

Aspectos generales de los sarcomas. Clasificación y grados de diferenciación

Enrique de Alava

Programa de Patología Molecular.

Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC. Universidad de Salamanca/CSIC

Salamanca

edealava@usal.es

1. Introducción

El papel del patólogo ante el sarcoma, por una parte, sigue siendo el tradicional. Aporta un diagnóstico, halla elementos pronósticos clave del tumor, evalúa con el cirujano la calidad de la extirpación, etc. Pero, por otra parte, toma la muestra de modo que, en el menor tiempo posible, pueda realizar los análisis inmunohistoquímicos y moleculares adecuados, en los que espera una confirmación diagnóstica y una predicción de la respuesta al tratamiento. Así, el patólogo maneja la información clave que permite la selección adecuada de los pacientes para la recepción de los nuevos tratamientos basados en dianas moleculares.

2. La biopsia/citología

El papel de la biopsia es el de establecer un diagnóstico de malignidad, clasificar el tumor, y establecer su grado. En las neoplasias superficiales de menos de 2-3 cm. generalmente se realiza una biopsia excisión. Sin embargo, tienden a imponerse las biopsias realizadas por el radiólogo con aguja de 14G y bajo control de imagen. Su ventaja es que se toleran bien, sólo necesitan anestesia local, y se realizan de manera ambulatoria. Aunque en bastantes ocasiones permiten filiar el tumor, o al menos permiten descartar mediante la inmunohistoquímica tumores que no son sarcomas (p.ej. un linfoma), tienen la desventaja, especialmente en los tumores mixoides y adiposos, que los criterios citológicos de malignidad no siempre se pueden objetivar, y que el grado puede no evaluarse bien, especialmente en los tumores más heterogéneos. Si la comisión hospitalaria de sarcomas estima que el material es insuficiente, especialmente si se trata de un tumor susceptible de ser tratado mediante quimioterapia neoadyuvante, convendrá planear una biopsia quirúrgica. Aunque la experiencia es variable de un centro a otro, la citología se emplea sobre todo para confirmar la presencia de una recidiva o metástasis de un sarcoma ya conocido; su

rendimiento es mayor en el diagnóstico de los sarcomas de células redondas. Siempre que sea posible y no interfiera con el diagnóstico, conviene congelar fragmentos tumorales o suspensiones celulares y conservarlas en el banco de tumores, así como tomar muestras para citogenética.

3. Diagnóstico, clasificación de la OMS

La clasificación de los sarcomas es dinámica y ha ido evolucionando con el tiempo. La que consideramos más actual corresponde a la publicada por la OMS en 2002 tras una reunión de un grupo de trabajo de 35 personas. En dicha reunión se generó, revisó y validó una clasificación que integra, junto con la morfología, gran cantidad de datos citogenéticos y de biología molecular.

Algunos de los cambios más relevantes que se introducen en la clasificación de 2002 son: 1). Una definición más clara de la subclasificación por comportamiento biológico; por ejemplo en el grupo de malignidad intermedia se reconocen dos situaciones: Una, cuyo ejemplo es la fibromatosis, que se considera capaz de realizar recidivas locales continuas pero sin riesgo de metástasis (tumores localmente agresivos), y otra situación, de la que es ejemplo el HFM angiomatoide, que representa tumores localmente agresivos con baja capacidad de dar metástasis (menos del 2%). 2) Una reclasificación de los tumores lipomatosos; así, la entidad "liposarcoma bien diferenciado/tumor lipomatoso atípico", con la misma alteración citogenética, es un tumor localmente agresivo, y su denominación varía respecto a su localización, reservándose el término de liposarcoma bien diferenciado para las localizaciones menos resecables como la retroperitoneal. 3) El hemangiopericitoma se reclasifica como tumor fibroso solitario, una entidad que puede presentarse en casi cualquier localización. 4) El tumor miofibroblástico inflamatorio se considera como un tumor de baja capacidad de metastatización más que una lesión reactiva, 5) se torna a la denominación de mixofibrosarcoma para los HFM mixoides. 6) Se considera que el HFM estoriforme/pleomórfico es simplemente un sarcoma pleomórfico indiferenciado 7) La tasa de metástasis del hemangioendotelioma epitelioides es de más del 20%, con lo que se le considera ahora un sarcoma de alto grado y no de grado intermedio, 8) crece el número de tumores de histogénesis incierta (diversos tipos de mixomas, el PEComa, los sarcomas sinoviales, etc.), reconociendo que carecemos de una idea clara de la histogénesis de muchos tumores de partes blandas que, por lo demás, son muy característicos desde el punto de vista morfológico,

4. Grado y pronóstico

En los sarcomas de tejidos blandos de los adultos, la supervivencia y el riesgo de metástasis dependen del tamaño tumoral, localización, profundidad, tipo histológico y grado. Existen dos sistemas de gradación que tienen en cuenta diversas características histopatológicas (atipia, mitosis, necrosis): el del Instituto Nacional del Cáncer de los EE.UU., y el del grupo francés de sarcomas, este último el más empleado. Los GIST tienen su propio esquema pronóstico, como queda recogido en otro capítulo de esta monografía, y en los sarcomas infantiles, el pronóstico depende más bien del tipo y subtipo tumorales (p.ej. rhabdomyosarcoma embrionario/alveolar), la edad y la resecabilidad.

En los sarcomas de partes blandas, sin embargo, aunque los sistemas de gradación son en general reproducibles, hay sarcomas en los que el grado no aporta información pronóstica adicional respecto al tipo tumoral, o son difíciles de graduar. Con respecto al primer punto, hay sarcomas en los que el tipo histológico define tan bien el pronóstico, que la gradación resulta superflua; algunos ejemplos son el liposarcoma bien diferenciado-tumor lipomatoso atípico, que siempre se comporta como una lesión de bajo grado no metastatizante, o bien la mayoría de sarcomas de células redondas y algunos fusocelulares (p.ej. sarcoma sinovial, rhabdomyosarcoma, osteosarcoma extraesquelético, etc) que invariablemente tienen mal pronóstico.

La segunda situación viene representada por el sarcoma alveolar de partes blandas, sarcoma epitelioides y sarcoma de células claras donde la variabilidad morfológica es muy escasa o poco relevante.

Por otro lado hay que tener en cuenta que, a veces, ciertos datos clínicos aportan una información tan importante o más que el propio grado histológico. Por ejemplo en el angiosarcoma cutáneo lo que importa es el número de lesiones y su tamaño. Otras veces, como ocurre en el condrosarcoma mixoide, el grado que le correspondería por su morfología es bajo, pero su comportamiento incluye frecuentemente metástasis tardías. Otro ejemplo es el de los leiomiomas, cuyo pronóstico depende más de su localización (vascular, retroperitoneal, uterina) que del sistema de gradación; por ejemplo el sistema francés no predice el pronóstico en el LMS de útero. Algo parecido ocurre en los tumores malignos de vainas nerviosas, donde los sistemas actuales no son capaces de predecir bien el pronóstico.

En conclusión, y sin abandonar obviamente el uso de los sistemas de gradación, hemos de ser conscientes de sus limitaciones, que quizás representen una oportunidad para el estudio de factores pronósticos de carácter molecular.

5. Papel de la inmunohistoquímica en los sarcomas: visión general

En cada charla de este curso veremos referencias a la inmunohistoquímica; el propósito de esta sección es realizar unas consideraciones generales e introductorias. Es una técnica tremendamente útil, especialmente porque se ha automatizado, lo que permite su estandarización y el uso de herramientas de gestión de calidad. En muchos tumores sólidos es una fuente de selección de los pacientes para el uso de terapias dirigidas, como se comenta en el capítulo de esta monografía correspondiente al GIST. En el caso de los sarcomas, la aportación mayor de la inmunohistoquímica es la de ayudar a señalar el tipo de diferenciación del tumor, especialmente en los tumores más indiferenciados, y descartar tumores que no son sarcomas, en biopsias previas a la administración de terapia neoadyuvante. Es importante destacar que para cada situación diagnóstica (p.ej. posible sarcoma; sarcoma de células pequeñas; o, más concreto, como sarcoma sinovial vs. sarcoma epitelioides) debe definirse el panel de anticuerpos más adecuado. No es el objeto de este texto definir el número y composición de dichos paneles, pero sí señalar algunos anticuerpos de introducción relativamente reciente que deberían o no formar parte de los mismos. Es el caso de la miogenina o MyoD1, que es probablemente el mejor marcador (nuclear!) de rhabdomyosarcomas, el MiTF o Melan A, que habrán de incluirse cuando el diagnóstico diferencial incluya melanomas epitelioides, el caldesmón, que caracteriza el fenotipo muscular liso, y que no está presente en lesiones miofibroblásticas o en los rhabdomyosarcomas, MDM2/CDK4 podrían incluirse en la evaluación de los liposarcomas bien diferenciados, porque reflejan la amplificación en 12q13-q15, típica de estas lesiones, el CD117 (producto de *c-kit*) se expresa, además que en los GIST, en bastantes otros sarcomas, aunque esto no quiere necesariamente decir que en todos ellos represente una diana terapéutica. Otros marcadores, como la alfa 1 antitripsina o el CD68 deberían dejar de usarse como marcadores fibrohistiocíticos, pues son simplemente marcadores de lisosomas.

Es previsible que una parte del gran número de marcadores derivados de los estudios de microarrays se adapten mediante la inmunohistoquímica al contexto clínico-patológico mediante el desarrollo de nuevos anticuerpos que se puedan emplear en

material parafinado. De hecho, es probable que al menos una parte del impacto de la Patología Molecular en el diagnóstico de los sarcomas se establezca a través de la introducción de nuevos reactivos inmunohistoquímicos.

En algunos casos, a pesar de un profundo estudio morfológico e inmunohistoquímico, no se puede llegar a un diagnóstico específico. Esa sea probablemente la mejor indicación para el estudio molecular.

Papel de la Patología Molecular Diagnóstica en los sarcomas: visión general.

Como en la sección anterior su propósito es realizar unas consideraciones generales e introductorias, que serán desarrolladas en más profundidad en algunas de las charlas de este curso. Desde el punto de vista genético/molecular hay tres tipos de tumores de partes blandas: (a) sarcomas con alteraciones genéticas específicas y cariotipos relativamente simples, con translocaciones que originan fusiones génicas (p.ej EWS-FLI1 en el tumor de Ewing), más prevalentes en niños o adultos jóvenes, o bien (b) mutaciones puntuales específicas (p.ej. de *c-kit* en el GIST), y (c) sarcomas con alteraciones genéticas inespecíficas y cariotipos muy complejos, con ganancias y pérdidas muy numerosas, más prevalentes en pacientes en edad media o avanzada. Los dos primeros tipos de tumores tienen alteraciones específicas de detección relativamente simple. Es obvio por tanto que son los candidatos a beneficiarse de la detección de alteraciones moleculares en un ámbito clínico rutinario. La detección de mutaciones puntuales en los GIST se aborda en el capítulo correspondiente. Centramos ahora la discusión en la metodología para la detección de translocaciones en muestras clínicas.

La RT-PCR es el método más empleado para la detección de translocaciones en muestras clínicas, especialmente cuando contamos con muestras congeladas de tumores. Esta técnica tiene dos pasos; en el primero se usa la transcriptasa inversa (RT), un enzima que sintetiza cDNA a partir de RNA. En un segundo paso se amplifica el cDNA mediante una PCR convencional empleando como cebadores secuencias características de los exones que flanquean los puntos de rotura de las translocaciones. Se realiza una electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa y puede realizarse una secuenciación si se considera necesario. Otros métodos diagnósticos incluyen la citogenética convencional y la hibridación in situ con fluorescencia (FISH). La palabra 'hibridación' se refiere a la unión de secuencias de DNA o RNA complementarias. Las sondas se marcan con moléculas fluorescentes,

que son por tanto útiles para detectar las secuencias de interés. Las sondas que se emplean en el estudio de tumores mesenquimales mediante FISH son habitualmente sondas específicas de una secuencia, como por ejemplo las que flanquean los puntos de rotura de las translocaciones. Generalmente funcionan bien en material fijado en formol e incluido en parafina. Para detectar las secuencias hace falta emplear al menos dos sondas, una para cada uno de los genes implicados, cada una marcada con un fluorocromo diferente. A veces las sondas están diseñadas para detectar la presencia de fusiones (*fusion signal probes*), y en otras ocasiones lo que se busca es simplemente ver si se ha producido un reordenamiento de uno de los genes implicados en la fusión (*split signal probes*). El FISH tiene la ventaja de que puede dar resultados fiables cuando la cantidad de tejido disponible es escasa o cuando sólo se dispone de material de parafina. Esta técnica puede ser usada incluso en matrices tisulares, o cuando sólo se cuenta con improntas de tejido tumoral.

La inmunohistoquímica es una técnica indirecta de detección de translocaciones, especialmente cuando alguno de los componentes de las fusiones génicas se sobreexpresan. Es el caso de TFE3 en el sarcoma alveolar de partes blandas, WT1 en el tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, de FLI1 en el tumor de Ewing, o de ALK en bastantes casos de tumor miofibroblástico inflamatorio.

El uso de técnicas moleculares no es necesario en todos los casos de sarcomas. Yo me atrevería a sintetizar las indicaciones clínicas en las siguientes:

- ? Aparición de una variante morfológica poco habitual de un sarcoma (p.ej. un sarcoma sinovial pobremente diferenciado que por lo demás aparece en un lugar y edad habituales, como un varón de 27 años cerca de la articulación de la rodilla; p.ej. un tumor de morfología similar a un adamantinoma en la cara anterior de la tibia, pero con áreas que contienen células redondas, puede sugerir el diagnóstico diferencial con un tumor de Ewing).
- ? Aparición de un sarcoma de aspecto morfológico habitual, pero en una edad anómala. Aplicable sobre todo a sarcomas de células redondas o fusiformes con translocaciones características en pacientes con edades superiores a los 40 años.
- ? Aparición de un sarcoma de aspecto morfológico habitual, pero en una localización anómala (p.ej. un tumor de Ewing cutáneo, vesical o renal, que

pueden ser confundidos con carcinomas de células pequeñas/neuroendocrinos).

- ? Distinción entre un sarcoma y otro tumor que pueda simularlo pero no lo sea. El ejemplo en mi experiencia más habitual es el de un tumor fusocelular en la parrilla costal, que induce el diagnóstico diferencial entre el sarcoma sinovial en la parrilla costal y su diferenciación de un mesotelioma pleural o de un tumor fibroso solitario maligno, o el diagnóstico diferencial entre un melanoma y un sarcoma de células claras de tejidos blandos
- ? Detección de mutaciones puntuales en genes claves para la señalización celular. El ejemplo más claro hoy día, y que se detallará en el capítulo correspondiente, es el de la detección de la presencia y localización exónica de las mutaciones de c-kit para el diagnóstico diferencial de los GIST y el diagnóstico de sus resistencias secundarias al tratamiento con imatinib/sunitinib.

Bibliografía recomendada

Collin F, Gelly-Marty M, Bui Nguyen Binh M, Coindre JM. Soft tissue sarcomas: current data in the field of pathology. *Cancer Radiother* 2006; 10:7-14.

de Alava E. Patología Molecular de los sarcomas. *Oncología* 2005; 28:426-442

Deyrup AT, Weiss SW. Grading of soft tissue sarcomas: the challenge of providing precise information in an imprecise world. *Histopathology* 2006; 48:42-50.

Fletcher CD. The evolving classification of soft tissue tumours: an update based on the new WHO classification. *Histopathology* 2006; 48:3-12.

Qian X, Jin L, Shearer BM, Ketterling RP, Jalal SM, Lloyd RV. Molecular diagnosis of Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by RT-PCR and fluorescence in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 2005;14:23-8.

Terry J, Barry TS, Horsman DE, Hsu FD, Gown AM, Huntsman DG, Nielsen TO. Fluorescence in situ hybridization for the detection of t(X;18)(p11.2;q11.2) in a synovial sarcoma tissue microarray using a breakapart-style probe. *Diagn Mol Pathol* 2005; 14:77-82.