sarcomas de Ewing clásicos “localizados” y aunque considerable no es sinónimo de suficiente se había visto que previo a la introducción de la quimioterapia tan solo el 10% de los pacientes sobrevivían en contraste con el 75% de supervivencia (Ewing’s localizados) después de añadir un esquema terapéutico que -en su momento- se consideraba adecuado a base de quimioterapia, sin embargo otros retos se avecinaban debido a los altos índices de toxicidad a corto plazo y graves efectos adversos por el tratamiento (4). Los esquemas de quimioterapia para los Sarcomas de Ewing clásicos se remontan a 1960 basados en monoterapia con ciclofosfamida, dactinomicina, doxorubicina y vincristina seguido de esquemas de adyuvancia con vincristina, actinomicina

y doxorubicina (VAC), posteriormente (1988-1992) el Children's Cancer Group-Pediatric Oncology Group (CCG-POG) mostro que la asociación de ifosfamida con etopósido (IE) intercalado con un régimen de vincristina, doxorubicina y ciclofosfamida (VCD) aumentaba de forma notable la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad traducido en 69% frente a 54%, (p:0-0.05) y 72% vs 61%, (p:0.01), respectivamente para pacientes que tenían tumores "localizados" (4). Aun así, las estrategias actuales de tratamiento para SE clásicos "localizados" trasladado a pacientes con enfermedad metastásica siguen siendo por lo menos controvertidas y es que existe lo que se le conoce como una brecha continental en los esquemas de tratamiento para inducción y consolidación entre el occidente (USA) y Europa (44, 45). Los resultados derivados del ensayo clínico controlado aleatorizado de fase 3 que se realizó en 10 países europeos con 640 pacientes (EURO EWING 2012) que comparo estrategias terapéuticas para el SE clásico (44, 45). Por un lado la Europea incluye para la inducción con Vincristina, Ifosfamida, Doxorubicina y Etoposido (VIDE) y consolidación con Vincristina, Actinomicina-D, Ifosfamida o Ciclofosfamida (VAI o VAC) o Busulfan y Melfalan (BuMel) mientras que en USA el esquema esta constituido por ciclos comprimidos a intervalos de Ciclofosfamida, Doxorubicina y Vincristina (VDC) más IE, siendo este último más efectivo respecto a supervivencia libre de enfermedad y menos tóxico que el VIDE, una factor importante a considerar del EURO EWING 2012 fue que incluyo SE clásicos y *Ewing-like* sin caracterizar o estratificar molecularmente en subgrupos (CIC, BCOR, NO-ETS) por lo que la heterogeneidad en el comportamiento biológico pudo ser una variable importante a considerar, sin embargo este estudio fue de suma importancia para acercarse a una armonización en cuanto a los esquemas de tratamiento basados en Qt para este grupo de neoplasias (2, 44, 45).

Actualmente existen líneas de investigación para integrar nuevas terapias con tratamientos estándar, optimizar secuencias y combinaciones terapéuticas considerando el perfil molecular como blanco terapéutico hacia proteínas derivadas de EWS-FLI1 con oligonucleótidos inhibitorios, inhibidores de interacción proteína-proteína (YK-4-279) o inhibidores PARP1 (Olaparib) (26). Por otro lado, la utilización de inmunoterapia con anticuerpos dirigidos contra dianas tumorales específicas (GD2, B7-H3) son otros horizontes a considerar, Los anticuerpos anti-gangliósido 2 (GD2), se han utilizado en la terapia para neuroblastomas (26). Una rama de investigación interesante son las vacunas y terapia celular,

por el lado de las vacunas en desarrollo, estas apuntan hacia antígenos tumorales específicos para estimular la respuesta inmune contra las células del SE; la terapia con células dendríticas se propone para estimular la presentación de antígenos tumorales y activar la inmunidad adaptativa (26). La inmunoterapia ofrece nuevas oportunidades de tratamiento para mejorar los resultados en este grupo de pacientes.

Los SE clásicos del tracto sino nasal tienen mucho mejor pronóstico que los originados en otros sitios con un 50-75% de supervivencia reportada a 5 años, sin embargo, esto es dependiente del estadio al momento del diagnóstico (19).

Si nos expandimos dentro de la familia de Sarcomas de Ewing el pronóstico tiende a volverse impredecible, de ahí que su distinción comienza a tomar un peso específico en la actualidad a la hora de toma de decisiones terapéuticas, históricamente los ES tienen un pronóstico pobre con factores intrínsecos de la neoplasia y otros implicados como la localización axial, tamaño tumoral, metástasis a distancia, sexo masculino y edad avanzada (14).

En el grupo de sarcomas con re-arreglos en CIC (CIC-DUX4) inicialmente se ha observado en modelos de ratón supresión del crecimiento de estos tumores cuando son tratados con inhibidores de CDK4/6 (Palbociclib) o agentes alquilantes (Trabectedina) (46).

Se ha descrito que los sarcomas con re-arreglos en BCOR tienen una supervivencia global media (SGM) similar a los pacientes con SE clásicos con recurrencias locales y metástasis a distancia en hasta el 50% de los casos, sin embargo, en varios artículos se ha publicado que tienen mejor sensibilidad a los esquemas de quimioterapia convencional (37).

Escasa literatura sugiere que los Sarcomas con fusiones en EWSR1- no ETS tienen un pronóstico más favorable con respecto al resto de los grupos sin embargo al ser sumamente infrecuentes esto debe ser considerado con precaución (28).

Actualmente se encuentra bien establecido que el manejo con terapia agresiva multimodal de los SFE no ha mejorado la sobrevida en las últimas 4 décadas en contraste con la eficacia comprobada en algunos casos tratados en monoterapia con inhibidores del receptor de la tirosina cinasa (RTK) (47). En grupos grandes de pacientes sometidos a ensayos clínicos basados en inhibidores múltiples RTK se ha observado que existe eficacia clínica, los cuales combinan anti VEGF con otros inhibidores claves implicados en la progresión de este grupo

de sarcomas (PDGFR, FGFR, KIT, y/o MET) y que muestran niveles menores de toxicidad que los regímenes basados en quimioterapia (47, 48).

Otra línea de investigación terapéutica ha mostrado un potencial blanco terapéutico en los microsatélites GGAA, derivado de su silenciamiento epigenético (marcado por H3KM9me3) inhibe el puente de EWS-FLI1 con el potenciador SOX2, de esta forma inhibiendo su expresión y disminuyendo el crecimiento tumoral *in vivo* (2).

Debido a los avances en la tecnología y al insuficiente progreso con la combinación de estrategias convencionales, se están desarrollando nuevas terapias a través de blancos terapéuticos accionables que brinden un panorama distinto para estos pacientes (2). Entre las líneas de investigación, las principales tienen un enfoque en reparadores del DNA como los inhibidores de Poly (ADP-Ribosa) polimerasa 1 (PARP1), o en el ciclo celular, como los inhibidores de ciclinas dependientes de Quinasas (CDK) (2).

Otras perspectivas terapéuticas incluyen tecnologías con antígeno de receptor de células T quimérico (CAR-T) la cual ha tenido éxito notable en otro tipo de neoplasia como las de origen hemato linfoide para la cual la FDA tiene aprobados tratamientos y actualmente se encuentran ensayos clínicos en curso para valorar el beneficio en el tratamiento de tumores sólidos basado en esta tecnología (49).

Existen otras líneas de investigación con enfoque en terapia génica enfocados en diferentes sistemas de entrega, tales como viral basados en retrovirus (gamma y lentivirus), los vectores adenovirales se utilizan por su alto tropismo hacia células específicas (50). Por otro lado, también se estudian los sistemas de entrega no virales enfocados en complejos lipídicos y catiónicos, ambos sistemas de entrega prometen alta especificidad de los agentes terapéuticos, minimizando los efectos secundarios con respecto a la Qt y Rt (50). Otro enfoque de la terapia génica se enfoca en tecnología CRISPR/Cas9 en los cuales se estudian modelos celulares de sarcomas con translocaciones específicas y ciertos estudios muestran reducción importante del crecimiento tumoral mediante la eliminación (knockout) de genes clave (50).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad los SFE constituye un pequeño subgrupo de sarcomas con características particulares que se sobreponen entre sí, siendo un reto su abordaje desde cualquier perspectiva. La epidemiología en México es desconocida y por lo tanto en nuestra región este grupo de sarcomas recategorizados e incluidos en las nuevas guías de la OMS no cuentan con una caracterización propia. A pesar de ser un grupo de tumores raros y de baja prevalencia, los esquemas de tratamiento tradicionales no han modificado la supervivencia de los pacientes en más de 30 años, con múltiples líneas de investigación y ensayos clínicos en curso en el presente, es importante conocer cuál es el comportamiento biológico de estos tumores en nuestra población de estudio.

3. JUSTIFICACIÓN

Previo a la publicación del libro para la clasificación de los tumores de tejidos blandos de la OMS en 2014 la clasificación de los tumores indiferenciados de células redondas y azules (*Ewing like*) se limitaba a el debut clínico de los pacientes, la edad, localización, características histológicas y escasas alternativas diagnósticas donde los estudios a través de inmunohistoquímica comenzaban a incursionar en esta área particular, sin embargo posterior a la publicación de esa edición se sienta un precedente y se abre un camino hacia la subclasificación de estos tumores donde el panorama molecular utilizando metodologías diversas que van desde subrogados por estudios de IHQ como reacción de cadena de polimerasa (PCR), hibridación inmunofluorescente in situ (FISH) y NGS se le confieren diferentes entidades clínico-patológicas con sus propios grupos moleculares, características clínicas, pronósticas, terapéuticas e histológicas totalmente distintas y desconocidas con respecto a lo previamente descrito de tal modo que el abordaje de estas neoplasias tanto clínico como diagnóstico actualmente se encuentra en una transición sin precedentes.

La mayoría de los estudios y publicaciones en la literatura mundial son realizados en poblaciones con características fenotípicas y sociodemográficas diferentes a la población latinoamericana. Actualmente no se cuenta con datos sólidos en base a las nuevas clasificaciones inmunofenotípicas y moleculares de estas neoplasias en México, por lo que comenzar a caracterizar y categorizar estos casos en un hospital de alta concentración del noreste de México podría sentar un precedente en la frecuencia y diagnóstico preciso de estas

neoplasias que podría repercutir en diversos vértices para su abordaje personalizado, desde el tratamiento y comportamiento biológico hasta el pronóstico que esto conlleva.

4. HIPOTESIS

4.1 Hipótesis alternativa (Hi)

La distribución de los tumores *Ewing like*, clasificados en las nuevas categorías inmunofenotípicas y moleculares es similar a lo descrito en la literatura mundial.

4.2 Hipótesis nula (Hn)

La distribución de los tumores *Ewing like*, clasificados en las nuevas categorías inmunofenotípicas y moleculares difiere de lo descrito en la literatura mundial.

5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

5.1 Principal

- ✓ ¿Qué características inmunofenotípicas e histológicas tienen los tumores *Ewing like* en este centro de alta concentración diagnosticados del 2013 al 2023 en pacientes pediátricos y/o adultos y a que categoría pertenecen de acuerdo con las nuevas clasificaciones?

5.2 Secundarias

- ✓ ¿Cuál es el perfil inmunofenotípico de los casos recolectados?
- ✓ ¿Existe correlación entre las características histológicas, inmunofenotipo y las variables demográficas contempladas de este estudio?
- ✓ ¿Qué porcentaje de casos fueron previamente diagnosticados como Sarcoma de Ewing u otro diagnóstico y ahora se categorizaron en otro grupo de la nueva clasificación?

6. OBJETIVOS

6.1 General

1. Recategorizar este grupo de neoplasias de acuerdo con la clasificación más reciente de la OMS.

6.2 Específicos

1. Analizar la expresión de los marcadores CD99, NKX 2.2, WT1, FLI1, BCOR, SATB2, Ciclina D1 basados en técnicas de inmunohistoquímica además de los rearrreglos en los genes EWSR1 y CIC por medio de FISH break apart en biopsias fijadas y parafinizadas de tumores con características histológicas “*Ewing like*” en pacientes diagnosticados de los años 2013 al 2023 en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” Mty. N.L para realizar una categorización inmunofenotípica más amplia y correlacionar con sus características histológicas, variables demográficas contempladas en este estudio y diagnósticos iniciales.
2. Comparar nuestros resultados con los datos publicados en la literatura publicada y el National Institute of Health (NIH) a través de plataformas de análisis de enriquecimiento funcional de redes de interacción proteína-proteína (STRING).
3. Proponer un algoritmo diagnóstico compacto con alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de este grupo de neoplasias en nuestro medio.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Tipo y diseño de estudio

Estudio retrospectivo transversal observacional en donde analizará el perfil inmunofenotípico y a que grupos de las nuevas clasificaciones pertenecen todos los tumores diagnosticados como indiferenciados de células redondas pequeñas y azules (*Ewing like*) del 2013 al 2023 en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” Mty. N.L.

7.2 Tamaño mínimo de la muestra

Tamaño de muestra

El tamaño de la muestra se calculó tomando como referencia las estadísticas del GLOBOCAN más recientes publicadas en el año 2020 y el trabajo de Machado Isidro et al. Se utilizó el software CDC *epi info*TM mediante muestreo aleatorio obteniendo una n: 54 casos que brinda un nivel de confianza del 99.99 % (10, 51, 52). La N fue de 152 casos de los cuales 102 cumplieron los criterios de inclusión y exclusión del protocolo y 6 se perdieron en el proceso del estudio, considerando un total de 96 casos para la muestra final (n) (Tabla 1).

7.3 Variables

7.3.1 Características demográficas

- Edad al momento del diagnóstico.
- Fecha de diagnóstico.
- Sexo.
- Diagnóstico inicial.

7.3.2 Características de la neoplasia

- Sitio del tumor
 - Hueso.
 - Tejidos blandos.
 - Órgano sólido.
- Características histológicas
 - Patrón clásico.
 - Patrón rabdoide.
 - Patrón de tumor neuroectodermico primitivo (PNET).
 - Patrón fuso celular.
 - Patrón reticular/fusocelular en un trasfondo mixoide-hialinizado.
 - Patrón anidado-epitelioide.
 - Patrón mixoide.

- Patrón fusocelular estoriforme/arremolinado.
- Patrón Ewing Atípico.
- Patrón Indiferenciado/pleomórfico.
- Patrón células redondas, lobulado con estroma esclerosante y/o cambios mixoides.

7.3.3 Variables independientes

- CD 99.
- NKX 2.2.
- FLI-1.
- WT-1.
- BCOR.
- SATB2.
- Ciclina D1.
- CIC.
- EWSR1.

7.3.4 Terceras variables

- Tumores con morfología Ewing like que se pudieron diagnosticar en base a nuestro panel de marcadores.
- Tumores con morfología de células redondas que se reclasificaron en las nuevas categorías.
- Tumores diagnosticados en los que los estudios de FISH fueron esenciales.

7.4 Tipo y técnica de muestreo

Aspectos para evaluar del perfil de expresión de los marcadores:

- Resultados de la tinción para los anticuerpos monoclonales seleccionados CD 99, NKX 2.2, FLI-1, WT-1, BCOR, SATB2, Ciclina D1.
- Expresión o no expresión.
- Patrón de expresión e intensidad.
- Perfil de expresión de acuerdo con una categoría específica.

- Prueba de FISH con rearrreglo presente, ausente o amplificación.

7.5 Criterios de selección

7.5.1 Criterios de inclusión

- Pacientes de los cuales se encuentre en el archivo del departamento de patología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” las biopsias parafinizadas con material para el estudio de los marcadores contemplados.
- Diagnóstico realizado entre los años 2013-2023.
- Bloques de parafina y calidad de tejido adecuada para realizar Microarreglos de tejidos (TMA) y los marcadores diagnósticos a través de estudios de inmunohistoquímica y FISH.

7.5.2 Criterios de exclusión

- Tumores que cumplan con los criterios de inclusión pero que cuenten con estudio molecular (FISH) con re-arreglos genómicos que descarten la agrupación en las categorías establecidas.
- Ausencia de laminillas y bloques adecuados para su evaluación y realización de pruebas por inmunohistoquímica e hibridación fluorescente in situ.

7.6 Realización del estudio

7.6.1 Muestras del estudio y preparación de muestra

Inicialmente se realizó una búsqueda exhaustiva de las laminillas con las muestras de los pacientes previamente seleccionados de la base de datos y registro del archivo del departamento de patología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” con previo diagnóstico de Sarcoma de Ewing, tumor con morfología de células redondas o similar a Ewing de los años 2013 a 2023, posteriormente se obtuvieron los bloques en los cuales se realizaron los TMA necesarios para las pruebas de inmunohistoquímica con los anticuerpos monoclonales (mAB) CD99, NKX 2.2, WT1, FLI1, BCOR, SATB2, Ciclina D1 y las sondas

EWSR1 y CIC por medio de FISH break appart. Los portaobjetos teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) de rutina se evaluaron de acuerdo con los criterios de diagnóstico para tumores de células redondas y azules establecidos por la última edición del libro para diagnóstico de tumores de tejidos blandos y hueso de la Organización Mundial de la Salud para su idoneidad y ser incluidos en un TMA (3). De tal modo que se tomaron las laminillas con las secciones más representativas del tumor. Todos los casos se encontraban fijados en formalina suficiente e incluidos en parafina (Figura 1).

7.6.2 Microarreglos de tejidos (TMA)

Para el análisis de los mAB CD99, NKX 2.2, WT1, FLI1, BCOR, SATB2, Ciclina D1 por medio de la técnica de inmunohistoquímica y las sondas EWSR1 y CIC a través de FISH break appart. Se construyó manualmente un TMA con dos áreas tumorales distintas de mayor representación con un diámetro de 4 mm. Se realizaron 10 bloques en los cuales se incluyeron los 96 casos que cumplieron criterios para su estudio. A cada laminilla se le agregó un corte de tejido para control externo de acuerdo con las recomendaciones de las fichas técnicas de los marcadores utilizados.

7.6.3 Estudios de inmunohistoquímica

7.6.3.1 CD99

En cortes de 4 micras y extendidas en laminillas electrocargadas, se dejaron desparafinizando por 4 minutos a 72 grados en horno. Se realizó recuperación antigénica con calor en 10nM de buffer de citrato de sodio, pH 6.0, a 100° C por 64 minutos y posteriormente se dejaron enfriar las laminillas en el buffer por aproximadamente 20 minutos. Se lavó en agua desionizada tres veces por 2 minutos cada vez. Para desactivar la actividad de peroxidasa endógena se aplicó peróxido de hidrógeno al 1% en agua desionizada. Por último, se lavaron en PBS dos veces de 5 minutos cada una. Utilizando una plataforma automática (Ventana BenchMark Ultra), se aplicó el anticuerpo primario Cd99 (BSB-9) (BioSB 1:100) el cual se incubó por 48 minutos y posteriormente se reveló con Ultraview DAB. Se realizó contra tinción con hematoxilina II por 12 minutos y Bluing Reagent por 8 minutos. Todo se realizó de acuerdo con las recomendaciones del proveedor de los marcadores.

7.6.3.2 Nkx 2.2

En cortes de 4 micras y extendidas en laminillas electrocargadas, se dejaron desparafinizando por 4 minutos a 72 grados en horno. Se realizó recuperación antigénica con calor en 10nM de buffer de citrato de sodio, pH 6.0, a 100° C por 64 minutos y posteriormente se dejaron enfriar las laminillas en el buffer por aproximadamente 20 minutos. Se lavó en agua desionizada tres veces por 2 minutos cada vez. Para desactivar la actividad de peroxidasa endógena se aplicó peróxido de hidrógeno al 1% en agua desionizada. Por último, se lavaron en PBS dos veces de 5 minutos cada una. Utilizando una plataforma automática (Ventana BenchMark Ultra), se aplicó el anticuerpo primario Nkx 2.2 (EP336) (BioSB 1:50) el cual se incubó por 48 minutos y posteriormente se reveló con Optiview DAB. Se realizó contra tinción con hematoxilina II por 12 minutos y Bluing Reagent por 8 minutos. Todo se realizó de acuerdo con las recomendaciones del proveedor de los marcadores.

7.6.3.3 WT-1

En cortes de 4 micras y extendidas en laminillas electrocargadas, se dejaron desparafinizando por 4 minutos a 72 grados en horno. Se realizó recuperación antigénica con calor en 10nM de buffer de citrato de sodio, pH 6.0, a 100° C por 64 minutos y posteriormente se dejaron enfriar las laminillas en el buffer por aproximadamente 20 minutos. Se lavó en agua desionizada tres veces por 2 minutos cada vez. Para desactivar la actividad de peroxidasa endógena se aplicó peróxido de hidrógeno al 1% en agua desionizada. Por último, se lavaron en PBS dos veces de 5 minutos cada una. Utilizando una plataforma automática (Ventana BenchMark Ultra), se aplicó el anticuerpo primario WT-1 (6F-H2) (BioSB 1:100) el cual se incubó por 32 minutos y posteriormente se reveló con Optiview DAB. Se realizó contra tinción con hematoxilina II por 12 minutos y Bluing Reagent por 8 minutos. Todo se realizó de acuerdo con las recomendaciones del proveedor de los marcadores.

7.6.3.4 FLI-1

En cortes de 4 micras y extendidas en laminillas electrocargadas, se dejaron desparafinizando por 4 minutos a 72 grados en horno. Se realizó recuperación antigénica con calor en 10nM de buffer de citrato de sodio, pH 6.0, a 100° C por 92 minutos y posteriormente se dejaron enfriar las laminillas en el buffer por aproximadamente 20 minutos. Se lavó en agua desionizada tres veces por 2 minutos cada vez. Para desactivar la actividad de peroxidasa endógena se aplicó peróxido de hidrógeno al 1% en agua desionizada. Por último, se lavaron

en PBS dos veces de 5 minutos cada una. Utilizando una plataforma automática (Ventana BenchMark Ultra), se aplicó el anticuerpo primario Fli-1 (G146-222) (BioSB 1:50) el cual se incubó por 32 minutos y posteriormente se reveló con Optiview DAB. Se realizó contra tinción con hematoxilina II por 12 minutos y Bluing Reagent por 8 minutos. Todo se realizó de acuerdo con las recomendaciones del proveedor de los marcadores.

7.6.3.5 BCOR

En cortes de 4 micras y extendidas en laminillas electrocargadas, se dejaron desparafinando por 4 minutos a 72 grados en horno. Se realizó recuperación antigénica con calor en 10nM de buffer de citrato de sodio, pH 6.0, a 100° C por 40 minutos y posteriormente se dejaron enfriar las laminillas en el buffer por aproximadamente 20 minutos. Se lavó en agua desionizada tres veces por 2 minutos cada vez. Para desactivar la actividad de peroxidasa endógena se aplicó peróxido de hidrógeno al 1% en agua desionizada. Por último, se lavaron en PBS dos veces de 5 minutos cada una. Utilizando una plataforma automática (Ventana BenchMark Ultra), se aplicó el anticuerpo primario BCOR (BSB-128) (BioSB 1:25) el cual se incubó por 48 minutos y posteriormente se reveló con Optiview DAB aplicando OV amp H202 durante 8 minutos, OV amplifier durante 8 minutos y OV amp multimeter durante 8 minutos. Se realizó contra tinción con hematoxilina II por 12 minutos y Bluing Reagent por 8 minutos. Todo se realizó de acuerdo con las recomendaciones del proveedor de los marcadores.

7.6.3.6 SATB2

En cortes de 4 micras y extendidas en laminillas electrocargadas, se dejaron desparafinando por 4 minutos a 72 grados en horno. Se realizó recuperación antigénica con calor en 10nM de buffer de citrato de sodio, pH 6.0, a 100° C por 62 minutos y posteriormente se dejaron enfriar las laminillas en el buffer por aproximadamente 20 minutos. Se lavó en agua desionizada tres veces por 2 minutos cada vez. Para desactivar la actividad de peroxidasa endógena se aplicó peróxido de hidrógeno al 1% en agua desionizada. Por último, se lavaron en PBS dos veces de 5 minutos cada una. Utilizando una plataforma automática (Ventana BenchMark Ultra), se aplicó el anticuerpo primario SATB2 (EP-281) (BioSB 1:100) el cual se incubó por 32 minutos y posteriormente se reveló con Ultraview DAB. Se realizó contra tinción con hematoxilina II por 12 minutos y Bluing Reagent por 8 minutos. Todo se realizó de acuerdo con las recomendaciones del proveedor de los marcadores.

7.6.3.7 Ciclina-D1

En cortes de 4 micras y extendidas en laminillas electrocargadas, se dejaron desparafinando por 4 minutos a 72 grados en horno. Se realizó recuperación antigénica con calor en 10nM de buffer de citrato de sodio, pH 6.0, a 100° C por 92 minutos y posteriormente se dejaron enfriar las laminillas en el buffer por aproximadamente 20 minutos. Se lavó en agua desionizada tres veces por 2 minutos cada vez. Para desactivar la actividad de peroxidasa endógena se aplicó peróxido de hidrógeno al 1% en agua desionizada. Por último, se lavaron en PBS dos veces de 5 minutos cada una. Utilizando una plataforma automática (Ventana BenchMark Ultra), se aplicó el anticuerpo primario Ciclina D1 (SP4-R) (Ventana 30µl) el cual se incubó por 32 minutos y posteriormente se reveló con Ultraview DAB. Se realizó contra tinción con hematoxilina II por 12 minutos y Bluing Reagent por 8 minutos. Todo se realizó de acuerdo con las recomendaciones del proveedor de los marcadores.

7.6.4 Hibridación por inmunofluorescencia in situ (FISH)

Los estudios de FISH se realizaron en bloques embebidos en parafina de cada caso. Brevemente, las secciones embebidas en parafina de 4 micrómetros de espesor se desparafinaron y pretrataron. Después de la desparafinación y rehidratación, los portaobjetos se trataron con ácido en HCl 0,2 M durante 20 minutos, se lavaron en 2x SSC (citrato de sodio), se colocaron en tiocianato de sodio al 8,1%, se lavaron en 2x SSC, se digirieron en pepsina durante 15 minutos, se lavaron en 2 SSC, y se fijó en formol neutro tamponado al 4%. Los portaobjetos se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95° C y luego se hibridaron con las sondas EWSR1 (Vysis) y CIC (Zytovision) que se diluyeron 1:10 en tampón de hibridación de sonda Denhyb (In situs) y luego se incubó durante la noche (14 a 16 h) a 37° C. La sonda EWSR1 se compone de una sonda marcada con fluor naranja de 497 kb para 22q12 y una sonda marcada con flúor verde de 1100 kb para la región centromérica del cromosoma 22. La sonda CIC de una sonda marcada con flúor naranja de 770 kb para 19q13.2 y una sonda marcada con flúor verde de 540 kb para la región centromérica del cromosoma 19. La sonda BCOR se compone de una sonda marcada con flúor naranja de 600 kb para Xp11.12 y una sonda marcada con fluor verde de 500 kb para la región centromérica del cromosoma X (Xp 11.14) Después de la incubación, los portaobjetos se lavaron a temperatura ambiente 1 minuto con enjuague rápido dH2O (ready to use) y posteriormente

se lavó durante 2 minutos en 0,4 SSC / 0,3% de NP40 a 72° C. Después del secado al aire, los portaobjetos se contra tiñeron usando solución DAPI/ Fluorguard y luego se cubrieron con un cubreobjetos, todo se realizó de acuerdo con las recomendaciones del proveedor de los marcadores.

7.7 Análisis de la expresión de los anticuerpos por inmunohistoquímica

7.7.1 CD99

La tinción se valoró en las células tumorales, tomando como positiva la tinción de membrana, nuclear o citoplasmática. El valor negativo se asignó a células sin tinción; una cruz tinción débil e incompleta de membrana; dos cruces tinción delgada continua de membrana; tres cruces tinción completa reforzada de la membrana. Se tomará en cuenta positividad si se encuentra inmunorreactividad en por lo menos el 5% de las células.

7.7.2 NKX 2.2

La interpretación se realizó tomando como positivo la presencia de tinción nuclear, en presencia de positividad tanto en el control externo seleccionado, como del control interno. Aquellos casos con discordancia en la tinción entre los dos cilindros tumorales fueron tomados como negativos, cuando los controles internos si resultaron positivos, esto debido a la posible heterogeneidad zonal en la expresión del marcador. Se cuantifico cualitativamente de acuerdo con la positividad nuclear de las células de la siguiente manera: 0, <5%; 1+, 5-25%; 2+, 25-50%; 3+, 50-75%; o 4+ 75-100%. La intensidad se interpreto de la siguiente manera: débil, moderada, intensa.

7.7.3 WT1

La tinción se valoró en las células tumorales, tomando como positiva la tinción de membrana o citoplasmática. El valor negativo se asignó a células sin tinción; una cruz tinción débil e incompleta de membrana; dos cruces tinción delgada continua de membrana; tres cruces tinción completa reforzada de la membrana. Se tomara en cuenta positividad si se encuentra inmunorreactividad en por lo menos el 5% de las células.

7.7.4 FLI-1

La interpretación se realizó tomando como positivo la presencia de tinción nuclear, en presencia de positividad tanto en el control externo seleccionado, como del control interno. Aquellos casos con discordancia en la tinción entre los dos cilindros tumorales fueron tomados como negativos, cuando los controles internos si resultaron positivos, esto debido a la posible heterogeneidad zonal en la expresión del marcador. Se cuantifico cualitativamente de acuerdo con la positividad nuclear de las células de la siguiente manera: 0, <5%; 1+, 5-25%; 2+, 25-50%; 3+, 50-75%; o 4+ 75-100%. La intensidad se interpreto de la siguiente manera: débil, moderada, intensa.

7.7.5 BCOR

La interpretación se realizó tomando como positivo la presencia de tinción nuclear, en presencia de positividad tanto en el control externo seleccionado, como del control interno. Aquellos casos con discordancia en la tinción entre los dos cilindros tumorales fueron tomados como negativos, cuando los controles internos si resultaron positivos, esto debido a la posible heterogeneidad zonal en la expresión del marcador. Se cuantifico cualitativamente de acuerdo con la positividad nuclear de las células de la siguiente manera: 0, <5%; 1+, 5-25%; 2+, 25-50%; 3+, 50-75%; o 4+ 75-100%. La intensidad se interpretó de la siguiente manera: débil, moderada, intensa.

7.7.6 SATB2

La interpretación se realizó tomando como positivo la presencia de tinción nuclear, en presencia de positividad tanto en el control externo seleccionado, como del control interno. Aquellos casos con discordancia en la tinción entre los dos cilindros tumorales fueron tomados como negativos, cuando los controles internos si resultaron positivos, esto debido a la posible heterogeneidad zonal en la expresión del marcador. Se cuantifico cualitativamente de acuerdo con la positividad nuclear de las células de la siguiente manera: 0, <5%; 1+, 5-25%; 2+, 25-50%; 3+, 50-75%; o 4+ 75-100%. La intensidad se interpreto de la siguiente manera: débil, moderada, intensa.

7.7.7 Cyclina D1

La interpretación se realizó tomando como positivo la presencia de tinción nuclear, en presencia de positividad tanto en el control externo seleccionado, como del control interno. Aquellos casos con discordancia en la tinción entre los dos cilindros tumorales fueron tomados como negativos, cuando los controles internos si resultaron positivos, esto debido a la posible heterogeneidad zonal en la expresión del marcador. Se cuantifico cualitativamente de acuerdo con la positividad nuclear de las células de la siguiente manera: 0, <5%; 1+, 5-25%; 2+, 25-50%; 3+, 50-75%; o 4+ 75-100%. La intensidad se interpreto de la siguiente manera: débil, moderada, intensa.

7.8 Análisis de los estudios de inmunofluorescencia FISH Break Apart.

7.8.1 EWSR1

Se utilizó la sonda Vysis™ LSI EWSR1 (22q12) Dual Color, para la prueba de rearrreglos Break Apart. En la interpretación de los resultados en una célula anormal con una t(22q12) simple, se esperará un patrón de señales fusión de señales en al menos una célula, una verde y una naranja. En una célula normal que carezca de una t(22q12) en la región del gen EWSR1, se observará un patrón de señal de dos fusiones que reflejará las dos copias intactas de EWSR1. Si al menos 20 células muestran un patrón anormal se tomará como positivo el rearrreglo.

7.8.2 CIC

Se utilizó la sonda Zytovision™ LSI CIC (19q13.2) Dual Color, para la prueba de rearrreglos Break Apart. En la interpretación de los resultados en una célula anormal con una t(19q13.2), se esperará un patrón de señales fusión de señales en al menos una célula, una verde y una naranja. En una célula normal que carezca de una t(19q13.2) en la región del gen CIC, se observará un patrón de señal de dos fusiones que reflejará las dos copias intactas de CIC. Si al menos 20 células muestran un patrón anormal se tomará como positivo el rearrreglo.

8. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

8.1 Definición de las variables

Variable	Concepto	Indicadores	Escala
----------	----------	-------------	--------

Variable independiente	CD99	0 Positivo 1 Negativo	Nominal dicotómica
Variable independiente	NKX 2.2	0 Positivo 1 Negativo	Nominal dicotómica
Variable independiente	FLI-1	0 Positivo 1 Negativo	Nominal dicotómica
Variable independiente	BCOR	0 Positivo 1 Negativo.	Nominal dicotómica
Variable independiente	SATB2	0 Positivo 1 Negativo	Nominal dicotómica
Variable independiente	Ciclina D1	0 Positivo 1 Negativo	Nominal dicotómica
Variable independiente	WT1	0 Positivo 1 Negativo	Nominal dicotómica
Variable independiente	EWSR1 FISH	0 rearreglo presente 1 rearreglo ausente 2 Amplificación 3 Amplificación y rearreglo presentes	Nominal politómica
Variable independiente	CIC FISH	0 rearreglo presente 1 rearreglo ausente 2 Amplificación 3 Amplificación y rearreglo presentes	Nominal politómica
Variable universal	Edad al momento del diagnóstico	0 De 0 meses a 10 años 1 >10 años a 20 años 2 > 20 años a 40 años 3 > 40 años	Nominal de intervalo
Variable universal	Sexo	0 femenino 1 masculino	Nominal politómica
Variable independiente	Sitio tumoral	0 hueso 1 tejidos blandos	Nominal politómica

		2 órgano sólido	
Variable independiente	Subtipo histológico	0 Patrón clásico. 1 Patrón rabdoide. 2 Patrón de tumor neuroectodermico primitivo (PNET). 3 Patrón fuso celular. 4 Patrón reticular/fusocelular en un trasfondo mixoide-hialinizado. 5 Patrón anidado-epitelioide. 6 Patrón mixoide. 7 Patrón fusocelular estoriforme/arremolinado. 8 Patrón Ewing Atípico. 9 Patrón Indiferenciado/pleomórfico. 10 Patrón células redondas, lobulado con estroma esclerosante y/o cambios mixoides.	Nominal politómica
Variable dependiente	Diagnóstico final	1 Sarcoma de Ewing clásico 2 Sarcoma con rearrreglos en CIC 3 Sarcoma con alteraciones en BCOR 4 Mismo diagnóstico inicial (no se reclasifica) 5 Sin diagnóstico concluyente	Nominal politómica
Variable universal	Fecha de diagnostico	1 2013 2 2014 3 2015 4 2016 5 2017	Ordinal numérica

		6 2018 7 2019 8 2020 9 2021 10 2022 11 2023	
Terceras variables	Tumores con morfología Ewing like que se pudieron diagnosticar con este panel	0 Se diagnostica 1 No se diagnostica	Nominal dicotómica
Terceras variables	Tumores con morfología Ewing like que se reclasificaron utilizando este panel	0 Se reclasifica 1 No se reclasifica	Nominal dicotómica
Terceras variables	Tumores diagnosticados en los que los estudios de FISH fueron esenciales	0 FISH esencial 1 FISH no esencial	Nominal dicotómica

8.2 Definición operacional

- ✓ CD 99: *También conocida como MIC-2 o glicoproteína de cadena única de tipo 1, es una proteína humana codificada por el gen CD99. La proteína tiene un peso molecular de 32 kDa. Se expresa en todos los leucocitos, pero sobre todo en los timocitos. Se cree que aumenta la adhesión de las células T y la apoptosis de las células T doblemente positivas. También participa en la migración y la activación (11).*
- ✓ NKX 2.2: *La proteína homeobox NKX2.2 es una proteína codificada por el gen NKX2-2. NKX2.2 es un factor de transcripción que contiene homeodominios y desempeña un papel crítico en la diferenciación neuroendocrina/glial. NKX2.2 se*

expresa en el cerebro anterior y la médula espinal en desarrollo. Desde el punto de vista funcional, se cree que el factor de transcripción que está implicado en el desarrollo neuronal, y la especificación del destino de neuronas y oligodendrocitos. Recientemente se ha informado de que NKX2.2 es un valioso marcador del sarcoma de Ewing (11).

- ✓ *FLI-1: La proteína Fli-1, miembro de la familia ETS de factores de transcripción de unión al ADN está implicada en la proliferación celular y la génesis tumoral. Aproximadamente el 90% de los tumores neuroectodérmicos primitivos/sarcoma de Ewing (ES/PNET) presentan una translocación específica, t(11;22)(q24;q12). Sólo las células endoteliales y los linfocitos pequeños expresan Fli-1 (2).*
- ✓ *WT-1: La proteína del tumor de Wilms (WT1) es un gen supresor localizado en el cromosoma 11p13 (11).*
- ✓ *BCOR: BCOR está localizado en el cromosoma X, en el locus Xp11.4, y deriva su nombre de su función como corepresor de BCL-6 que refuerza la represión transcripcional mediada por BCL-6. BCOR es un gen que codifica para un regulador epigenético que interviene en la especificación de la diferenciación celular (20).*
- ✓ *SATB2: La proteína especial de unión a secuencias ricas en AT 2 (SATB2), también conocida como proteína de unión al ADN SATB2 es una proteína que en humanos está codificada por el gen SATB2. SATB2 se une específicamente a regiones de unión a la matriz nuclear y participa en la regulación transcripcional y la remodelación de la cromatina. SATB2 se ha implicado como causante en el paladar hendido o alto de individuos con síndrome de microdelección 2q32q33 (35, 37).*
- ✓ *Ciclina D1: La ciclina D1, PRAD-1 o bcl-1 es uno de los reguladores clave del ciclo celular, y funciona en asociación con Cdk4 y/o Cdk6 fosforilando la proteína Rb. Es un protooncogén putativo sobre expresado en una amplia variedad de neoplasias humanas, incluidos los linfomas de células del manto (2, 20).*
- ✓ *CIC: La proteína codificada por este gen es un ortólogo del gen capicua de Drosophila melanogaster, y es miembro de la superfamilia de represores transcripcionales de la caja del grupo de alta movilidad (HMG). Esta proteína contiene un dominio HMG conservado que interviene en la unión al ADN y la*

localización nuclear, y un C-terminal conservado. Los estudios sugieren que la región N-terminal de esta proteína interactúa con Atxn1 (34, 46).

- ✓ *EWSR1: Este gen codifica una proteína multifuncional que interviene en diversos procesos celulares, como la expresión génica, la señalización celular y el procesamiento y transporte de ARN. La proteína incluye un dominio de activación transcripcional N-terminal y un dominio de unión a ARN C-terminal. Las translocaciones cromosómicas entre este gen y varios genes que codifican factores de transcripción dan lugar a la producción de proteínas quiméricas implicadas en la génesis tumoral. Estas proteínas quiméricas suelen consistir en el dominio de activación transcripcional N-terminal de esta proteína fusionado al dominio de unión al ADN C-terminal de la proteína del factor de transcripción. Se sabe que las mutaciones en este gen, concretamente una translocación $t(11;22)(q24;q12)$, causan el sarcoma de Ewing, así como tumores neuroectodérmicos y otros tumores diversos (9).*
- ✓ *Sarcoma de Ewing: El sarcoma de Ewing (SE) es un tumor agresivo de adolescentes y adultos jóvenes, que constituye entre el 10% y el 15% de todos los sarcomas óseos. James Ewing lo describió por primera vez en 1921, y representa el sarcoma de Ewing óseo "clásico", el sarcoma de Ewing extra esquelético, el tumor maligno de células pequeñas de la pared torácica (tumor de Askin) y los tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET) de partes blandas. Estos sarcomas se originan a partir de células progenitoras mesenquimales únicas debido a sus características histológicas e inmunohistoquímicas similares (39, 40).*
- ✓ *Diagnóstico inicial: Diagnóstico que se emitió inicialmente a la biopsia enviada.*
- ✓ *Subtipo histológico: Características morfológicas que en conjunto definen una variedad histológica.*
- ✓ *Edad al momento del diagnóstico: Edad que tiene el paciente cuando se diagnosticó.*
- ✓ *Fecha de diagnóstico: Fecha definida por día mes y año del momento en que se hizo el diagnóstico.*
- ✓ *Sexo: Conjunto de las peculiaridades que caracterizan los individuos de una especie dividiéndolos en masculinos y femeninos.*
- ✓ *Sitio tumoral: Sitio anatómico de origen primario del tumor.*

9. ANALISIS ESTADISTICO

Todos los análisis estadísticos se realizarán en un equipo computacional con el software Microsoft office 2021, Microsoft Excel 2021 e IBM Statistics SPSS 25. En el caso de estadísticas descriptivas para variables demográficas y categóricas se reportaron eventos y porcentajes. El nivel de significancia se establecerá en 0.05 y el tamaño de muestra estará determinado por prueba de proporciones simples con un poder estadístico de 99.99% para un tamaño mínimo de muestra de 54. El IC del 95% se proporcionará en estadística descriptiva para cambios en el tiempo para variables continuas. Además, en el apartado de estadística inferencial se realizará análisis bivariado de asociación entre variables independientes a través de la prueba de X^2 cuadrada de Pearson, prueba exacta de Fisher (dependiendo el escenario estadístico) de acuerdo a los grupos establecidos. También se realizó el coeficiente de contingencia para ver el grado de asociación de las variables independientes con los grupos establecidos, además de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para observar la utilidad de los marcadores de inmunohistoquímica y pruebas de FISH con respecto a los grupos diagnósticos.

10. CONSIDERACIONES ETICAS

De acuerdo con el *Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud*, en su artículo 17; los términos de este protocolo se consideran de “Investigación sin riesgo”, para el paciente, ya que es un estudio que empleará técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos.

Además, no se realizará ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participen en el estudio.

Es congruente, con lo estipulado por la Norma Oficial Mexicana (NOM-012-SSA3-2012), Que establece los *criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos*.

Debido a que no se realizará intervención alguna con las variables de los pacientes, no será necesario acudir con cada uno de los pacientes y extenderles un consentimiento informado,

de igual forma tomando en cuenta que por la particular situación de la patología en la que se centra el proyecto no se podrían obtener los consentimientos de los pacientes a los que les pertenecen las muestras actualmente por la alta mortalidad que representa. De acuerdo con las normas y reglamentos anteriormente mencionados, es necesaria únicamente la aprobación por el comité de ética para poner en marcha el presente protocolo. De acuerdo con la *Declaración de Helsinki* en materia de confidencialidad, en este protocolo se tomarán toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participa en la investigación y la confidencialidad de su información personal, respetando siempre los principios de Autonomía, Justicia, Benevolencia y no maleficencia.

11. CRONOGRAMA

No	Actividad	Ago-Sep 2022	Oct-Nov 2022	Dic-Ene 2022/2023	Feb-Mar 2023	Abr-May 2023	Jun-Jul 2023	Ago-Sep 2023	Oct-Nov 2023	Dic-Ene 2023/2024	Feb/Jun 2024	Jul/Dic 2024	Ene/Feb 2025
1	Redacción de la pregunta de investigación.												
2	Búsqueda de bibliografía y revisión basado en el contexto de estudio.												
3	Estructuración del marco teórico												
4	Redacción de hipótesis, objetivos, planteamiento del problema y justificación.												
5	Diseño de investigación, materiales y métodos, variables, muestra, instrumentos, consideraciones éticas, criterios de selección.												
6	Elaboración de base de datos de muestras y las variables, datos clínicos, operacionalización de las variables												
7	Técnicas y procedimientos												
8	Procesamiento de la información.												

9	Análisis estadístico de los resultados.													
10	Redacción de informe de resultados													
11	Redacción de tesis y artículo.													

12. RECURSOS

12.1 Recursos Humanos

Se cuenta con la participación directa de 4 personas en este protocolo los cuales cuentan con actividades bien definidas en la planeación, desarrollo y revisión continua.

12.2 Recursos financieros

- Protocolo autofinanciado sin contar con financiamiento de terceros, no existe conflicto de intereses.

12.3 Recursos materiales

- Insumos para la realización de inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia.
- Anticuerpos monoclonales de inmunohistoquímica CD 99, NKX 2.2, FLI-1, WT-1, BCOR, SATB2, Cyclina D1.
- Sonda EWSR1 Break Apart.
- Sonda CIC Break Apart.

Herramientas

- Microscopio óptico.
- Tinciones de histoquímica.
- Tinciones de inmunohistoquímica.
- Micrótopo manual.
- Microscopio de fluorescencia.
- Computadora.
- Procesador de datos Microsoft office 2016, SPSS 25.

- Software de búsqueda

13. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características clínico-patológicas de los Tumores Ewing-like

De los 152 casos contemplados inicialmente, 102 cumplieron los criterios de inclusión-exclusión y 6 se perdieron en el proceso del estudio por lo que se evaluaron un total de 96 casos (Tabla #). Se incluyeron 59 (61.5%) hombres y 37 (38.5%) mujeres, 65 (67.7%) fueron adultos y 31 (32.3%) fueron pediátricos, siendo 18 años el punto de corte para esta distinción. 28 (29.2%) casos estaban localizados en hueso, 60 (62.5%) en tejidos blandos y 8 (8.3%) en órganos profundos. Se incluyeron casos con diagnósticos iniciales que morfológicamente pueden imitar a los Sarcomas de la Familia de Ewing contemplados en las categorías propuestas los cuales se enlistan a continuación: 19 Sarcoma de Ewing/PNET, 18 Sarcomas sinoviales monofásicos, 9 Sarcomas no clasificables (grado intermedio o alto), 8 Liposarcomas mixoides con componente de células redondas, 5 Sarcomas pleomórficos de alto grado (Con diversos patrones histológicos descritos), 4 Rabdomiosarcomas, 3 Sarcomas indiferenciados de células redondas asociados a alteraciones en BCOR (+), 3 Carcinomas sino nasales indiferenciados, 3 Sarcomas primitivos de alto grado (con diferenciación miogénica/neurogénica), 2 Mixofibrosarcomas, 2 TFS malignos, 2 TMVNP, 2 Sarcomas epitelioides, 1 Sarcoma sinovial bifásico, 1 Tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, 1 meduloblastoma metastásico, 1 Liposarcoma des diferenciado, 1 Hepatoblastoma de tipo epitelial fetal, 1 Carcinoma neuroendocrino de células grandes sino nasal, 1 Glioma difuso de alto grado pediátrico, 1 Neuroblastoma indiferenciado, 1 Sarcoma miofibroblástico de bajo grado, 1 Sarcoma de células claras de tejidos blandos, 1 Carcinoma poco diferenciado de células claras, 1 Tumor de Wilms, 1 Liposarcoma esclerosante, 1 Osteosarcoma de células pequeñas, 1 Sarcoma con rearrreglos en CIC y 1 Tumor Leptomeningeo de bajo grado con características morfológicas gliales.

Se diseñaron 5 grupos de acuerdo con los resultados que se podrían obtener después del estudio para cada caso (Figura 2). Utilizando el panel propuesto se pudieron diagnosticar un total de 44 (45.83%) casos, de los cuales se terminaron reclasificando 24 (25%). Los estudios de citogenética (FISH) fueron esenciales para tomar una decisión diagnóstica crítica en 26 casos. De los grupos establecidos se identificaron 21 casos de Sarcoma de Ewing clásico (Grupo 1), 12 casos con rearrreglos en CIC (Grupo 2), 11 casos con alteraciones genéticas en BCOR (Grupo 3), 39 casos mantuvieron su diagnóstico original (Grupo 4), y 13 casos no lograron ser clasificados (Grupo 5). Con respecto a la distribución de los grupos reclasificados el Sarcoma de Ewing clásico constituyo el 48% de los casos, seguido de los sarcomas con rrearreglos en CIC (27%) y finalmente con los Sarcomas con alteraciones genéticas en BCOR (25%). En cuanto a los estudios de citogenética (FISH) para EWSR1 se

encontraron un total de 29 casos con rearrreglos, 1 caso con amplificación y 1 caso con amplificación y rearrreglo presentes, por otra parte, CIC presentó rearrreglos en un total de 13 casos y amplificación en 2 casos (Tablas # y #).

Sarcomas de Ewing clásicos

Se diagnosticaron un total de 21 casos, de los cuales 12 (57.1%) fueron hombres y 9 (42.9%) fueron mujeres, el límite inferior de edad fue de 4 años y el límite superior de 52 años con una media de 21.6 años, 12 (57%) se localizaron en hueso, 9 (42.9%) en tejidos blandos y ningún caso se identificó en órganos sólidos. En cuanto a los patrones morfológicos observados el más frecuente fue el patrón clásico con 12 (57.1%) casos, seguido del PNET con 4 (19%), Ewing atípico con 3 (14.3%) y fuso celular con 1 (4.8%) (Tabla #).

Perfil de inmunohistoquímica y citogenética (Sarcomas de Ewing clásico)

CD99 fue positivo en el 100% de los casos, NKX2.2 en 19 (90.5%) casos, FLI-1 en el 100% de los casos, WT-1 en 1 (4.8%), BCOR en 1 (4.8%), SATB2 en 3 (14.3%) y Ciclina-D1 en 14 (66.7%). Los 21 casos mostraron rearrreglos en el gen EWSR1 y ninguno mostro rearrreglos en el gen CIC (Tabla #).

Sarcomas con rearrreglos en CIC

Se diagnosticaron un total de 12 casos, de los cuales 10 (83.3%) fueron hombres y 2 (16.7%) fueron mujeres, el límite inferior de edad fue de 4 años y el límite superior de 79 años con una media de 32 años, 2 (16.7%) se localizaron en hueso, 10 (83.3%) en tejidos blandos y ningún caso se identificó en órganos sólidos. En cuanto a los patrones morfológicos observados el más frecuente fue el patrón de células redondas con patrón mixoide/hialinizado con 5 (41.7%) casos, seguido del patrón fuso celular con trasfondo mixoide/hialinizado con 3 (25%), Epitelioides con 2 (16.7%), mixoide y fuso celular con un caso respectivamente (Tabla #).

Perfil de inmunohistoquímica y citogenética (Sarcomas con rearrreglos en CIC)

CD99 fue positivo en el 100% de los casos, ningún caso fue positivo para NKX 2.2, FLI-1 lo fue en todos los casos, WT-1 en 11 (91.7%), BCOR no lo fue en ningún caso, SATB2 en 2 (16.7%) y Ciclina-D1 en 8 (66.7%). Los 12 casos mostraron rearrreglos en el gen CIC y ninguno mostro rearrreglos en el gen EWSR1 (Tabla #).

Sarcomas con alteraciones genéticas en BCOR

Se diagnosticaron un total de 11 casos, de los cuales 5 (45.5%) fueron hombres y 6 (54.5%) fueron mujeres, el límite inferior de edad fue de 3 años y el límite superior de 33 años con una media de 26.4

años, 3 (27%) se localizaron en hueso, 8 (72.7%) en tejidos blandos y ningún caso se identificó en órganos sólidos. En cuanto a los patrones morfológicos observados el más frecuente fue el fuso celular con trasfondo mixoide/hialinizado con 7 (63.6%) casos, los patrones rabdoide, fusocelular, células redondas con estroma mixoide hialinizado y mixoide se encontraron en un caso respectivamente (Tabla #).

Perfil de inmunohistoquímica y citogenética (Sarcomas con alteraciones genéticas en BCOR)

CD99 fue positivo en el 100% de los casos, 3 casos fueron positivos para NKX 2.2, 10 casos fueron positivos para FLI-1 (90.9%), WT-1 en 1 (4.8%), BCOR fue positivo en todos los casos, SATB2 en 4 (36.4%) y Ciclina-D1 en 10 (90.9%). Ninguno de los casos mostró rearrreglos en EWSR1 o CIC (Tabla #).

Discusión

De acuerdo con los hallazgos observados en los 96 casos analizados el panel fue útil para diagnosticar 44 de ellos sin embargo solamente 24 fueron reclasificados, los estudios de FISH fueron esenciales en 29 de los casos, esto se traduce en alrededor del 50% de los casos reclasificados y alrededor de un 25% del total de los casos analizados. En cuanto a las distribuciones encontradas cabe resaltar una diferencia con respecto a lo que se describe en la literatura ya que si bien el mayor porcentaje de los casos perteneció al sarcoma de Ewing y en segundo lugar de frecuencia se encontraban los sarcomas con rearrreglo en CIC, llamó la atención un 21% de los casos que pertenecían al grupo de sarcomas con alteraciones genéticas en BCOR, hasta cierto punto esto difiere relativamente de las frecuencias esperadas, las cuales rondan del 5-15%. Se debe con tomar a consideración que este es un estudio de una única institución de tercer nivel de atención lo cual en sentido práctico podría justificar la proporción encontrada de casos y si el estudio se extendiera a mayores magnitudes esta variabilidad podría estabilizarse y diluirse a una menor proporción de casos con alteraciones genéticas en BCOR.

En cuanto a los aspectos morfológicos y el perfil de inmunohistoquímica los tumores clasificados mostraron una gran variabilidad en la morfología. El sarcoma de Ewing fue el que mostró menos patrones histológicos en contraste con el grupo de sarcomas con alteraciones genéticas asociadas a BCOR que fue el que mostró mayor variabilidad. Con respecto a los sarcomas de Ewing tanto el género como los sitios de presentación van de acorde a lo descrito en la literatura, los sarcomas con alteraciones genéticas en BCOR tuvo una proporción distinta a lo esperado encontrando un porcentaje mayor en mujeres. Al valorarse los niveles de significancia y asociación a través de las pruebas estadísticas descritas se observó que los marcadores de inmunohistoquímica que fueron más significativos para el grupo de Sarcoma de Ewing clásicos fueron CD99, NKX2.2 y EWSR1, para los

sarcomas con el rearrreglos en CIC lo fue WT-1 y CIC, por último, para los sarcomas con alteraciones genéticas en BCOR lo fue el marcador BCOR y la ausencia del rearrreglo en EWSR1. Por otro lado, aunque sea escrito que para el grupo de sarcomas con alteraciones genéticas en BCOR los marcadores SATB2 y Ciclina D-1 pueden ser herramientas para apoyar el diagnóstico cuando no se tiene un estudio de mayor precisión, en este trabajo observamos que realmente no fueron de utilidad ya que fueron marcadores sumamente heterogéneos en su expresión con un porcentaje muy elevado de positividad cruzada entre grupos y una baja especificidad y sensibilidad para este grupo por lo que siguiendo un algoritmo diagnóstico conciso con utilidad diagnóstica. Se propone un algoritmo en el cual podamos abordar estas neoplasias en un estadio avanzado del work-up diagnóstico, el panel muestra una gran sensibilidad y especificidad para discriminar entre estos grupos de neoplasias sin embargo no es útil para el abordaje inicial de una neoplasia de células redondas indiferenciada ya que existen entidades mucho más frecuentes que es obligatorio descartar antes de considerar estas posibilidades donde el contexto clínico y morfológico son indispensables para considerarlas. Por lo que el panel propuesto está compuesto por CD99 ya que es el marcador más sensible que tuvimos sin embargo el menos específico con un valor predictivo negativo del 100%, en un siguiente paso se utilizarían marcadores como NKX2.2, WT-1 y BCOR. En escenarios muy particulares sería de utilidad ascender a un siguiente paso diagnóstico en el que se utilizarían estudios de citogenética (FISH) sobre todo EWSR1 porque no sólo nos permite categorizar los sarcomas de Ewing clásicos sino que su positividad me excluye los otros grupos por lo que se considera un marcador con alto impacto en decisiones diagnósticas críticas incluso sobre el rearrreglo en CIC. Un ejemplo de esto fue un caso que mostraba morfología sumamente heterogénea con un panel previo de marcadores muy amplio el cual mostraba positividad para marcadores de diferentes linajes de diferenciación como miogénica, neurogénica y neuroendocrina, en este caso el rearrreglo para EWSR1 no se encontró sin embargo se observó una amplificación del mismo lo cual se traduce en un probable sarcoma con fusiones EWRS1-no-ETS que justamente pueden mostrar amplificaciones del gen a través de la metodología FISH break appart, sin embargo este no fue posible confirmarlo ya que no contamos en el estudio con las sondas para los subtipos de este grupo que es extremadamente raro. En el panel final propuesto no se incluyen los marcadores SATB2, Ciclina-D1 y FLI-1, debido a las razones comentadas previamente aunado a una muy alta positividad cruzada entre los grupos establecidos, se implementó la utilización de un software para enriquecimiento funcional de proteínas en el cual se mapeó a nivel molecular las vías oncogénicas en las que se podrían relacionar estos casos y se encontró qué a cierto nivel de profundidad en la interacción estas se pueden asociar entre sí traslapándose. Estas interacciones no implican un rearrreglo genómico como tal pero sí podría explicar el por qué se observó una expresión de estas proteínas de forma no esperada en estos grupos.

14. CONCLUSIONES

En conclusión, si bien el diagnóstico de Sarcoma de Ewing es un diagnóstico que siempre se tiene en mente cuando se están abordando neoplasias con una morfología Ewing-like en pacientes pediátricos, al observarse en grupos de edad más avanzada este diagnóstico queda de lado ya que es algo posible pero poco probable. Actualmente la clasificación de sarcomas de tejidos blandos es sumamente compleja y retardora en donde el espectro de morfologías que pueden solaparse entre sí se ha hecho más amplio a través de los años por lo que en este estudio más allá de que describimos y observamos los casos que diagnosticamos en nuestra institución también comprobamos una utilidad específica para acercarnos a un diagnóstico molecular a través de la combinación de marcadores de inmunohistoquímica y citogenéticos en el afán de tener herramientas diagnósticas para este grupo de neoplasias cuando no se tenga acceso a todos los marcadores más novedosos, esto se traduce en un impacto clínico y sobre todo pronóstico en los pacientes por lo que utilizarlo en estadios avanzados del abordaje diagnóstico de estas neoplasias es cuando muestra una mayor utilidad siendo esencial aplicar este panel de forma metódica. Individualmente estos marcadores tienen poco peso específico. Finalmente, esto abre una puerta para una mejor estratificación de los grupos de riesgo entre estos pacientes.

15. ANEXOS

Tamaño de muestra en estudio descriptivo mediante muestreo aleatorio

Nivel de confianza		
80%	6	
90%	10	
95%	14	
97%	17	
99%	24	
99.90%	39	n contemplada:
99.99%	54	96
N	577487	5,197
Frecuencia esperada	0.90%	
IC	5%	

Referencias 7, 25.

Tabla 1. Tamaño de muestra.

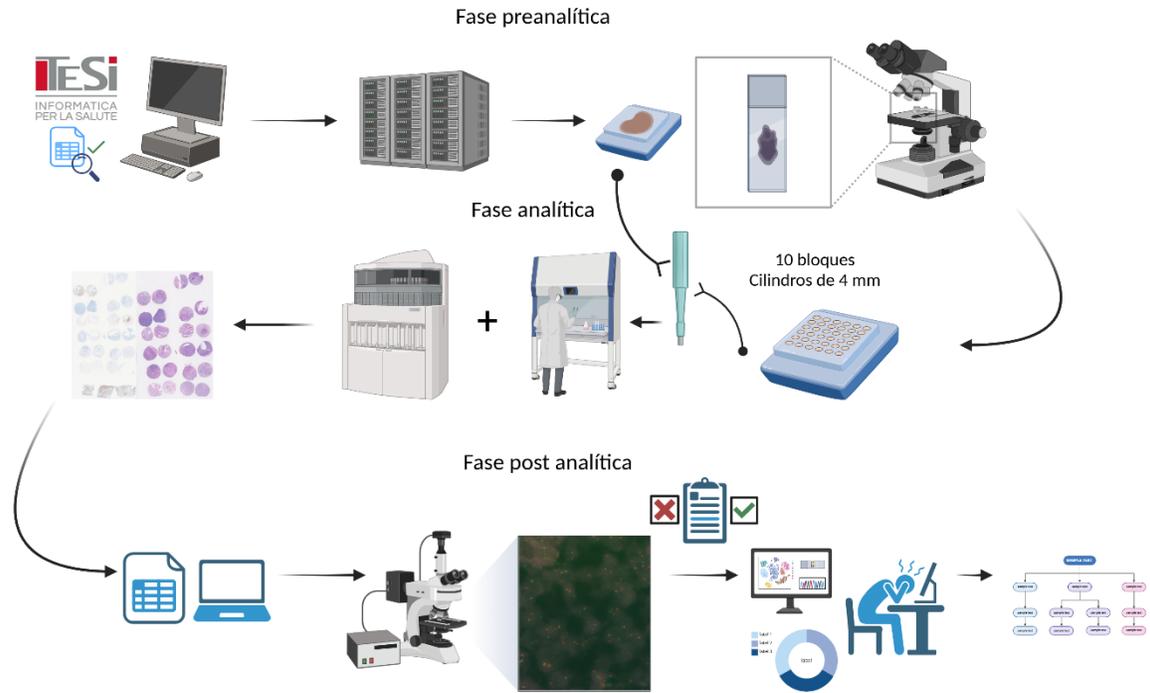


Figura 1. Materiales y métodos. Diagrama del flujo de trabajo.

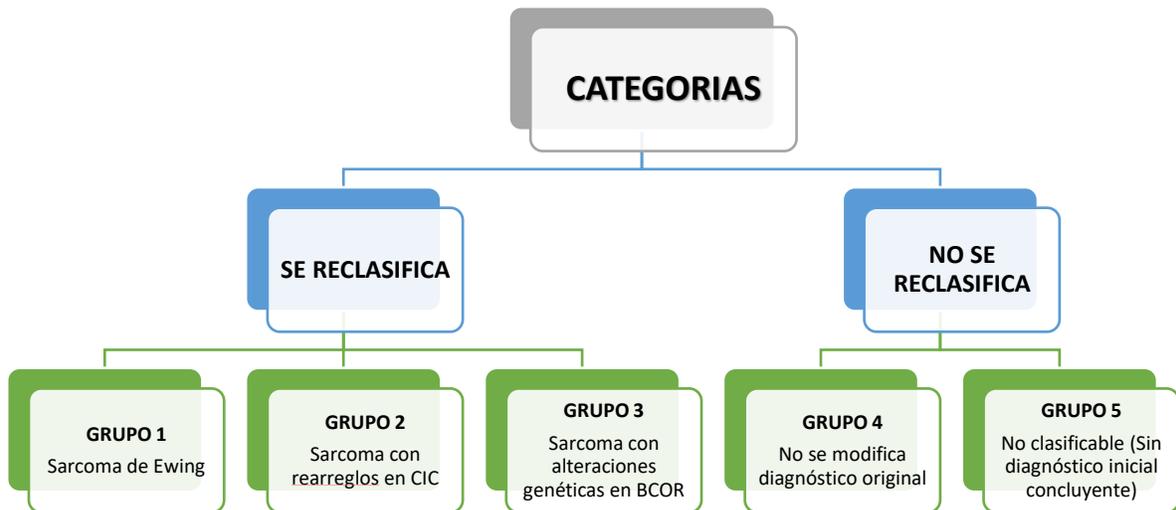


Figura 2. Categorías de diagnóstico finales establecidas.

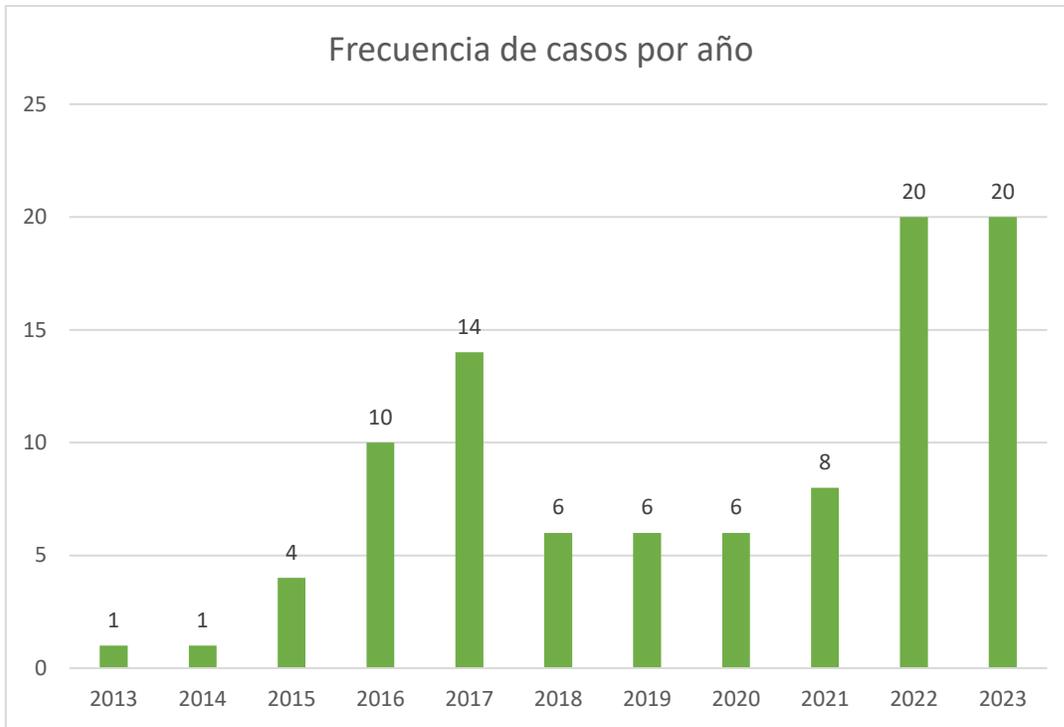


Figura 3. Grafica con la frecuencia de casos recolectados en los últimos 10 años.

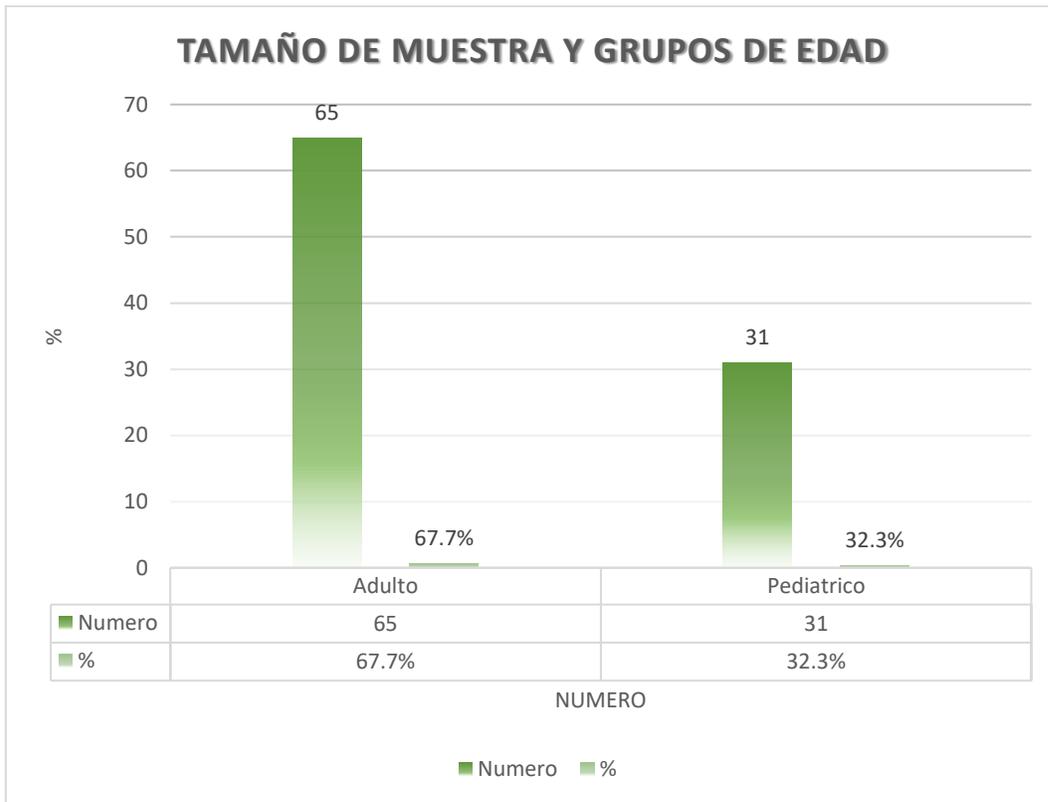


Figura 4. Proporción de casos con relación a los grupos de edad.

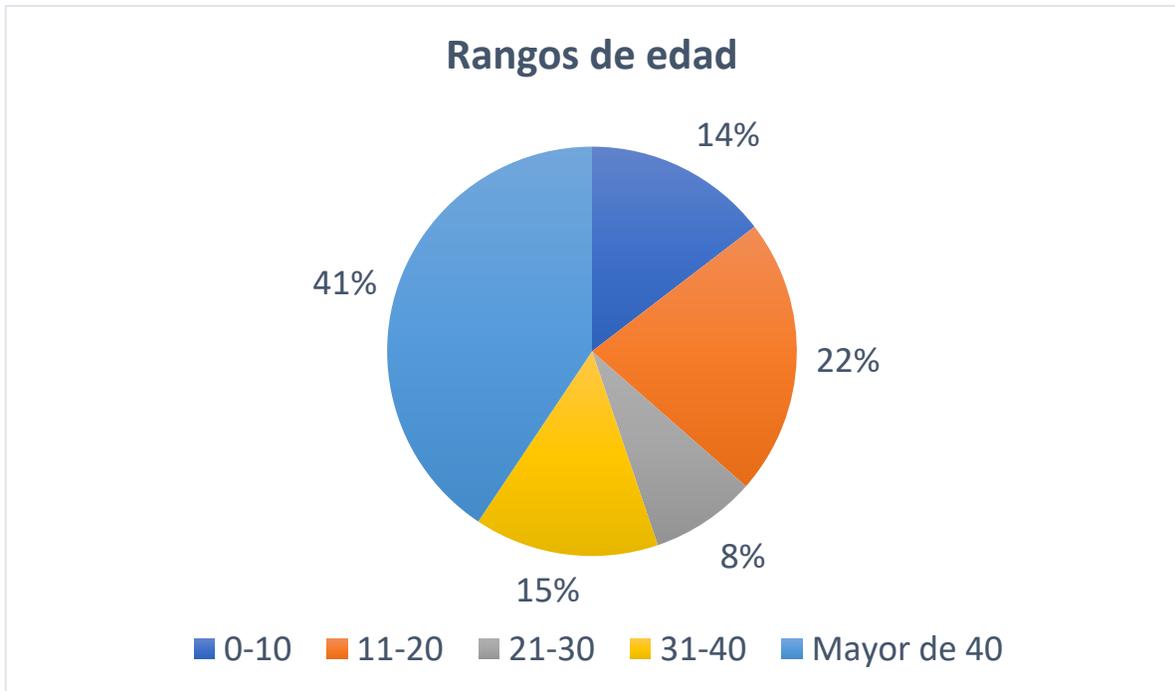


Figura 5. Proporción de casos con relación a rangos de edad.

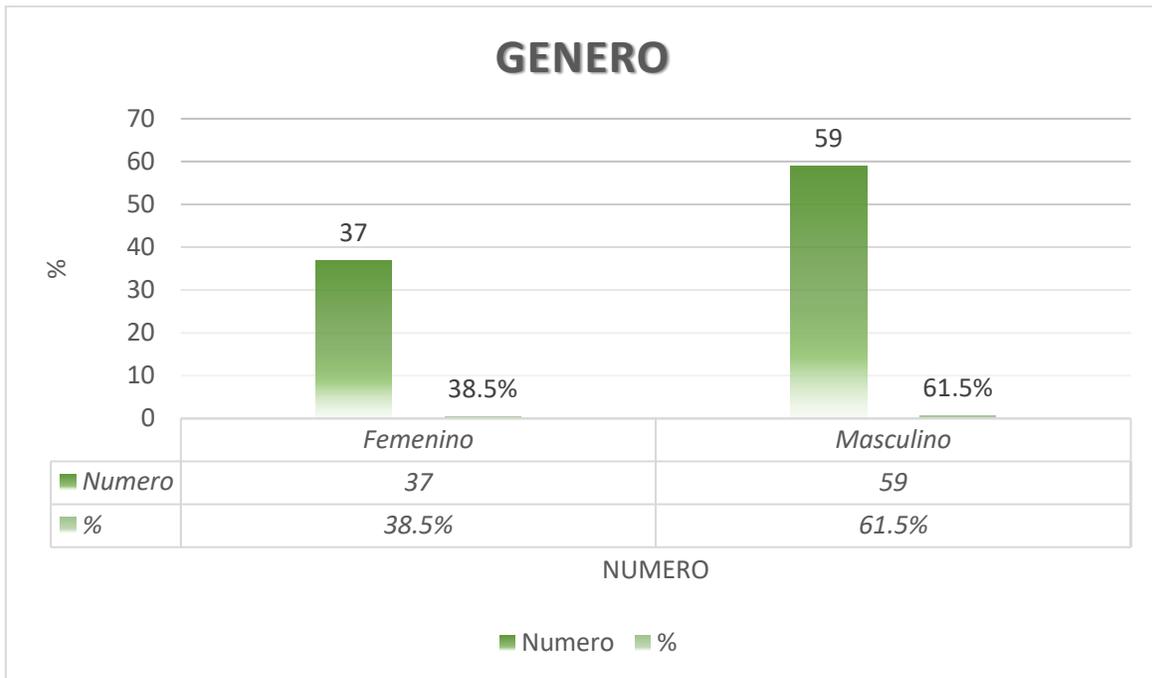


Figura 6. Proporción de casos en relación con el género.

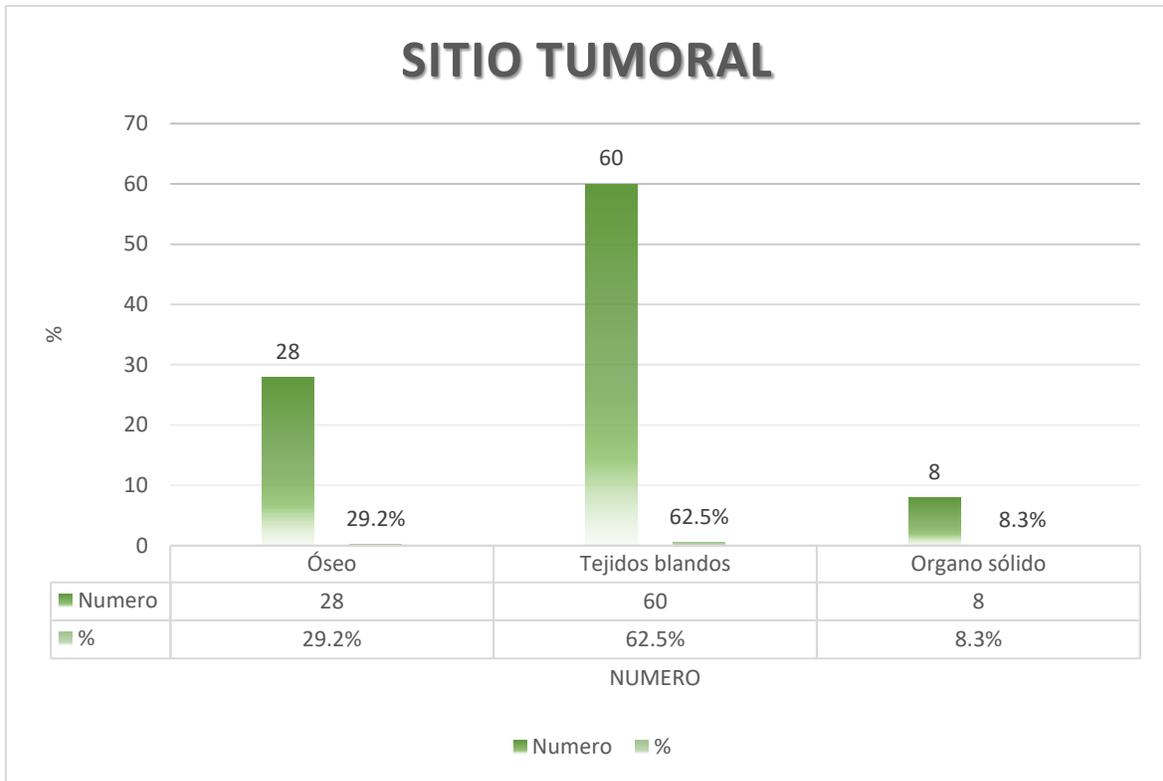


Figura 7. Proporción de casos en relación con el sitio de origen tumoral.

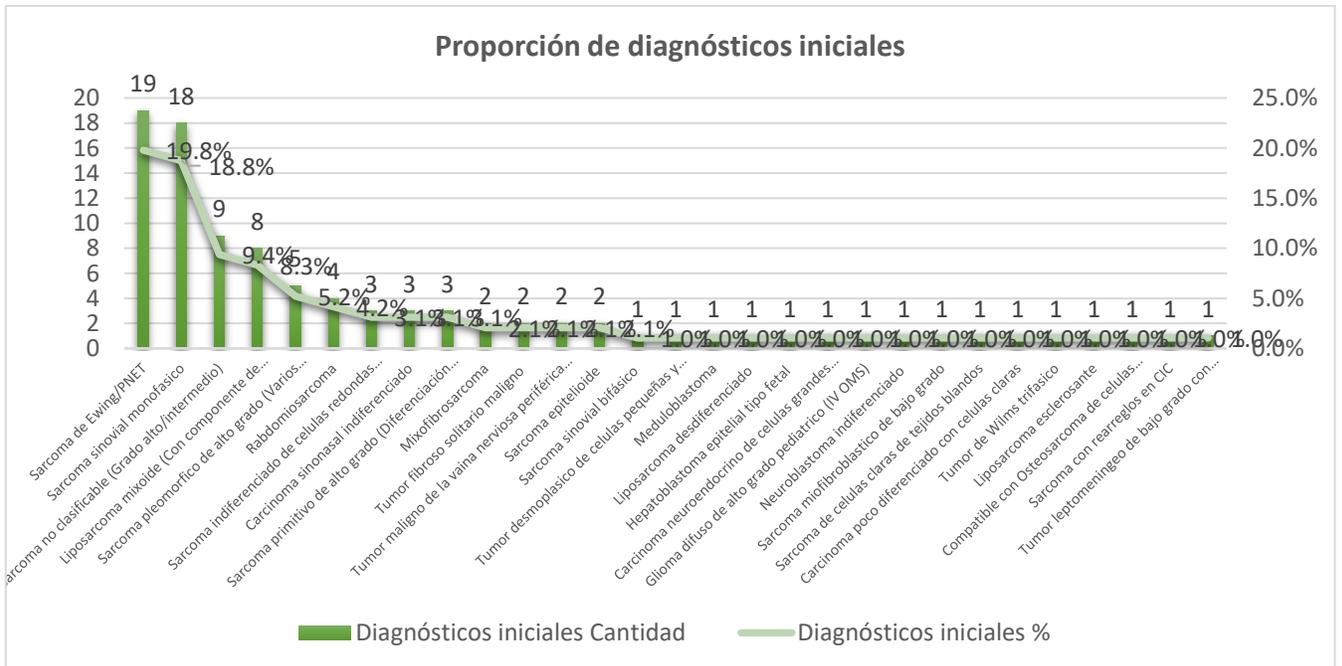


Figura 8. Proporción de casos con relación a los diagnósticos iniciales considerados.

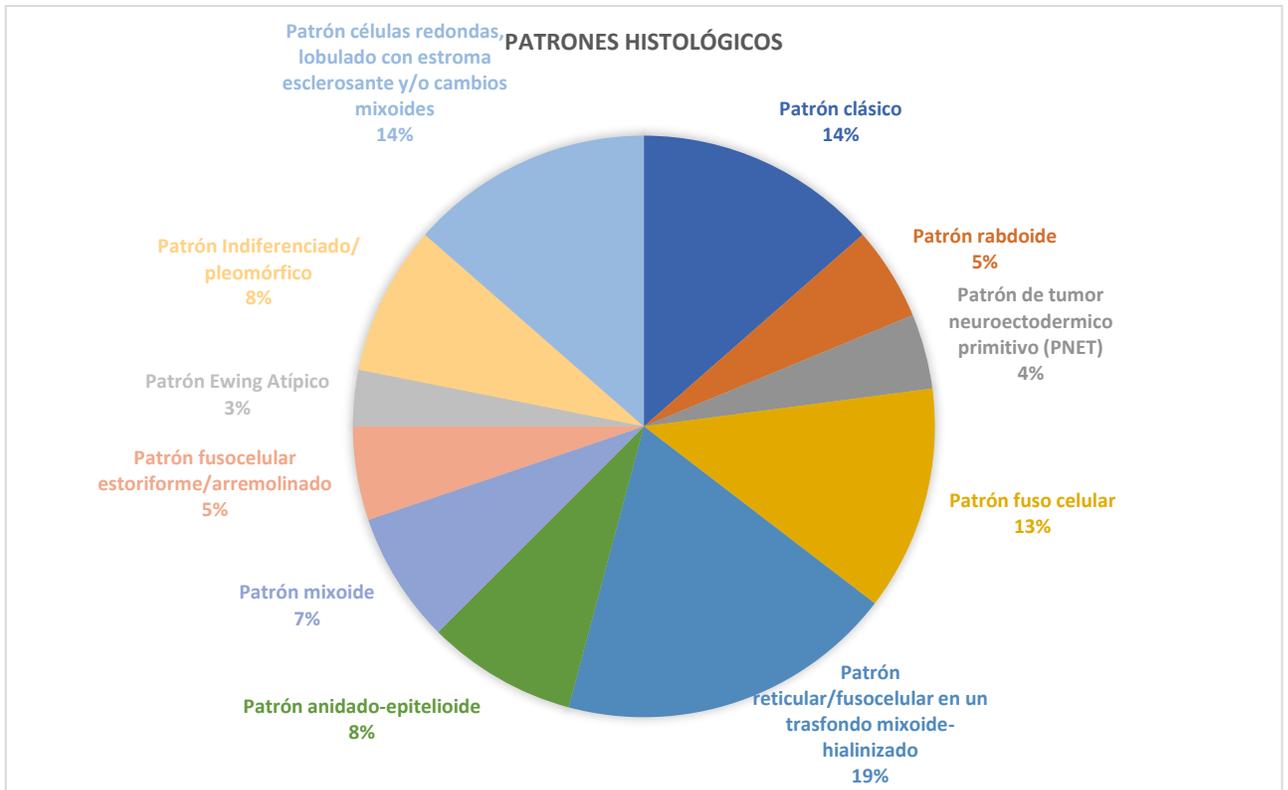


Figura 9. Proporción de casos en relación con el patrón morfológico observado.

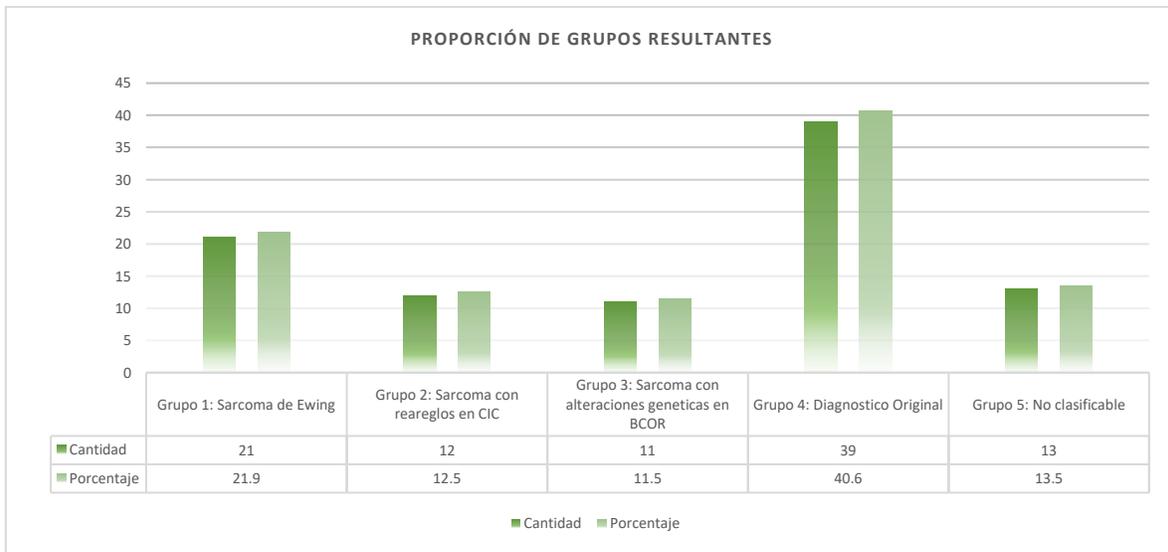


Figura 10. Proporción de casos agrupados en las categorías resultantes finales.

Caracterización de los casos por IHQ (Inmunohistoquímica) e Hibridación fluorescente in situ (FISH)

	IHQ							FISH		
	CD99	NKX2.2	FLI-1	WT-1	BCOR	SATB-2	CICLINA-D1	EWSR1		CIC
								Rearreglo	Amplificación	Rearreglo
Grupo 1	21/21 (100%) ^{19/21} (90.5%)		21/21 (100%)	1/21 (4.8%)	2/21 (9.5%)	3/21 (14.3%)	14/21 (66.7%)	21/21 (100%)	0/21 (0%)	0/21 (0%)
Grupo 2	12/12 (100%)	0/12 (0%)	12/12 (100%) ^{11/12} (91.7%)		0/12 (0%)	2/12 (16.7%)	8/12 (66.7%)	0/12 (0%)	1/12 (8.3%)	12/12 (100%)
Grupo 3	11/11 (100%)	3/11 (27.3%) ^{10/11} (90.9%)		1/11 (4.8%)	11/11(100%)	4/11 (36.4%)	10/11 (90.9%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

Grupo 1: Sarcoma de Ewing clásico. Grupo 2: Sarcoma con rearreglos en CIC. Grupo 3: Sarcoma con alteraciones genéticas en BCOR

Tabla 2. Caracterización de los casos reclasificados a través de estudios de inmunohistoquímica e hibridación fluorescente in situ.

EWSR1 FISH	EWSR1 FISH						
	Rearreglo Presente	GRUPOS					Total
		Grupo 1: Ewing Clásico	Grupo 2: CIC	Grupo 3: BCOR	Grupo 4: Diagnostico Original	Grupo 5: No clasificable	
Rearreglo Presente	21	0	0	4	4	29	
Rearreglo Ausente	0	11	11	35	8	66	
Amplificación	0	0	0	0	0	0	
Amplificación + Rearreglo Presente	0	0	0	0	1	1	
Total	21	12	11	39	13	96	

Tabla 3. Casos que mostraron alguna alteración en EWSR1.

CIC FISH

		GRUPOS					Total
		Grupo 1: Ewing Clásico	Grupo 2: CIC	Grupo 3: BCOR	Grupo 4: Diagnostico Original	Grupo 5: No clasificable	
CIC FISH	Rearreglo Presente	0	12	0	0	0	12
	Rearreglo Ausente	21	0	11	38	12	82
	Amplificación	0	0	0	1	1	2
Total		21	12	11	39	13	96

Tabla 4. Casos que mostraron alguna alteración en CIC.

Características clínico-patológicas			
Sarcoma de Ewing clásico (Grupo 1)			
Genero		<i>n</i>	%
	Hombre	12	57.1%
	Mujer	9	42.9%
<i>Edades (años)</i>			
	Minima	4	
	Maxima	52	
	Media	21.66	
<i>Sitio Tumoral</i>			
	Hueso	12	57.1%
	Tejidos blandos	9	42.9%
	Órgano sólido	0	0.0%
<i>Morfología</i>			
	Patrón clásico	12	57.1%
	PNET	4	19.0%
	Patrón Ewing atípico	3	14.3%
	Patrón Fusocelular	1	4.8%

Tabla 5. Caracterización de los casos clasificados como Sarcoma de Ewing clásico.

Asociación entre marcadores de IHQ y pruebas de FISH con los grupos (Grupo 1)

Prueba estadística	X2 de Pearson		Prueba exacta de Fisher		Coeficiente de contingencia	
	Valor	Significancia asintótica (2 colas)	Significancia exacta (2 colas)	Significancia exacta (1 cola)	Valor	p
<u>IHQ</u>						
CD99	0.283*	0.595	1.000	0.781	0.054	0.595
NKX2.2	54.699	0.000	0.000	0.000	0.602	0.000
FLI-1	1.477*	0.224	0.582	0.282	0.123	0.224
WT-1	12.949	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000
BCOR	2.729*	0.099	0.143	0.082	0.166	0.099
SATB-2	1.646	0.200	0.261	0.159	0.130	0.200
CICLINA-D1	0.000	1.000	1.000	0.597	0.000	1.000
<u>FISH</u>						
EWSR1	62.102	0.000	-	-	0.627	0.000
CIC	4.978	0.083	-	-	-	-

*No se cumple la condición de mas del 80% de las celdas con un valor mayor a 5 por lo que se invalida el valor de x2 y se utiliza la prueba exacta de Fisher.

Tabla 6. Tabla de asociación entre los marcadores realizados y el grupo 1 (Sarcoma de Ewing clásico).

Precisión diagnóstica de marcadores de IHQ por grupos (Grupo 1)				
<u>IHQ</u>	S	E	VPP	VPN
CD99	100%	1.3%	22.1%	100%
NKX2.2	90.5%	90.7%	73.1%	97.1%
FLI-1	100%	6.7%	23.1%	100%
WT-1	4.8%	52.0%	2.7%	66.1%
BCOR	9.5%	73.3%	9.1%	74.3%
SATB-2	14.2%	72.0%	12.5%	75.0%
CICLINA-D1	66.7%	33.3%	21.9%	78.1%

S: Sensibilidad, P: Especificidad, VPP: Valor predictivo positivo, VPN: Valor predictivo negativo.

Tabla 7. Tabla de Precisión diagnóstica de los marcadores de inmunohistoquímica con respecto al grupo 1 (Sarcoma de Ewing clásico).

Características clínico-patológicas			
Sarcoma con rearrreglos en CIC (Grupo 2)			
Genero		n	%
	Hombre	10	83.3%
	Mujer	2	16.7%
Edades (años)	Mínima	4	
	Maxima	79	
	Media	32	
Sitio Tumoral	Hueso	2	16.7%
	Tejidos blandos	10	83.3%
	Órgano sólido	0	0.0%
Morfología	Patrón células redondas con estroma mixoide/hialinizado	5	41.7%
	Patrón fusocelular en un trasfondo mixoide-hialinizado	3	25.0%
	Patrón anidado epiteloide	2	16.7%
	Patrón mixoide	1	8.3%
	Patrón fusocelular	1	8.3%

Tabla 8. Caracterización de los casos clasificados como Sarcomas con rearrreglos en CIC.

Asociación entre marcadores de IHQ y pruebas de FISH con los grupos (Grupo 2)						
Prueba estadística	X2 de Pearson		Prueba exacta de Fisher		Coeficiente de contingencia	
	Valor	Significancia asintótica (2 colas)	Significancia exacta (2 colas)	Significancia exacta (1 cola)	Valor	p
<u>IHQ</u>						
CD99	0.144*	0.704	1.000	0.875	0.039	0.704
NKX2.2	5.094*	0.024	0.032	0.017	0.224	0.024
FLI-1	0.754*	0.385	1.000	0.505	0.088	0.385
WT-1	16.340*	0.000	0.000	0.000	0.381	0.000
BCOR	4.077*	0.043	0.062	0.035	0.202	0.043
SATB-2	0.508*	0.476	0.724	0.378	0.073	0.476
CICLINA-D1	0.000*	1.000	1.000	0.618	0.000	1.000
<u>FISH</u>						
EWSR1	12.448	0.006	-	-	-	-
CIC	87.560	0.000	-	-	0.691	0.000

*No se cumple la condición de más del 80% de las celdas con un valor mayor a 5 por lo que se invalida el valor de x2 y se utiliza la prueba exacta de Fisher.

Tabla 9. Tabla de asociación entre los marcadores realizados y el grupo 2 (Sarcomas con rearrreglos en CIC).

Precisión diagnóstica de marcadores de IHQ por grupos
(Grupo 2)

IHQ	S	E	VPP	VPN
CD99	100%	1.2%	12.6%	100%
NKX2.2	0.0%	69.0%	0.0%	82.9%
FLI-1	100%	6.0%	13.2%	100%
WT-1	91.7%	80.0%	29.7%	98.3%
BCOR	0.0%	73.8%	0.0%	83.8%
SATB-2	16.7%	73.8%	8.3%	86.1%
CICLINA-D1	66.7%	33.3%	12.5%	87.5%

S: Sensibilidad, P: Especificidad, VPP: Valor predictivo positivo, VPN: Valor predictivo negativo.

Tabla 10. Tabla de Precisión diagnóstica de los marcadores de inmunohistoquímica con respecto al grupo 2 (Sarcoma con rearrreglos en CIC).

Características clínico-patológicas Sarcoma con alteraciones genéticas en BCOR (Grupo 3)			
Genero		n	%
Edades (años)	Hombre	5	45.5%
	Mujer	6	54.5%
Sitio Tumoral	Mínima	3	
	Maxima	33	
	Media	26.45	
Morfología	Hueso	3	27.3%
	Tejidos blandos	8	72.7%
	Órgano sólido	0	0.0%
	Patrón fusocelular en un trasfondo mixoide-hialinizado	7	63.6%
	Patrón rabdoide	1	9.1%
	Patrón fusocelular	1	9.1%
	Patrón células redondas con estroma mixoide/hialinizado	1	9.1%
	Patrón mixoide	1	9.1%

Tabla 11. Caracterización de los casos clasificados como Sarcomas con alteraciones genéticas en BCOR.

Asociación entre marcadores de IHQ y pruebas de FISH con los grupos (Grupo 3)						
Prueba estadística	X2 de Pearson		Prueba exacta de Fisher		Coeficiente de contingencia	
	Valor	Significancia asintótica (2 colas)	Significancia exacta (2 colas)	Significancia exacta (1 cola)	Valor	p
<u>IHQ</u>						
CD99	0.131*	0.718	1.000	0.885	0.037	0.718
NKX2.2	0.000*	0.988	1.000	0.619	0.002	0.988
FLI-1	0.379*	0.538	0.463	0.463	0.063	0.538
WT-1	4.549*	0.033	0.046	0.030	0.213	0.033
BCOR	41.788*	0.000	0.000	0.000	0.551	0.000
SATB-2	0.856*	0.355	0.459	0.279	0.094	0.355
CICLINA-D1	3.286*	0.070	0.093	0.063	0.182	0.070
<u>FISH</u>						
EWSR1	5.925*	0.115	-	-	0.241	0.115
CIC	2.301*	0.317	-	-	0.153	0.317

**No se cumple la condición de mas del 80% de las celdas con un valor mayor a 5 por lo que se invalida el valor de x2 y se utiliza la prueba exacta de Fisher.*

Tabla 12. Tabla de asociación entre los marcadores realizados y el grupo 3 (Sarcomas con alteraciones genéticas en BCOR).

Precisión diagnóstica de marcadores de IHQ por grupos (Grupo 3)				
<u>IHQ</u>	S	E	VPP	VPN
CD99	100%	1.2%	11.6%	100%
NKX2.2	27.3%	72.9%	11.5%	88.6%
FLI-1	90.9%	4.7%	11.0%	80.0%
WT-1	9.1%	57.6%	2.7%	83.1%
BCOR	100.0%	90.1%	50.0%	100.0%
SATB-2	36.4%	23.5%	16.7%	90.3%
CICLINA-D1	90.9%	36.5%	15.6%	96.9%

S: Sensibilidad, P: Especificidad, VPP: Valor predictivo positivo, VPN: Valor predictivo negativo.

Tabla 13. Tabla de Precisión diagnóstica de los marcadores de inmunohistoquímica con respecto al grupo 3 (Sarcoma con alteraciones genéticas en BCOR).

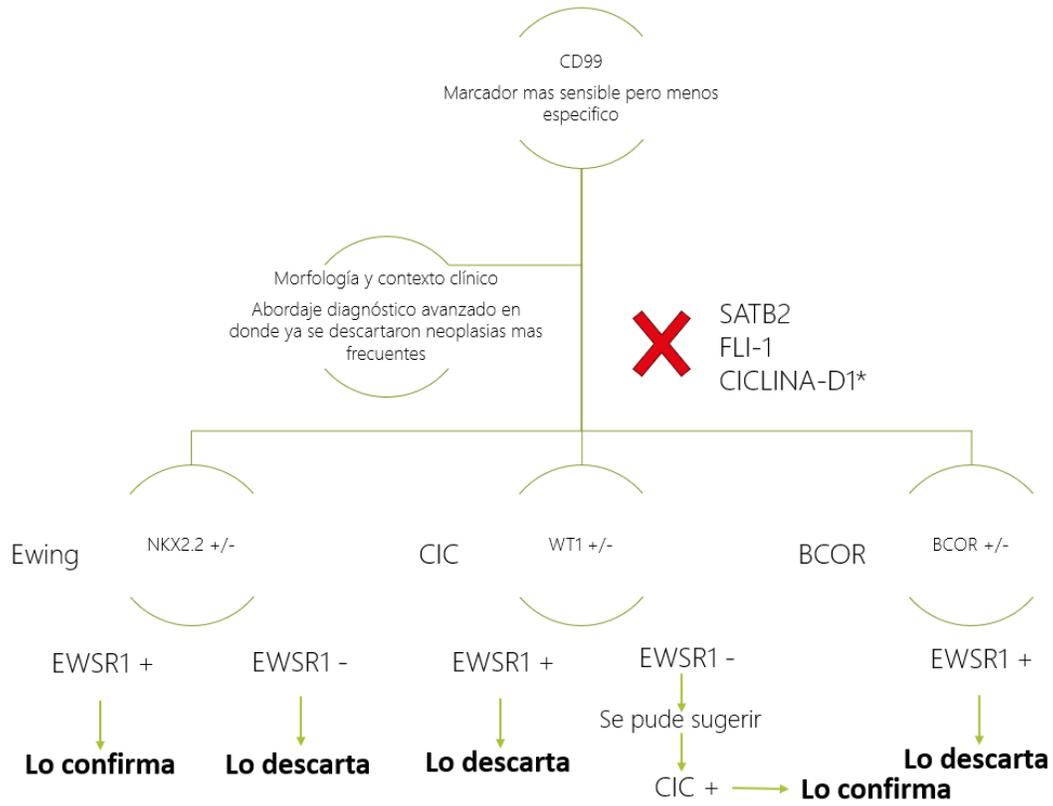


Figura 11. Diagrama de algoritmo diagnóstico propuesto.

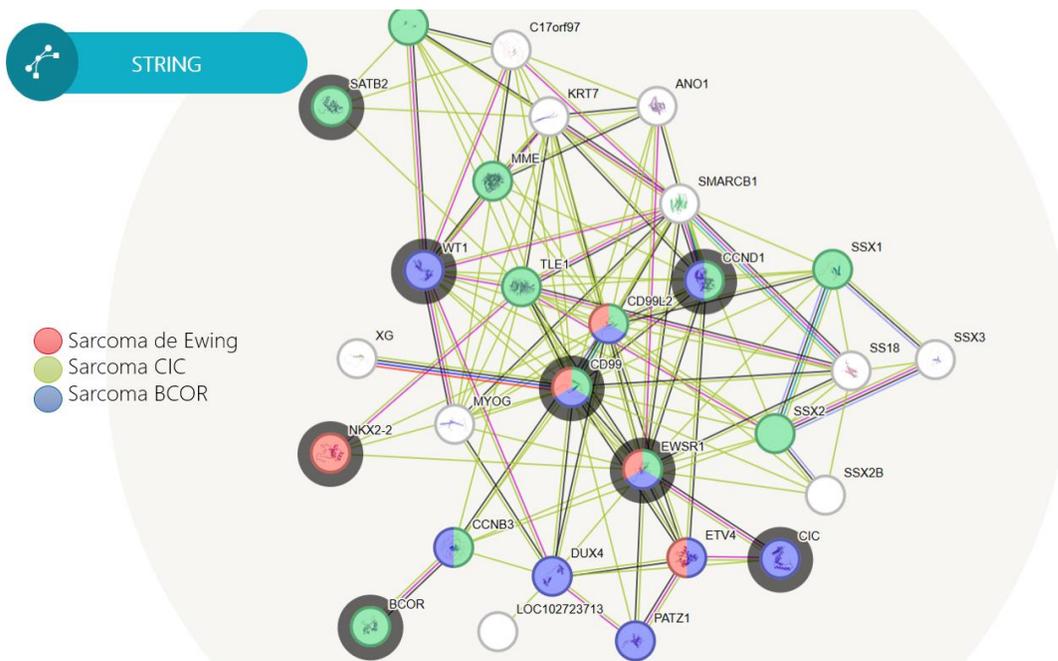


Figura 12. Panorama de interacción entre proteínas asociadas a los Tumores de la familia de Ewing y otras neoplasias.

16. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bellan, D. G., Filho, R. J.-G., Garcia, J. G., de Toledo Petrilli, M., Maia Viola, D. C., Schoedl, M. F., & Petrilli, A. S. (2012). Ewing's sarcoma: Epidemiology and prognosis for patients treated at the Pediatric Oncology Institute, IOP-GRAACC-UNIFESP. *Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)*, 47(4), 446–450. [https://doi.org/10.1016/s2255-4971\(15\)30126-9](https://doi.org/10.1016/s2255-4971(15)30126-9).
2. Dupuy, M., Lamoureux, F., Mullard, M., Postec, A., Regnier, L., Baud'huin, M., ... Verrecchia, F. (2023). Ewing sarcoma from molecular biology to the Clinic. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. doi:10.3389/fcell.2023.1248753.
3. Sbaraglia, M., Bellan, E., & Dei Tos, A. P. (2020). The 2020 WHO classification of soft tissue tumours: News and perspectives. *Pathologica*, 113(2), 70–84. <https://doi.org/10.32074/1591-951x-213>.
4. Balamuth, N. J., & Womer, R. B. (2010). Ewing's sarcoma. *The Lancet Oncology*, 11(2), 184–192. doi:10.1016/s1470-2045(09)70286-4.
5. Sbaraglia, M., Righi, A., Gambarotti, M., & Dei Tos, A. P. (2019). Ewing sarcoma and Ewing-like tumors. *Virchows Archiv*, 476(1), 109–119. doi:10.1007/s00428-019-02720-8.
6. Rodríguez-Galindo, C., Liu, T., Krasin, M. J., Wu, J., Billups, C. A., Daw, N. C., ... Navid, F. (2007). Analysis of prognostic factors in Ewing Sarcoma family of tumors. *Cancer*, 110(2), 375–384. doi:10.1002/cncr.22821.
7. Italiano, A., Sung, Y. S., Zhang, L., Singer, S., Maki, R. G., Coindre, J., & Antonescu, C. R. (2011). High prevalence of *cic* fusion with double-homeobox (DUX4) transcription factors in *ewsr1*-negative undifferentiated small blue round cell sarcomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 51(3), 207–218. <https://doi.org/10.1002/gcc.20945>.
8. Antonescu, C. R., Kao, Y.-C., Xu, B., Fujisawa, Y., Chung, C., Fletcher, C. D. M., ... Alaggio, R. (2020). Undifferentiated round cell sarcoma with BCOR internal tandem duplications (ITD) or YWHAE fusions: A clinicopathologic and molecular study. *Modern Pathology*, 33(9), 1669–1677. doi:10.1038/s41379-020-0557-5.
9. Renzi, S., Anderson, N. D., Light, N., & Gupta, A. (2018). Ewing-like sarcoma: An emerging family of round cell sarcomas. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 7999–8007. <https://doi.org/10.1002/jcp.27558>
10. Machado, I., Yoshida, A., Morales, M. G., Abrahão-Machado, L. F., Navarro, S., Cruz, J., Lavernia, J., Parafioriti, A., Picci, P., & Llombart-Bosch, A. (2018). Review with novel markers facilitates precise categorization of 41 cases of diagnostically challenging, “undifferentiated small round cell tumors”. A clinicopathologic, immunophenotypic and molecular analysis. *Annals of Diagnostic Pathology*, 34, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2017.11.011>
11. Hung, Y. P., Fletcher, C. D., & Hornick, J. L. (2016). Evaluation of *nkx2-2* expression in round cell sarcomas and other tumors with *EWSR1* rearrangement: Imperfect specificity for Ewing sarcoma. *Modern Pathology*, 29(4), 370–380. doi:10.1038/modpathol.2016.31.

12. Joseph A. Ludwig, M.D., Uta Dirksen, M.D., & Paul A. Meyers, M.D. (2021). Ewing's sarcoma. *New England Journal of Medicine*, 384(15), 1476–1478. <https://doi.org/10.1056/nejmc2102423>.
13. Wang, L.-L., Ji, Z.-H., Gao, Y., Chang, H., Sun, P.-P., & Li, Y. (2021). Clinicopathological features of desmoplastic small round cell tumors: Clinical series and literature review. *World Journal of Surgical Oncology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12957-021-02310-6>.
14. Verma, V., Denniston, K. A., Lin, C. J., & Lin, C. (2017). A comparison of pediatric vs. adult patients with the Ewing sarcoma family of tumors. *Frontiers in Oncology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00082>.
15. Terrier-Lacombe, M. J., Guillou, L., Chibon, F., Gallagher, G., Benhattar, J., Terrier, P., ... Coindre, J.-M. (2009). Superficial primitive Ewing's sarcoma: A clinicopathologic and molecular cytogenetic analysis of 14 cases. *Modern Pathology*, 22(1), 87–94. doi:10.1038/modpathol.2008.156.
16. Yin, T., Shao, M., Sun, M., Zhao, L., Lao, I. W., Yu, L., & Wang, J. (2023). Gastrointestinal ewing sarcoma. *American Journal of Surgical Pathology*, 48(3), 275–283. doi:10.1097/pas.0000000000002163.
17. Zhan, H., Mo, F., Zhu, M., Xu, X., Zhang, B., Liu, H., & Dai, M. (2021). A seer-based nomogram accurately predicts prognosis in Ewing's sarcoma. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02134-0>.
18. Grünewald, T.G.P., Cidre-Aranaz, F., Surdez, D. *et al.* Ewing sarcoma. *Nat Rev Dis Primers* 4, 5 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0003-x>.
19. Thompson, L. D. (2017). Small round blue cell tumors of the sinonasal tract: A differential diagnosis approach. *Modern Pathology*, 30. doi:10.1038/modpathol.2016.119.
20. Peters, T. L., Kumar, V., Polikepahad, S., Lin, F. Y., Sarabia, S. F., Liang, Y., ... Roy, A. (2015). BCOR–CCNB3 fusions are frequent in undifferentiated sarcomas of male children. *Modern Pathology*, 28(4), 575–586. doi:10.1038/modpathol.2014.139.
21. Karlina, I., Schroeder, B. A., Kirgizov, K., Romantsova, O., Istranov, A. L., Nedorubov, A., Timashev, P., & Ulasov, I. (2022). Latest developments in the pathobiology of Ewing Sarcoma. *Journal of Bone Oncology*, 35, 100440. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2022.100440>.
22. Sugita, S., Arai, Y., Tonooka, A., Hama, N., Totoki, Y., Fujii, T., ... Hasegawa, T. (2014). A novel CIC-FOXO4 gene fusion in undifferentiated small round cell sarcoma. *American Journal of Surgical Pathology*, 38(11), 1571–1576. doi:10.1097/pas.0000000000000286.
23. Sugita, S., Arai, Y., Aoyama, T., Asanuma, H., Mukai, W., Hama, N., ... Hasegawa, T. (2017). Nutm2a-CIC fusion small round cell sarcoma: A genetically distinct variant of CIC-rearranged sarcoma. *Human Pathology*, 65, 225–230. doi:10.1016/j.humpath.2017.01.012.
24. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Soft tissue and bone tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2020. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 3). <https://publications.iarc.fr/588>.
25. Salgado, C. M., Alaggio, R., Ciolfi, A., Zin, A., Diomedei Camassei, F., Pedace, L., ... Miele, E. (2023). Pediatric BCOR-altered tumors from soft tissue/kidney display

- specific DNA methylation profiles. *Modern Pathology*, 36(2), 100039. doi:10.1016/j.modpat.2022.100039.
26. Casey, D. L., Lin, T.-Y., & Cheung, N.-K. V. (2019). Exploiting signaling pathways and immune targets beyond the standard of care for Ewing Sarcoma. *Frontiers in Oncology*, 9. doi:10.3389/fonc.2019.00537.
 27. Gao, Y., He, X.-Y., Wu, X. S., Huang, Y.-H., Toneyan, S., Ha, T., ... Vakoc, C. R. (2023). ETV6 dependency in Ewing Sarcoma by antagonism of EWS-Fli1-mediated enhancer activation. *Nature Cell Biology*. doi:10.1038/s41556-022-01060-1.
 28. Michal, M., Rubin, B. P., Agaimy, A., Kosemehmetoglu, K., Rudzinski, E. R., Linos, K., ... Michal, M. (2021). EWSR1-Patz1-rearranged sarcoma: A report of nine cases of spindle and round cell neoplasms with predilection for thoracoabdominal soft tissues and frequent expression of neural and skeletal muscle markers. *Modern Pathology*, 34(4), 770–785. doi:10.1038/s41379-020-00684-8.
 29. Hung, Y. P., Fletcher, C. D., & Hornick, J. L. (2016a). Evaluation of ETV4 and WT1 expression in CIC-rearranged sarcomas and histologic mimics. *Modern Pathology*, 29(11), 1324–1334. doi:10.1038/modpathol.2016.140.
 30. Saiyed, S., Mownah, O. A., Bowles, M. J., & Kanwar, A. (2023). Ewing’s sarcoma of the duodenum: A rare clinical condition managed with surgical resection. *BMJ Case Reports*, 16(6). doi:10.1136/bcr-2022-249686.
 31. Warren, M., Hiemenz, M. C., Schmidt, R., Shows, J., Cotter, J., Toll, S., ... Shah, R. (2020). Expanding the spectrum of DICER1-associated sarcomas. *Modern Pathology*, 33(1), 164–174. doi:10.1038/s41379-019-0366-x.
 32. Carpentieri, D. F., Nichols, K., Chou, P. M., Matthews, M., Pawel, B., & Huff, D. (2002). The expression of WT1 in the differentiation of rhabdomyosarcoma from other pediatric small round blue cell tumors. *Modern Pathology*, 15(10), 1080–1086. doi:10.1097/01.mp.0000028646.03760.6b.
 33. Le Guellec, S., Velasco, V., Pérot, G., Watson, S., Tirode, F., & Coindre, J.-M. (2016). ETV4 is a useful marker for the diagnosis of CIC-rearranged undifferentiated round-cell sarcomas: A study of 127 cases including mimicking lesions. *Modern Pathology*, 29(12), 1523–1531. doi:10.1038/modpathol.2016.155.
 34. Linos, K., Dermawan, J. K., Bale, T., Rosenblum, M. K., Singer, S., Tap, W., ... Antonescu, C. R. (2023). Expanding the molecular diversity of CIC-rearranged sarcomas with novel and very rare partners. *Modern Pathology*, 36(5), 100103. doi:10.1016/j.modpat.2023.100103.
 35. Wei, S., & Siegal, G. P. (2021). Small round cell tumors of soft tissue and bone. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 146(1), 47–59. <https://doi.org/10.5858/arpa.2020-0773-ra>.
 36. Smith, S. C., Buehler, D., Choi, E.-Y. K., McHugh, J. B., Rubin, B. P., Billings, S. D., ... Patel, R. M. (2015). CIC-dux sarcomas demonstrate frequent myc amplification and ETS-family transcription factor expression. *Modern Pathology*, 28(1), 57–68. doi:10.1038/modpathol.2014.83.
 37. Le Loarer, F., Baud, J., Azmani, R., Michot, A., Karanian, M., & Pissaloux, D. (2021). Advances in the classification of Round Cell sarcomas. *Histopathology*, 80(1), 33–53. <https://doi.org/10.1111/his.14547>.

38. Wilkinson, L., Coucher, J., Murphy, M., Joubert, W., & Cooper, C. (2018). CIC-rearranged sarcoma of the pleura: An unreported primary site, expanding the anatomical distribution of an emerging entity. *Pathology*, 50(4), 469–472. doi:10.1016/j.pathol.2017.11.092.
39. Yoshida, A. (2022). Ewing and Ewing-like Sarcomas: A morphological guide through genetically-defined entities. *Pathology International*, 73(1), 12–26. <https://doi.org/10.1111/pin.13293>.
40. Li, L., Zhang, M., Chen, S., Sun, X., Xu, H., Li, L., Zhang, T., Huang, X., Ye, H., & Ding, Y. (2021). Detection of BCOR gene rearrangement in Ewing-like sarcoma: An important diagnostic tool. *Diagnostic Pathology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13000-021-01114-2>.
41. McConnell, L., Houghton, O., Stewart, P., Gazdova, J., Srivastava, S., Kim, C., Catherwood, M., Strobl, A., Flanagan, A. M., Oniscu, A., Kroeze, L. I., Groenen, P., Taniere, P., Salto-Tellez, M., & Gonzalez, D. (2020). A novel next generation sequencing approach to improve sarcoma diagnosis. *Modern Pathology*, 33(7), 1350–1359. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0488-1>.
42. D’Cruze, L. (2013). The role of immunohistochemistry in the analysis of the spectrum of small round cell tumours at a tertiary care centre. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2013/5127.3132>.
43. Rana, V., Sharma, S., Kamala, R., Nair, D., Ragavendra, Tr., Mhatre, S., Sabharwal, R., & Choudhury, B. (2017). Round cell tumors: Classification and immunohistochemistry. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 38(3), 349. https://doi.org/10.4103/ijmpo.ijmpo_84_16.
44. Slotkin, E. K., & Tap, W. D. (2022). Towards a new era in the treatment of Ewing Sarcoma. *The Lancet*, 400(10362), 1488–1489. doi:10.1016/s0140-6736(22)02081-5.
45. Brennan, B., Kirton, L., Marec-Bérard, P., Gaspar, N., Laurence, V., Martín-Broto, J., ... Wheatley, K. (2022). Comparison of two chemotherapy regimens in patients with newly diagnosed Ewing Sarcoma (EE2012): An open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet*, 400(10362), 1513–1521. doi:10.1016/s0140-6736(22)01790-1.
46. Yoshimoto, T., Tanaka, M., Homme, M., Yamazaki, Y., Takazawa, Y., Antonescu, C. R., & Nakamura, T. (2017). *CIC-dux4* induces small round cell sarcomas distinct from Ewing sarcoma. *Cancer Research*, 77(11), 2927–2937. doi:10.1158/0008-5472.can-16-3351.
47. Fleuren, E. D., Vlenterie, M., & van der Graaf, W. T. (2023). Recent advances on anti-angiogenic multi-receptor tyrosine kinase inhibitors in osteosarcoma and Ewing Sarcoma. *Frontiers in Oncology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1013359>.
48. Church, A. J., Corson, L. B., Kao, P.-C., Imamovic-Tuco, A., Reidy, D., Doan, D., Kang, W., Pinto, N., Maese, L., Laetsch, T. W., Kim, A., Colace, S. I., Macy, M. E., Applebaum, M. A., Bagatell, R., Sabnis, A. J., Weiser, D. A., Glade-Bender, J. L., Homans, A. C., ... Janeway, K. A. (2022). Molecular profiling identifies targeted therapy opportunities in pediatric solid cancer. *Nature Medicine*, 28(8), 1581–1589. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01856-6>.
49. Lin, Z., Wu, Z., & Luo, W. (2021). A novel treatment for Ewing’s sarcoma: Chimeric antigen receptor-T cell therapy. *Frontiers in Immunology*, 12. doi:10.3389/fimmu.2021.707211.

50. Tsibulnikov, S., Fayzullina, D., Karlina, I., Schroeder, B. A., Karpova, O., Timashev, P., & Ulasov, I. (2023). Ewing sarcoma treatment: A gene therapy approach. *Cancer Gene Therapy*, 30(8), 1066–1071. doi:10.1038/s41417-023-00615-0.
51. Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al.F. B. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Vol 2021. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2021.
52. Shulman, D. S., Whittle, S. B., Surdez, D., Bailey, K. M., de Álava, E., Yustein, J. T., ... Grohar, P. J. (2022). An International Working Group Consensus Report for the prioritization of molecular biomarkers for Ewing Sarcoma. *Npj Precision Oncology*, 6(1). doi:10.1038/s41698-022-00307-2