

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME FINAL
DE SERVICIO SOCIAL

**Evaluación de la frecuencia de la fusión de TRK en
diversos tumores sólidos en población mexicana.**

QUE PRESENTA LA ALUMNA

Cruz Ledesma Anahis

2152033426

ASESORES

INTERNO

DRA. AIDA HAMDAN PARTIDA
NO. ECONOMICO 26343
LAB. DE MICROBIOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

EXTERNO

DRA SRA HUERTA YEPEZ
NO. DE CED. PROF. 4564756
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES
ONCOLOGICAS DEL HOSPITAL INFANTIL DE
MÉXICO "FEDERICO GOMÉZ

Resumen.

Las fusiones NTRK1, NTRK2 y NTRK3 se presentan en diferentes tipos de tumores sólidos. Esta fusión representa el mecanismo más frecuente de activación oncogénica de estos receptores con actividad tirosina cinasa y han sido utilizados como marcadores para el uso de las terapias con inhibidores TRK. La frecuencia de estas fusiones se conoce en tumores como glioblastomas (10%), fibrosarcoma infantil (90-100%) y nefroma mesoblástico (83%). Sin embargo; no se conoce la frecuencia de estas fusiones en tumores de gran importancia en la población pediátrica como el tumor de Wilms y osteosarcomas. Las actividades realizadas en el presente trabajo están orientadas a la búsqueda de biomarcadores en diferentes tipos de cáncer, en este caso las fusiones del gen NTRK, para así poder evaluar su frecuencia en tumores sólidos en la población mexicana. Dichas actividades se enfocaron principalmente a la construcción de microarreglos de tejidos, tinciones e inmunohistoquímica en muestras de osteosarcoma y Tumores de Wilms, y en la identificación de la proteína Yin Yang (YY1). Estas actividades que fueron parte del presente estudio se llevaron a cabo en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” en la Unidad de Investigación en enfermedades Oncológicas (UIEO), en la cual se ha implementado la técnica de microarreglos de tejidos (MATs), ésta permite el análisis simultáneo de varias muestras embebidas en parafina para diversas técnicas principalmente y en este caso por inmunohistoquímica (IHQ). Finalmente, se lograron construir cuatro MATs con en total 95 muestras provenientes de pacientes pediátricos diagnosticados con osteosarcoma o con tumor de Wilms. En ellos se validó la disposición y la estructura adecuada de los tejidos incluidos. Finalmente, los MATs demostraron ser un potente instrumento para la investigación ayudando al análisis masivo del perfil molecular de la patología tumoral. Facilita y acelera el traslado de la información obtenida a la práctica clínica, obviando muchas de las limitaciones de las técnicas convencionales. Esto permite tipificar cada tumor con mayor rapidez y precisión.

Palabras clave: Microarreglo de tejidos, osteosarcoma, Tumor de Wilms,

ÍNDICE

1.Marco institucional	1
2.Actividades desarrolladas en el servicio social	2-4
3.Introducción	5-7
3.1. Justificación	8
3.2 .Ubicación	8
3.3. Objetivos	9
4. Resultados (especificación y fundamento), de las actividades desarrolladas	10-19
4.1. Construcción de microarreglo de tejido osteosarcoma y análisis de la expresión de YY1	10-14
4.2. Construcción de microarreglo de tejido, tumores de Wilms y análisis de la expresión de YY1.	15-19
4.3. Impacto	20-21
4.4. Aprendizaje y habilidades obtenidas	22
4.5. Fundamento	23
5. Referencias	24-25

1. Marco institucional

Las actividades realizadas en el presente servicio social se desarrollaron a lo largo de 6 meses de acuerdo al artículo 5, Capítulo I del “Reglamento de Servicio Social a Nivel de Licenciatura de la Universidad Autónoma Metropolitana”. Dentro de estos seis meses se incluye febrero, marzo, abril, mayo, junio, julio y agosto del 2020. Dichas actividades se enfocaron principalmente en la construcción de microarreglos, tinciones e inmunohistoquímica en muestras de osteosarcoma y Tumores de Wilms, y en la identificación de la proteína Yin Yang (YY1). Estas actividades que fueron parte del presente se realizaron en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” en la Unidad de Investigación en enfermedades Oncológicas (UIEO).

La UAM-Xochimilco, se caracteriza como una institución (IES) con un sistema de enseñanza- aprendizaje el cual enlaza problemáticas reales sociales con elementos fundamentales de la educación mediante la participación universitaria en la generación y aplicación del conocimiento, relacionándose con las funciones y características institucionales de la UIEO, que impulsa y promueve la investigación con el fin de generar nuevo conocimiento sobre una problemática en la población mexicana.

Por ello las actividades que se llevaron a cabo en el servicio social están relacionadas con el compromiso de formar profesionales, futuros investigadores y las actividades de la UAM-Xochimilco como con las del Hospital infantil de México “Federico Gómez”. Ambas instituciones enfocadas a futuras investigaciones para el desarrollo de la ciencia y del país, logrando así el acercamiento y dominio de las posibles actividades profesionales actuales y a futuro.

2. Actividades desarrolladas en el servicio social

1. Colecta de muestras. De las muestras incluidas en parafina, se seleccionaron únicamente muestras de pacientes con diagnóstico de osteosarcoma y Tumor de Wilms, las cuales se obtuvieron del banco de biopsias del Hospital Infantil “Federico Gómez”.

2. Elaboración de bases de datos. Las bases de datos se elaboraron a partir de las biopsias de los pacientes, las cuales fueron valoradas para su inclusión en una revisión del historial clínico del paciente mediante confrontación de los criterios de inclusión, exclusión y no inclusión.

3. Elaboración de mapas virtuales. Los microarreglos de tejidos, permiten validar posibles marcadores tumorales en forma masiva, debido a que se puede analizar un gran número de muestras clínicas bajo las mismas condiciones experimentales de manera paralela. Para el microarreglo de tejidos se realizó un mapa virtual para determinar la posición y características de cada muestra contenida en el microarreglo (Fig. 1).

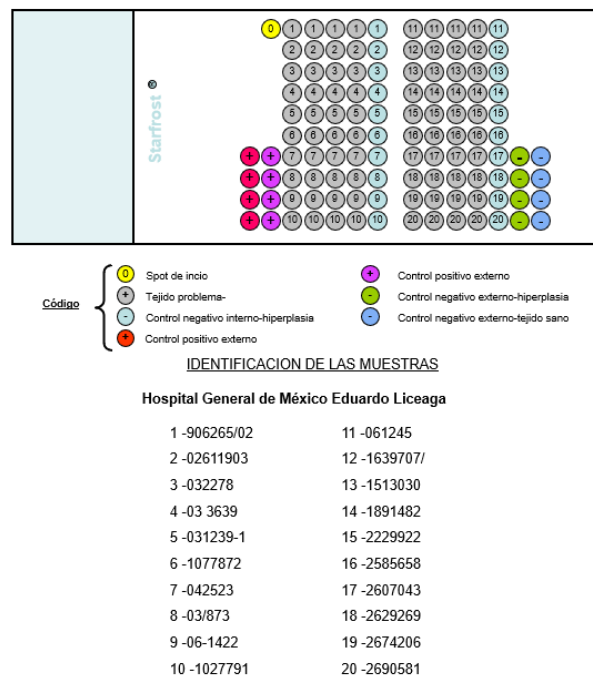


Figura 1. Ejemplo de mapa virtual de un microarreglo de tejido

4. Construcción de microarreglos. Para la construcción de los microarreglos de tejidos de los diferentes tumores analizados en este estudio se procedió de la siguiente manera: De cada bloque de parafina se hicieron cortes de 5 μm para la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) con el fin de identificar la región de interés. Posteriormente, se procedió a la construcción del arreglo utilizando el equipo CHEMICON's Advanced Tissue Arrayer (ATA 100 Chemicon) brevemente, se utilizó una aguja calibre 0.5 mm mediante la cual se extrajeron cilindros de parafina de 3 mm de altura de un bloque de parafina de 2.5 X 2.5 cm “en blanco”, delimitándose una matriz de 5 x 5 elementos. Una vez elaborada la matriz, se utilizó una aguja de calibre 0.4mm para obtener cilindros de tejido de cada una de las muestras de tejido embebidas en parafina (bloque donador). Cada uno de estos cilindros que contiene el tejido, fue implantado en el bloque en blanco previamente perforado (bloque receptor) y una vez completada la matriz de tejidos (cada tejido por triplicado).

5. Inmunohistoquímica de biopsias contenidas en los diferentes microarreglos de tejidos. Secciones de 4 μm del microarreglo de tejidos, fueron desparafinadas en xilol y rehidratados a través de series de alcoholes siguiendo la técnica de “inmunohistoquímica” estandarizada por el laboratorio “Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas”. Posterior a eso las laminillas fueron incubadas con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C (anti-YY1, NOVUS NBP2-20932). Las laminillas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a HRP usando el kit Immpress HRP Reagent (Vector Laboratories). La señal se amplificó y se utilizará el Kit ImmPACT DAB peroxidase substrate (Vector Laboratories).

6. Tinción de Hematoxilina y eosina. Los portaobjetos con los microarreglos se desparafinaron y se seleccionaron áreas de 4 μm de tejido en xilol siguiendo las técnicas (J.T. Baker, 9490-02) (JT Baker,

9000), Finalmente, los portaobjetos fueron cubiertos con resina y se dejarán secar a temperatura ambiente.

7. Análisis de muestras contenidas en los MAT. El análisis de la expresión de cada una de las proteínas en los microarreglos de tejidos se evaluó mediante patología digital con el digitalizador de imágenes Scanscope CS (Aperio, San Diego, CA. USA). La cuantificación se realizó utilizando el algoritmo del fabricante. El equipo cuantificó la intensidad de expresión total por célula y le asignó un valor numérico de acuerdo con el grado de intensidad, intensidad alta, intensidad moderada, intensidad baja o intensidad nula. Se promediaron las intensidades descartando el valor de la intensidad nula. Se elaboró una base de datos en Excel y la información se procesó utilizando el programa Prism Graph Pad versión 6.0 para Windows.

En la **Figura 2**, se muestra el diagrama general de trabajo y la metodología que se utilizará en comparación con la metodología estándar para la evaluación de la expresión o presencia de una proteína determinada.



Figura 2. Comparación entre el método tradicional en la búsqueda de marcadores y la tecnología de microarreglos y patología digital.

3. Introducción.

La familia de proteínas TRK son proteínas transmembranales constituidas por los miembros TRKA, TRKB y TRKC y funcionan como receptores con actividad intrínseca de tirosina cinasa (Cocco, Scaltriti and Drilon, no date; Amatu *et al.*, 2019). Estos receptores se expresan predominantemente en el tejido neuronal y tienen un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso central y periférico; así como en la sensación de dolor y el normal funcionamiento del sistema nervioso (Amatu *et al.*, 2019). Los receptores TRK y sus ligandos han sido también implicados en funciones no neuronales en tejidos como el vascular, ovárico y el sistema inmune (Amatu *et al.*, 2019). Los receptores TRK contienen un dominio extracelular, un dominio transmembranal y uno de actividad de tirosina cinasa. En el dominio extracelular se encuentran una región rica en cisteína, una región de repetidos de leucina conocida como LRR1-3 específico de estos receptores y el sitio de unión al ligando (Amatu *et al.*, 2019).

Los receptores TRK son activados por proteínas llamadas neurotrofinas. El factor de crecimiento neural NGF (Nerve Growth Factor) se une al receptor TRKA, el factor neurotrófico derivado del cerebro BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) y la neurotrofina 4 (NT-4) se unen al TRKB y la neurotrofina 3 (NT-3) se une al TRKC pero es capaz de unirse también a los otros receptores aunque con menor afinidad (Cocco, Scaltriti and Drilon, no date; Amatu *et al.*, 2019). La vía de señalización inicia con la unión de la neurotrofina con el dominio extracelular del TRK induciendo la homodimerización del receptor (Cocco, Scaltriti and Drilon, no date; Amatu *et al.*, 2019). La dimerización del receptor conlleva a la autofosforilación del dominio cinasa y de los dominios tirosina que ayudan al reclutamiento de proteínas río abajo con dominios SH2. En el caso del TRKA se activa la vía MAPK a través de Ras induciendo proliferación y crecimiento (Amatu *et al.*, 2019). El receptor TRKB activa las vías PI3K y PLC γ a través de Ras-ERK induciendo diferenciación neuronal y supervivencia (Cocco, Scaltriti and Drilon, no date; Amatu *et al.*, 2019). El receptor TRKC activa la vía PI3K-AKT induciendo supervivencia celular e inhibiendo apoptosis (Amatu *et al.*, 2019) (**Fig.3**).

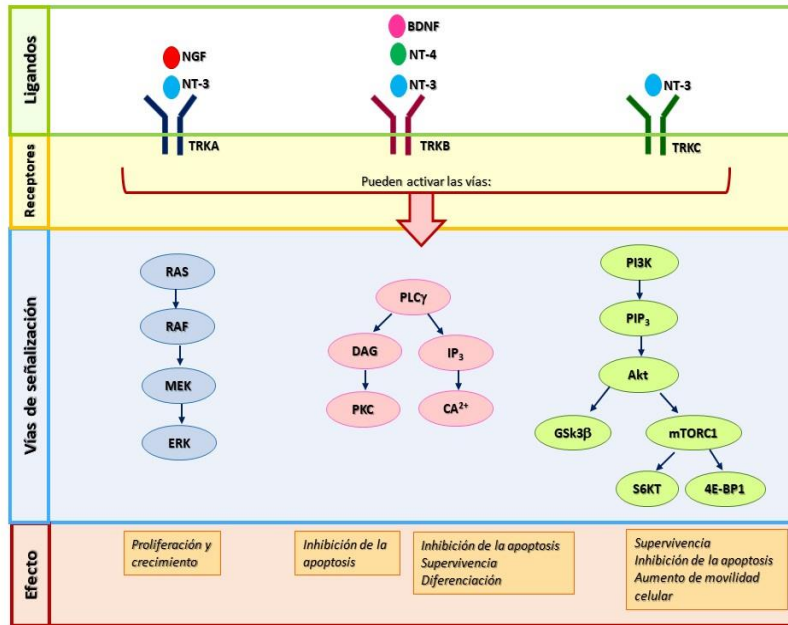


Figura 3. Vías de señalización de los receptores TRK. Representación de las vías activadas por los receptores TRKA, TRKB y TRKC tras la unión de sus respectivos ligandos y el efecto celular de la activación de estas vías de señalización. NGF (nerve-growth factor; factor de crecimiento neural), NT-3 (neurotrofina 3), BDNF (brain-derived neurotrophic factor; factor neurotrófico derivado del cerebro), NT-4 (neurotrofina 4).

Los receptores TRK han sido identificados en diferentes patologías incluido el cáncer (Amatu *et al.*, 2019). En esta enfermedad hay una activación de estos receptores por los tres clásicos mecanismos de cambio de proto-oncogen a oncogen 1) mutaciones 2) sobre expresión de TRKs y las 3) Translocaciones. Las fusiones TRK son proteínas con una activación constitutiva de la cinasa, independientemente de la unión al ligando y son capaces de activar las mismas vías de señalización que las proteínas TRKs silvestres (Cocco, Scaltriti and Drilon, no date). Un ejemplo de lo anterior es la translocación del gen *NTRK3* (localizado en el brazo largo del cromosoma 15) y el gen *ETV6* (localizado en el brazo corto del cromosoma 12). La proteína de fusión resultante entre el factor de transcripción *ETV6* y el dominio cinasa del receptor TRKC activan las vías MAPK y PI3K al igual que el receptor TRKC silvestre (Jin *et al.*, 2007).

Las fusiones de los genes *NTRKs* se han encontrado en alrededor del 1% de los tumores sólidos (Stransky, Drilon) y su frecuencia puede dividirse en dos grupos de tumores, los tumores raros que presentan una alta frecuencia (>80%) y los tumores comunes que presentan una baja frecuencia (< 25%). En las tablas 1 y 2 se resumen las frecuencias de las fusiones de los genes *NTRK* en los diferentes tipos de tumores.

Tabla 1. Frecuencia de las fusiones NTRK en tumores de población adulta.

ADULTOS					
Tipo de cancer	Población		N	Frecuencia	
Glioblastoma multiforme	Blanco	81 39%	162	1%	6
	Negro	2 1%			
	Asiático	1 0%			
	Am. Indian	1 0%			
	Hawaiano	0 0%			
	Desconocido	121 59%			
	Muestra de un sitio rural				
	Universidad de Duke	5 2%			
	Hospital Henry Ford	73 35%			
MD Anderson	86 42%				
UC San Francisco	42 20%				
Carcinoma secretorio análogo mamario de glándulas salivales	Hospital Johns Hopkins (Orleans st, USA)		4	100%	7
Cáncer papilar de tiroides	Istituto Nazionale Tumori (Milan, Italy), w		76	11.8% (NTRK1)	8
	Pacientes post-Chernobyl con Cáncer asociado a tiroides		62	14.5% (NTRK3)	9
Carcinoma Secretor de Mama	-Departamentos de patología Children's and Women's Health Centre of British Columbia, Hospital para niños enfermos. -Instituto de Patología e Imunología Molecular da Universidade do Porto. -Instituto de patología Gerhard-Domagk, Westfaelische-Wilhelms University -Hospital Burnaby General, Burnaby, Canada.		13	92%	10
Colangiocarcinoma Intrahepático	Centro OncologicoIntegral de la Universidad de Chicago 18 hombres, 10 mujeres con una media de 55.9 años		28	3.6% (NTRK1)	11

Tabla 2. Frecuencia de las fusiones NTRK en tumores de población infantil.

Infantes					
Tipos de cáncer	Población	(n)	Frecuencia	Ref.	
Gliomas de alto grado	Hospital de Investigación Infantil St. Jude Instituto de Investigación del Cáncer / Royal Marsden Hospital	127	10% (NTRK1/2/3)	12	
Astrocitoma Pilocítico	Proyecto PedBrain Tumor del Consorcio Internacional del Genoma del Cáncer (ICGC) (Alemania)	73	3.1% (NTRK3)	13	
Fibrosarcoma Infantil	Centro de Salud Infantil y Femenino de la Columbia Británica, Vancouver, Columbia Británica, Canadá.	11	91% (NTRK3)	14	
	Hospital para niños, Boston, MA	6	100% (NTRK3)	15	

Nefroma Mesoblástico congénito	Hospital para niños, Boston, MA	6	83% (ETV6-NTRK3)	15
	Centro Nacional de Patología del Estudio de Tumores de Wilms. Departamento de Patología, Children's Hospital, Denver.	2	83% (ETV6-NTRK3)	16

Los eventos de fusión génica parecen ser más comunes entre los genes *NTRK1* y *NTRK3*, con excepción de los tumores cerebrales (Stransky *et al.*, 2014; Drilon *et al.*, 2018; Kummar and Lassen, 2018). La fusión *ETV6-NTRK3* es la más frecuente (95%) en los carcinomas secretores de mama, de glándulas salivales, fibrosarcoma y nefronas mesoblásticas (Marchiò *et al.*, 2019).

3.1. Justificación.

Las fusiones de los genes *NTRK* ocurren en diferentes tipos de tumores y se ha establecido que su frecuencia es alta en tumores raros, mientras que en tumores comunes su frecuencia es baja. Hasta el momento se desconoce la frecuencia de estas fusiones en los tumores de Wilms y osteosarcoma, los cuales representan algunos de los tumores más prevalentes en la edad pediátrica.

En la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” se ha implementado la técnica de microarreglo de tejidos, la cual permite el análisis simultáneo de varias muestras de tejido para diversas técnicas principalmente por inmunohistoquímica (IHQ). Por esta razón se propone identificar utilizando la técnica de MAT, la fusión de los genes *NTRK* por IHQ en muestras de pacientes con osteosarcoma y tumor de Wilms mediante IHQ. El análisis de la presencia de fusión se evaluará por patología digital.

3.2. Área de estudio

Las actividades se enfocaron principalmente en la construcción de microarreglos, tinciones e inmunohistoquímica en muestras de osteosarcoma y Tumor de Wilms, y en la identificación de la proteína Yin Yang (YY1). Estas actividades que serán parte del estudio ya mencionado serán realizadas en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” en la Unidad de Investigación en enfermedades Oncológicas (UIEO).

3.3. Objetivos

Objetivo general.

Determinar la frecuencia de la fusión de TRK en biopsias de pacientes con osteosarcoma y tumor de Wilms en población mexicana.

Objetivos particulares:

Nota: Estos objetivos son los que se desarrollaron en este presente informe de servicio social.

- Construir un microarreglo de tejidos de biopsias de pacientes diagnosticados con osteosarcoma y Tumor de Wilms.
- Identificar diferentes tipos de osteosarcoma y cáncer de Wilms, mediante tinciones H&E de los micro arreglos.
- Determinar en los microarreglos de tejido de osteosarcoma y tumor de Wilms, la expresión de la proteína Yin Yang 1 (YY1), la cual se sabe está altamente expresada en estos dos tipos de tumores, con el propósito de evaluar la calidad del tejido en cada microarreglo.

4. Especificación, fundamento e impacto de las actividades desarrolladas

Resultados

4.1. Construcción de microarreglo de tejido osteosarcoma y análisis de la expresión de YY1

Se revisaron 45 expedientes de pacientes con diagnóstico de osteosarcoma de acuerdo al registro del departamento de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez; en conjunto con el patólogo se seleccionaron los bloques con suficiente cantidad de tejido para estudio; de dicha selección se obtuvieron 40 casos. Los datos clínicos de estos pacientes se presentan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Características de las muestras patológicas incluidas en el estudio.

Muestra	Edad	Género	Sitio primario	Metástasis al diagnóstico		Condición actual
				Si	No	
1	10	M	Húmero proximal	x		Muerto con enfermedad
2	10	F	Fémur distal		x	Abandono con enfermedad
3	13	F	Tibia proximal		x	Vivo sin enfermedad
4	13	F	Tibia proximal	x		Muerto tratamiento
5	11	F	Fémur distal		x	Abandono con enfermedad
6	6	M	Fémur distal		x	Abandono con enfermedad
7	10	M	Peroné		x	Muerto tratamiento
8	15	F	Fémur distal		x	Muerto con enfermedad
9	11	F	Húmero proximal	x		Muerto con enfermedad
10	15	F	Fémur distal		x	Muerto con enfermedad
11	15	F	Fémur distal	x		Muerto con enfermedad
* 12	12	M	Tibia proximal		x	Vivo sin enfermedad
13	9	F	Fémur distal		x	Vivo sin enfermedad
14	14	F	Húmero proximal		x	Abandono con enfermedad
15	14	M	Fémur distal		x	Vivo sin enfermedad
*16	12	F	Tibia proximal	x		Vivo sin enfermedad
*17	11	F	Peroné		x	Vivo sin enfermedad
18	10	F	Metástasis pulmonar		x	Abandono con enfermedad
19	15	M	Peroné	x		Muerto con enfermedad
20	13	F	Peroné	x		Muerto con enfermedad
21	10	F	Fémur distal		x	Abandono con enfermedad
22	10	M	Metástasis pulmonar		x	Muerto con enfermedad
23	13	M	Desarticulación fémur distal		x	Abandono con enfermedad
24	15	F	Metástasis pulmonar	x		Muerto con enfermedad
25	15	F	Metástasis pulmonar	x		Muerto con enfermedad
26	13	M	Fémur distal		x	Vivo sin enfermedad
27	13	M	Biopsia diagnóstica		x	Abandono con enfermedad
28	15	F	Fémur distal		x	Vivo sin enfermedad
29	12	F	Fémur distal		x	Muerto con enfermedad
30	15	M	Fémur distal	x		Muerto con enfermedad
31	9	M	Fémur distal		x	Vivo sin enfermedad
32	12	F	Metástasis pulmonar		x	Muerto con enfermedad

Posterior a que las muestras de pacientes con osteosarcoma y los datos clínicos fueron recolectados, se procedió a diseñar los mapas virtuales para construir los MATs, los cuales se presentan en la **Figura 4**. A partir de los bloques de parafina de cada una de las muestras de los pacientes.

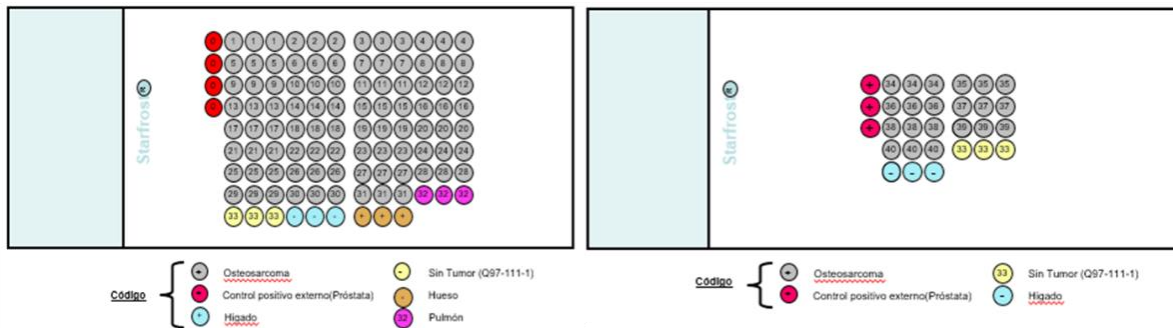


Figura 4. Mapa virtual de los microarreglos de osteosarcoma. Organización del arreglo de las 42 muestras de pacientes diagnosticados con osteosarcoma en los MAT. Cada una de las muestras de los pacientes fueron incluidas por triplicado. Se incluyó tejido control para ubicar el inicio del MAT (círculos en rojo), así como controles positivos (círculos en color café) y negativos (círculos verdes).

En la **Figura 5**, se muestran fotografías representativas del flujo de trabajo que se llevó a cabo para la construcción de los MAT.

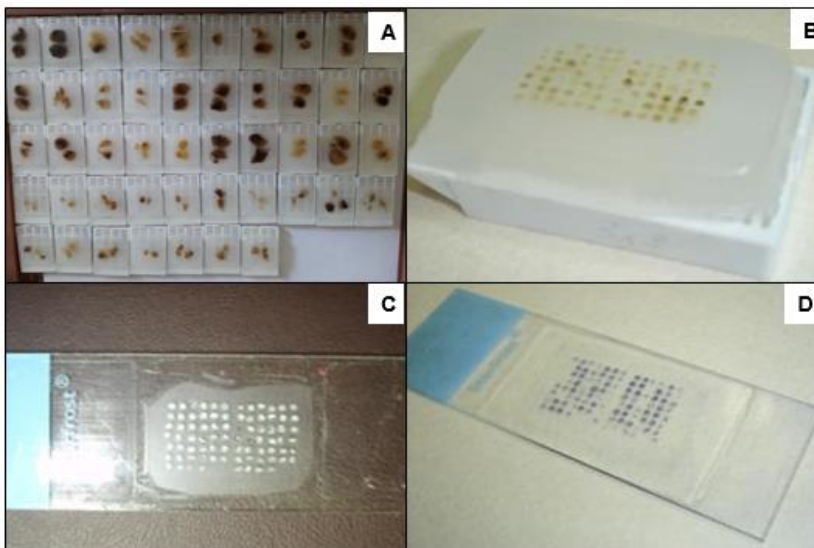


Figura 5. Construcción de los MAT. A) A partir de 90 muestras de tumores de pacientes con osteosarcoma y Tumor de Wilms, y con ayuda de un patólogo experto se seleccionaron áreas representativas de cada muestra. Se obtuvo un área de la muestra al perforar con una aguja de calibre 0.5 mm, colocándolo en un bloque receptor con parafina. B) Construcción del MAT con las diferentes muestras de pacientes. C) Corte de un micro arreglo en un portaobjetos. D) Tinción histológica de H&E, listo para su análisis y caracterización.

Después de la construcción de los microarreglos, se realizaron cortes de 4μ , con el propósito de teñirlos con H&E, esto con la finalidad de observar la integridad y calidad de cada una de las muestras (spots) contenidas en el MAT. En donde se

puede observar claramente la presencia de células tumorales, así como también de células del infiltrado inflamatorio (**Figura 6**).

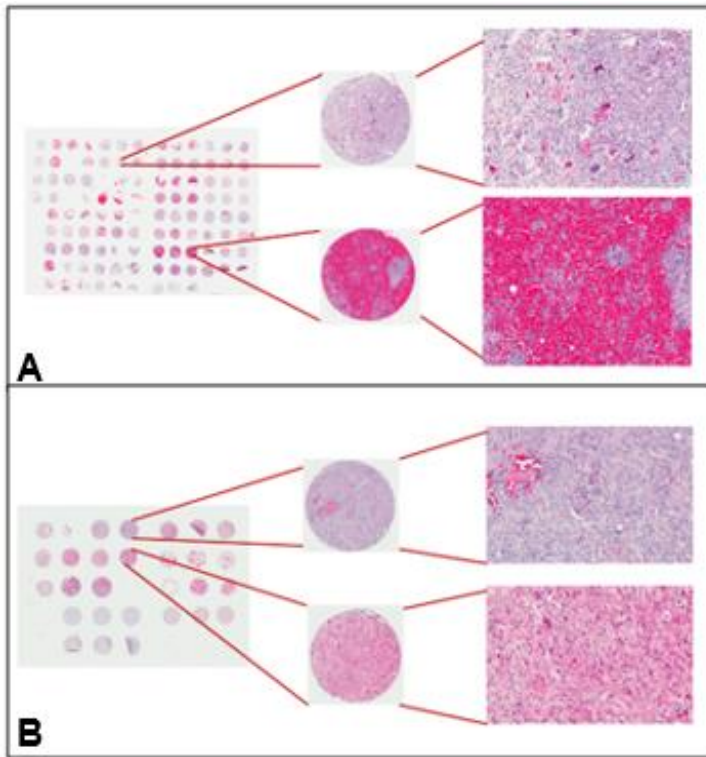


Figura 6. Tinción de H&E de los MAT de osteosarcoma. A) MAT 1 y B) MAT 2. Escaneados a un aumento de 20x con el digitalizador de imágenes ScanScope Cs. Donde se muestra el micro arreglo completo y las muestras seleccionadas representativamente para su posterior caracterización y diferenciación histológica

Con esta herramienta además podemos identificar diferentes pacientes con diferentes grados de osteosarcoma en la misma laminilla, la **Figura 7** muestra algunos ejemplos de osteosarcoma de alto y bajo grado, así como controles sin tumor y tejido óseo sano.

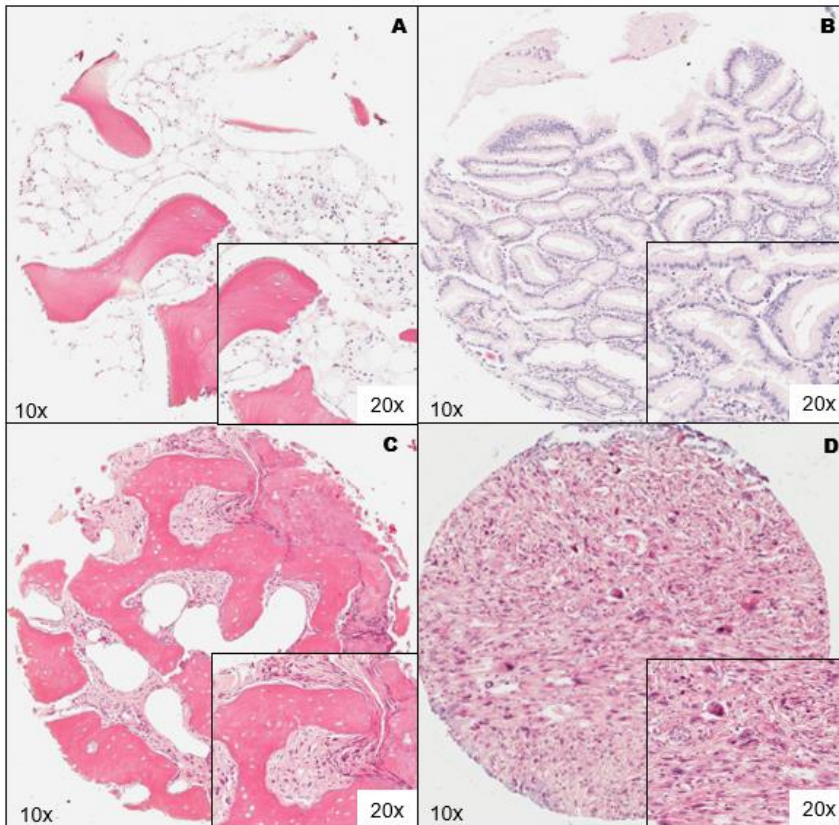


Figura 7. Ejemplo de diferentes tipos de osteosarcoma en los TMAs. A) Muestra histológica sin tumor. **B)** Hueso. **C)** Osteosarcoma de bajo grado, donde podemos observar que el componente histológico presenta trabéculas de hueso bien formadas, arregladas en forma paralela, además, muestra células tumorales en forma de uso con mínima atipia, proliferando en fascículos dentro de estroma fibroso. El componente dediferenciado presenta células tumorales malignas pleomórficas con severa atipia produciendo ostioides de tipo lazo **D)** Osteosarcoma de alto grado, caracterizado por la presencia de células alargadas y delgadas, conocidas como células fusiformes, con una mínima o nula cantidad de matriz ósea y con o sin la presencia de cartílago. La cantidad de tejido osteoide que se forma en este subtipo de osteosarcoma convencional es prácticamente inexistente (Tinción H&E, magnificación a 10X y 20X).

De la misma forma con la construcción de la base de datos clínicos podemos identificar los diferentes subtipos histológicos de osteosarcoma que conforman nuestro TMA, como se muestra en la **Figura 8**. Particularmente nuestro TMA contiene osteosarcoma de los subtipos I, II, IV y VI.

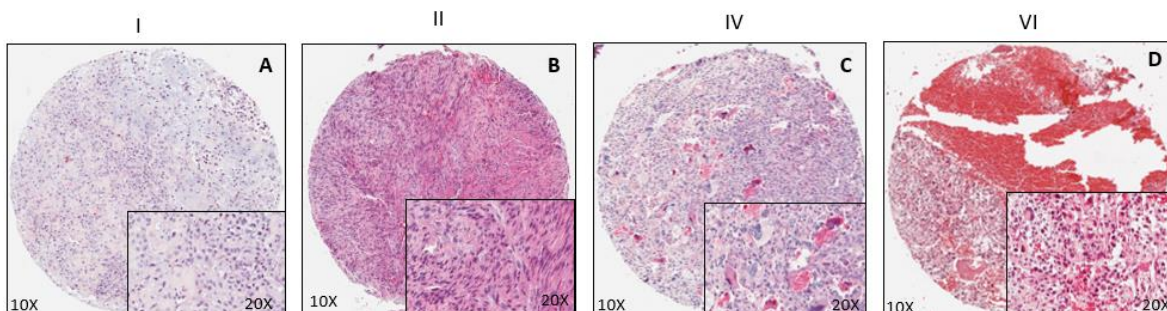


Figura 8. Subtipos histológicos de osteosarcoma. De la información recopilada en la base de datos, se obtuvieron imágenes representativas de los diferentes subtipos histológicos de osteosarcoma. **A) I, B) II, C) IV y D) VI,** (Tinción H&E, magnificación a 10X y 20X).

Después de valorar la integridad y calidad del tejido mediante tinción con H&E de los MATs de osteosarcoma, se procedió a evaluar la expresión del factor de transcripción YY1, proteína que ha sido reportada por diversos grupos de trabajo que se encuentra sobreexpresada en tumores. Lo anterior con la finalidad de asegurarnos que, el tejido incluido en los MATs, la estructura de los epitopes (antígenos) no se haya dañado debido al tratamiento a los que son sometidos los tejidos, durante todo el procedimiento de la obtención de los MAT.

En la **Figura 9**, se muestran microfotografías representativas de la inmunotinción para YY1, en donde se observa una clara expresión de esta proteína a nivel tanto citoplasmática, como nuclear. Siendo predominante en núcleo.

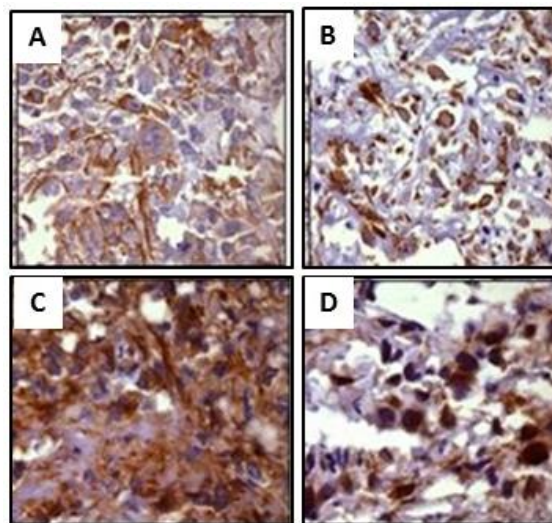


Figura 9. Expresión de YY1 en muestras de osteosarcoma. **A.** Baja expresión de YY1 localizada en citoplasma en muestra de biopsia de paciente masculino sin enfermedad metastásica. **B.** Expresión media de YY1 localizada en citoplasma de biopsia diagnóstica paciente masculino sin enfermedad metastásica. **C.** Expresión alta de YY1 localizada en citoplasma de metástasis pulmonar de osteosarcoma. **D.** Expresión nuclear de YY1 en desarticulación de paciente con enfermedad metastásico sin tratamiento de quimioterapia previo.

4.2. Construcción de microarreglo de tejido, tumores de Wilms y análisis de la expresión de YY1.

Se revisaron 79 expedientes de pacientes con diagnóstico de tumores de Wilms de acuerdo al registro del departamento de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez; en conjunto con el patólogo se seleccionaron los bloques con suficiente cantidad de tejido para estudio; de dicha selección se obtuvieron 50 casos. Los datos clínicos de estos pacientes se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes tumores de Wilms y su correlación con la expresión de YY1.

Características Clínicas	Total n=79	YY1 > 190000 (n=40)	p
Sexo (femenino)	39 (49.4%)	18 (45%)	0.42
Edad en meses (media, SD)	40 (26.1) 9-156	40.8 (22.9) 12-108	0.84
<u>Sitio primario</u>			0.665
Derecha	40 (50.6%)	19 (47.5%)	
Izquierda	36 (45.6%)	20 (50%)	
Bilateral	3 (3.8%)	1 (2.5%)	
<u>Estadio</u>			0.301
I	13 (16.5%)	9 (22.5%)	
II	24 (30.4%)	9 (22.5%)	
III	30 (38%)	15 (37.5%)	
IV	9 (11.4%)	6 (15%)	
V	3 (3.8%)	1 (2.5%)	
<u>Presencia de metástasis</u>	21 (26.6%)	15 (37.5%)	0.022
<u>Sitio de metástasis al diagnóstico</u>	28 (35.4%)	15 (37.5%)	
Nódulos	6 (7.6%)	4 (10%)	
Pulmón	12 (15.2%)	9 (22.5%)	
Hígado	2 (2.5%)	1 (2.5%)	
Pulmón e Hígado	1 (1.3%)	1 (2.5%)	

Posteriormente se diseñó un mapa virtual (**Figura 10**), el cual sirvió de base para la posterior construcción de los TMAs correspondientes a los pacientes con Tumores de Wilms. Cada muestra de paciente se incluyó por triplicado y además se adicionaron controles positivos y negativos al diseño de los TMAs.

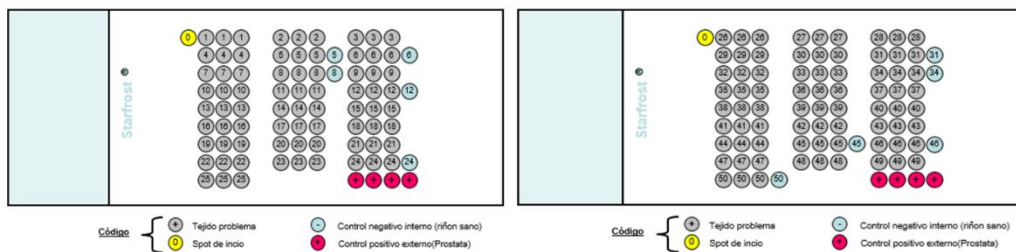


Figura 10. Mapa virtual de los dos microarreglos de tumores de Wilms. Este mapa nos muestra la manera en que se planeó el arreglo de las 50 muestras de pacientes diagnosticados con Tumor de Wilms en los MAT.

Cada una de las muestras fueron incluidas por triplicado. Se incluyó tejido control para ubicar el inicio del MAT (círculo en amarillo), así como controles positivos (próstata, círculos en color rojo) y negativos (riñón sano, círculos azules).

Después de la construcción de los microarreglos, se realizaron cortes de 4 μ , para realizar una tinción de H&E, esto con la finalidad de observar la integridad y calidad de cada una de las muestras (spots) contenidas en el MAT (**Figura 11**).

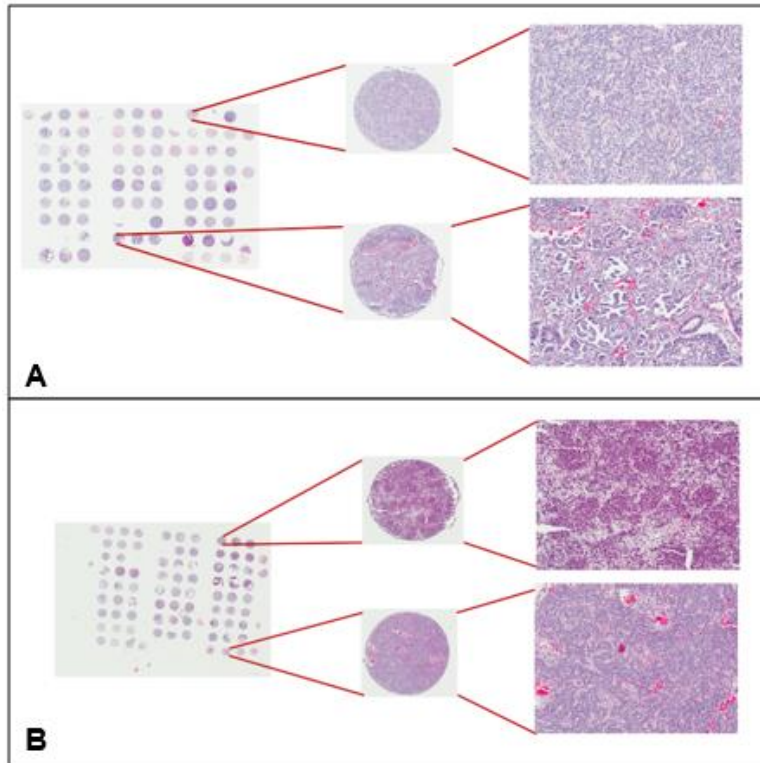


Figura 11. Tinción de H&E en los TMAs de Tumor de Wilms. A) MAT 1 y B) MAT 2. Las imágenes se obtuvieron con ayuda del digitalizador de imágenes ScanScope Cs. Donde se muestra el micro arreglo completo y las muestras que fueron seleccionadas representativamente para su posterior caracterización y diferenciación histológica. (tinción H&E, magnificación a 10X y 20X).

La **Figura 12** nos muestra algunos ejemplos de diferentes tipos histológicos de Tumores de Wilms que contiene nuestro TMA (Trifásico y de tipo blastemal) así como la morfología que presenta un riñón sano.

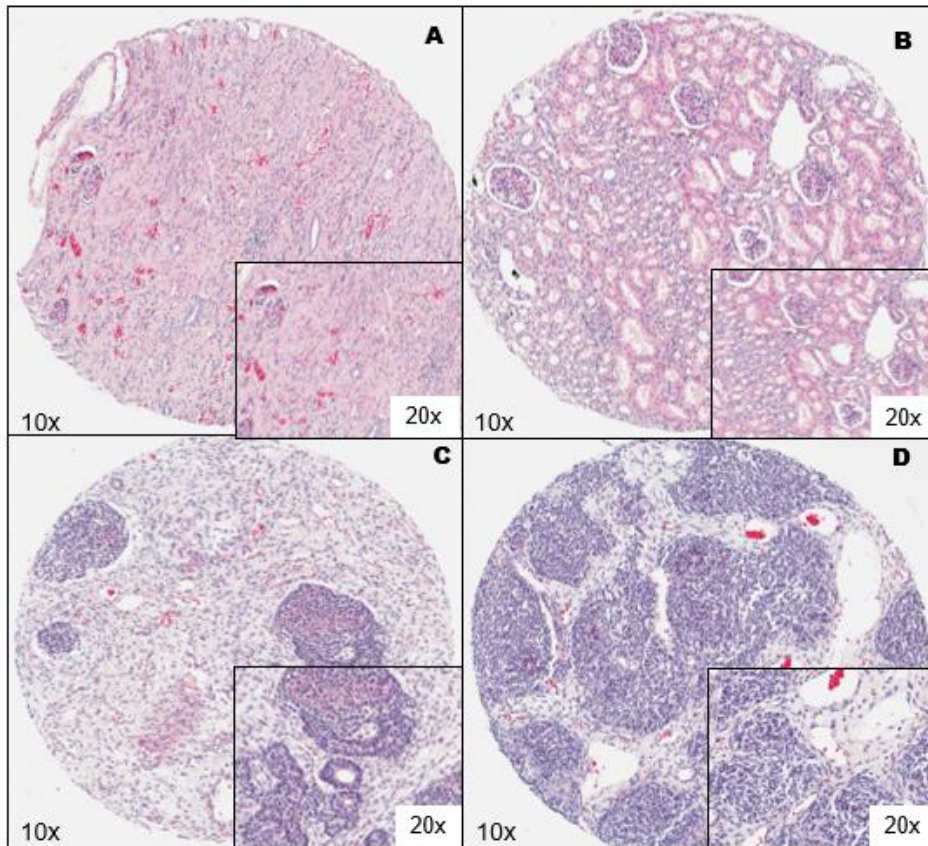


Figura 12. Ejemplo de diferentes tipos de Tumores de Wilms en los TMAs A) y B) Riñón sano. C) Tumor de Wilms trifásico, donde se puede apreciar el componente blastemal compuesto de células pequeñas sin citoplasma, con mitosis y núcleo hiper cromático. El epitelio con tubos y quistes con epitelio cilíndrico o cúbico. Y finalmente la mesénquima con estroma mucoso o fusocelular. D) Tumor de Wilms blastemal, que presenta patrones serpinginosos, nodulares y difusos. (Tinción H&E, magnificación a 10X y 20X).

De igual manera con la construcción de la base de datos clínicos podemos identificar a los pacientes con diferentes etapas de la enfermedad en nuestros TMAs. La **Figura 13** nos muestra imágenes representativas de las diferentes etapas por las cuales puede cursar un paciente con Tumor de Wilms.

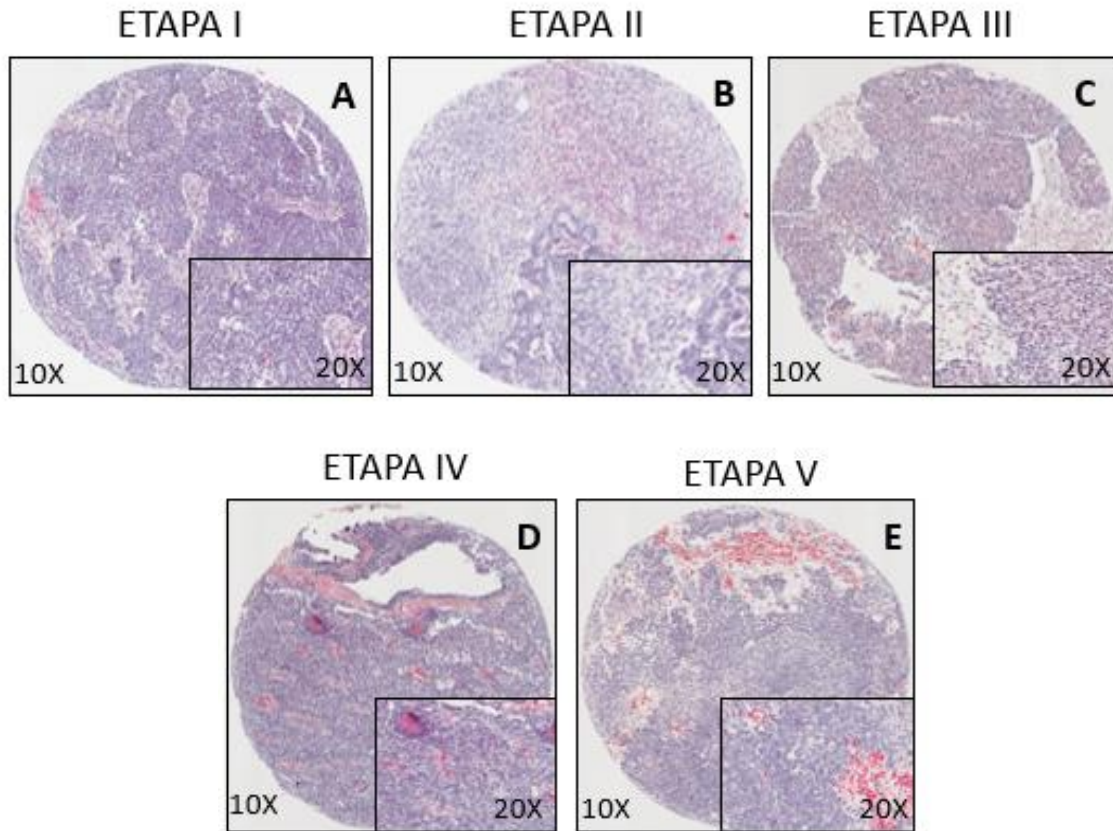


Figura 13. Diferentes etapas de Tumor de Wilms. De acuerdo con los datos clínicos de los pacientes se pudieron identificar las diferentes etapas de los Tumores de Wilms, eligiendo imágenes representativas. **A)** ETAPA I: Se caracteriza por ser un tumor limitado y que puede ser completamente extirpado sin ningún daño antes o durante la cirugía (no hay tumor residual). **B)** ETAPA II: el tumor se extiende más allá del riñón, es decir, hay una extensión del tumor y los vasos que se encuentran fuera de la sustancia renal están infiltrados o contienen trombos tumorales. **C)** ETAPA III: Se diferencia por la presencia de un tumor residual no hematógeno confinado al abdomen, en donde el tumor se extiende más allá de los márgenes quirúrgicos ya sea microscópica o macroscópicamente. **D)** ETAPA IV: Existe la presencia de metástasis hematógenas, en donde se observan depósitos más allá del estadio III (Pulmón, hígado, hueso y cerebro). **E)** ETAPA V: Existe una participación bilateral al diagnóstico. (Tinción H&E, magnificación a 10X y 20X).

Después de valorar la integridad y calidad del tejido mediante tinción con H&E de los MATs de tumores de Wilms, se procedió a evaluar la expresión de YY1 para asegurarnos que el tejido incluido en los MATs y la estructura de los epítomos (antígenos) no se haya dañado debido al tratamiento a los que son sometidos los tejidos, durante todo el procedimiento de la obtención de los MAT (**Figura 14**).

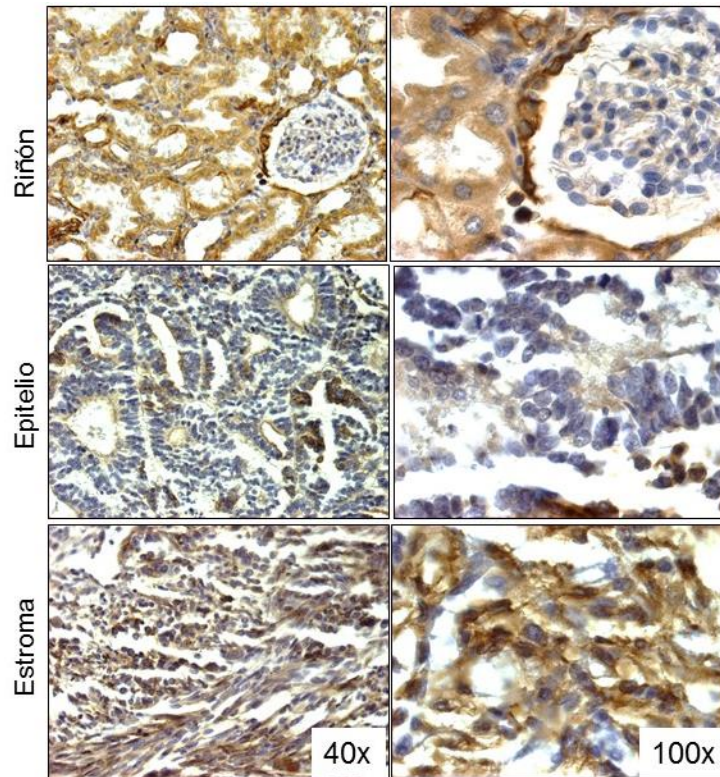


Figura 14. Expresión de YY1 en muestras de tumores de Wilms. A) Baja expresión de YY1 localizada en citoplasma en muestra de biopsia de paciente masculino sin enfermedad metastásica. **B)** Expresión media de YY1 localizada en citoplasma de biopsia diagnóstica paciente masculino sin enfermedad metastásica. **C)** Expresión alta de YY1 localizada en citoplasma de metástasis pulmonar de osteosarcoma. **D)** Expresión nuclear de YY1 en desarticulación de paciente con enfermedad metastásico sin tratamiento de quimioterapia previo.

4.3. Impacto

En el presente este estudio, resultó de gran relevancia construir un microarreglo de tejidos (MATs), para identificar la presencia de la fusión NTRK, en pacientes con osteosarcoma y tumores de Wilms. Los MATs proporcionan una nueva técnica de alto rendimiento para estudiar el perfil molecular, la expresión del mRNA o el análisis de las alteraciones cromosómicas mediante hibridación *in situ* de múltiples muestras de tejido de manera simultánea (Kononen *et al.*, 1998). Esta técnica proporciona la posibilidad de estudiar nuevos marcadores o los ya existentes de manera masiva a la vez que facilita las colaboraciones intra-e interinstitucionales. Las muestras de tejidos incluidas en el MATs facilita y acelera el traslado de la información obtenida a la práctica clínica ya que elimina por completo las limitaciones de las técnicas convencionales, como la necesidad de estudiar uno a uno miles de especímenes para su estudio repitiendo los ensayos y con las consiguientes y extensas validaciones, por lo que disminuye costos, tiempo para la obtención de resultados, y de manera muy importante, disminuye al mínimo la variabilidad inter-ensayo. A su vez, los MATs preserva las muestras originales de tejido que con los métodos tradicionales disminuyen en cantidad y se deterioran por el uso frecuente. Todos los cilindros así obtenidos se incorporan a un bloque de parafina receptor que puede contener desde 20 hasta 600 muestras y que es a su vez cortado en múltiples secciones para llevar a cabo ensayos mediante técnicas inmunohistoquímicas, de hibridación *in situ*, en un único ensayo proporcionando así información de todos los especímenes de la laminilla a la vez, reproduciéndose fidedignamente las condiciones del ensayo para todas las muestras.

El primer paso en el diseño de un MAT es la selección de los pacientes a estudiar. La posibilidad intrínseca a la técnica de analizar muchos casos, permite la inclusión de un número suficiente de pacientes en diferentes situaciones clínicas. Para ello es de gran utilidad el trabajo con bases de datos clínicas y patológicas actualizadas. En nuestro estudio se seleccionaron 40 pacientes pediátrico con osteosarcoma y 50 pacientes con tumores de Wilms. Se realizó una selección previa de los casos atendiendo a los criterios clínicos y la calidad del material disponible. De esta manera, se obtuvo información relevante para crear una base de datos que se

presentan en las Tablas 3 y 4. Posteriormente, se crearon los mapas virtuales que se presentan en las figuras 4 y 10, en donde se observa como las muestras fueron arregladas en cada uno de los MATs, en todos los casos se utilizó una aguja de 0.6 diámetros. Posteriormente, con la finalidad de evaluar si la disposición de cada uno de los tejidos incluidos en los MATs, correspondía al mapa virtual diseñado, los bloques de los MATs, fueron cortados en un micrótopo, colocados en una laminilla y teñidos con H&E, para su evaluación detallada mediante patología digital. Como se muestra un ejemplo en uno de los MATs, presentado en la Figura 5. Las microfotografías presentadas en las figuras 6 y 11, demuestran que la decisión de las muestras incluidas en los MATs, correlacionan en más de un 90 % con los mapas virtuales, lo cual refleja la adecuada disposición de las muestras, para los estudios posteriores. Otra de las ventajas de construir un MAT, es que se pueden hacer diagnósticos más rápidos y precisos, pues el patólogo puede tener en una sola laminilla muestras con diferentes características patológicas. Como mostramos en las Figuras 7 y 13, se observa cómo se puede hacer fácilmente una clasificación de los tumores incluidos en los MATs, de acuerdo al grado histológico en el caso de osteosarcomas (Figura 7) o por etapa, como en el caso de tumores de Wilms (Figura 13).

Después de verificar la calidad de la disposición y la estructura de los tejidos incluidos en los MATs, el siguiente paso a seguir es verificar que la estructura de las proteínas no se haya afectado tanto durante el proceso de parafinación y construcción del MAT, que resulte en un enmascaramiento de las proteínas a identificar (epitopes). Para ello, evaluamos mediante la técnica de IHQ, la expresión de la proteína Yin-Yang 1 (YY1), la cual estudios previos han reportado que se encuentra altamente expresado en tumores de Wilms y osteosarcoma (Nigris et al., 2011; Zapata-Tarres et al., 2019). En las Figuras 9 y 14, se muestra que la expresión de YY1 es muy clara, sobre todo a nivel nuclear, aunque en algunos casos es muy predominante a nivel citoplasmático. Lo anterior sugiere fuertemente, que la calidad de la estructura de las proteínas, no se afecta de manera importante para poder ser evaluada. Lo cual resulta de gran relevancia, cuando se pretende identificar por primera vez la presencia de una proteína en estos dos tipos de tumores. Como es el caso de la fusión NTRK, en los dos MATs de osteosarcoma y los dos MATs de tumores de Wilms. Lo cual constituye la última parte de este estudio. En donde, un

control de tejido que sea contenga la fusión de NTRK, debe ser incluido como control positivo en la inmunohistoquímica.

4.4. Aprendizaje y habilidades obtenidas

A través de las actividades realizadas en el presente servicio social, Se han adquirido diversos conocimientos, los cuales constan de distintos procedimientos previos para llegar a los diferentes objetivos. En el presente estudio, primeramente se realizó la elaboración de una base de datos completa; recolectando los datos más representativos de las muestras, seguido de ello se obtuvieron los conocimientos necesarios que fueron proporcionados por los técnicos del laboratorio para elaborar de una manera precisa y organizada mapas virtuales y así poder construir los MATs, a causa de ello las muestras que se incluyeron en los microarreglos, los cuales, llevaron un proceso inmunohistoquímico el cual se pudo desempeñar exitosamente, de igual forma se obtuvieron los conocimientos necesarios para el procesamiento de las muestras mediante un análisis de patología digital, con un digitalizador de imágenes Scanscope CS (Aperio, San Diego, CA. USA). El cual permitió cuantificar la intensidad de expresión total por célula y así poder diferenciar y describir los diferentes tipos y subtipos histológicos de las muestras de osteosarcoma, al igual que los diferentes tipos y etapas de las muestras más representativas de los Tumores de Wilms. Se considera que los conocimientos adquiridos ya mencionados son de gran relevancia, debido a que los MATs han demostrado ser un potente instrumento para la investigación ayudando al análisis masivo del perfil molecular de la patología tumoral. Facilita y acelera el traslado de la información obtenida a la práctica clínica, así como también permite que los tumores de las muestras sean tipificados con mayor rapidez.

4.5. Fundamento de las actividades

Se lograron construir cuatro MATs con un total de 95 muestras provenientes de pacientes pediátricos diagnosticados con osteosarcoma o con tumor de Wilms. En ellos se validó la disposición y la estructura adecuada de los tejidos incluidos. De manera muy importante mediante la evaluación de la expresión de la proteína YY1, se logró evaluar la calidad de la preservación de la estructura de las proteínas. Lo cual es indispensable para la adecuada evaluación de la fusión NTRK, la cual no ha sido reportada con anterioridad, en estos dos tipos de cáncer. Los MATs han demostrado ser un potente instrumento para la investigación ayudando al análisis masivo del perfil molecular de la patología tumoral. Facilita y acelera el traslado de la información obtenida a la práctica clínica, obviando muchas de las limitaciones de las técnicas convencionales. Esto permite tipificar cada tumor con mayor rapidez y precisión.

Los MATs contruidos en el presente estudio, en donde se evaluó la adecuada disposición y estructura de tejido, así como la preservación de la estructura de las proteínas (epitopes), están listos para que la identificación de la fusión NTRK se evaluada. Lo cual podría ofrecer en un futuro no muy lejano un tratamiento más individualizado y racional de los pacientes con osteosarcoma y tumores de Wilms que presenten esta fusión.

5. Referencias

- Amatu, A. *et al.* (2019) 'Tropomyosin receptor kinase (TRK) biology and the role of NTRK gene fusions in cancer', *Annals of Oncology*. Oxford University Press, pp. VIII5–VIII15..
- Cocco, E., Scaltriti, M. and Drilon, A. (no date) 'NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy'.
- Cook, P. J. *et al.* (2017) 'Somatic chromosomal engineering identifies BCAN-NTRK1 as a potent glioma driver and therapeutic target', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8(1), pp. 1–11.
- Drilon, A. *et al.* (2018) 'Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children', *New England Journal of Medicine*, 378(8), pp. 731–739.
- Gatalica, Z. *et al.* (2019) 'Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions', *Modern Pathology*. Springer US, 32(1), pp. 147–153.
- Hechtman, J. F. *et al.* (2017) 'Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of NTRK Fusions', *American Journal of Surgical Pathology*. Lippincott Williams and Wilkins, 41(11), pp. 1547–1551.
- Hong, D. S. *et al.* (2019) 'Larotrectinib in adult patients with solid tumours: A multi-centre, open-label, phase i dose-escalation study', *Annals of Oncology*. Oxford University Press, 30(2), pp. 325–331.
- Hsiao, S. J. *et al.* (2019a) 'Detection of Tumor NTRK Gene Fusions to Identify Patients Who May Benefit from Tyrosine Kinase (TRK) Inhibitor Therapy', *Journal of Molecular Diagnostics*. American Society for Investigative Pathology and the Association for Molecular Pathology, 21(4), pp. 553–571.
- Hsiao, S. J. *et al.* (2019b) 'Detection of Tumor NTRK Gene Fusions to Identify Patients Who May Benefit from Tyrosine Kinase (TRK) Inhibitor Therapy', *Journal of Molecular Diagnostics*. Elsevier B.V., pp. 553–571.
- Jin, W. *et al.* (2007) 'Cellular transformation and activation of the phosphoinositide-3-kinase-Akt cascade by the ETV6-NTRK3 chimeric tyrosine kinase requires c-Src', *Cancer Research*. American Association for Cancer Research, 67(7), pp. 3192–3200.
- Kononen, J. *et al.* (1998) 'Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens', *Nature Medicine*. Nat Med, 4(7), pp. 844–847. doi: 10.1038/nm0798-844.
- Kummar, S. and Lassen, U. N. (2018) 'TRK Inhibition: A New Tumor-Agnostic Treatment Strategy', *Targeted Oncology*. Targeted Oncology, 13(5), pp. 545–556.
- Li, Z. *et al.* (2007) 'ETV6-NTRK3 Fusion Oncogene Initiates Breast Cancer from Committed Mammary Progenitors via Activation of AP1 Complex', *Cancer Cell*, 12(6), pp. 542–558.
- Marchiò, C. *et al.* (2019) 'ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research', *Annals of Oncology*, 30(9), pp. 1417–1427.

Nigris, F. de et al. (2011) 'YY1 overexpression is associated with poor prognosis and metastasis-free survival in patients suffering osteosarcoma', *BMC Cancer*. BioMed Central, 11(1), p. 472. doi: 10.1186/1471-2407-11-472.

Rudzinski, E. R. *et al.* (2018) 'Pan-Trk Immunohistochemistry Identifies NTRK Rearrangements in Pediatric Mesenchymal Tumors', *American Journal of Surgical Pathology*, 42(7), pp. 927–935.

Stransky, N. *et al.* (2014) 'The landscape of kinase fusions in cancer', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5, pp. 1–10.

Zapata-Tarres, M. *et al.* (2019) 'Expression of YY1 in Wilms tumors with favorable histology is a risk factor for adverse outcomes', *Future Oncology*. Future Medicine Ltd., 15(11), pp. 1231–1241. doi: 10.2217/fon-2018-0764.