

Identificación de marcadores de transición epitelio-mesénquima (TEM) por inmunohistoquímica en osteosarcoma pediátrico y asociación con desenlaces clínicos

Identification of epithelial-mesenchymal transition markers (EMT) by immunohistochemistry in pediatric osteosarcoma and association with clinical outcomes

Eileen V. Fonseca^{a*}, Natalia Olaya^{b*}, Esteban F. Patiño^c,
Nelson H. Aponte^d, Adriana Linares Ballesteros^b

^aResidente de Oncohematología Pediátrica, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

^bUniversidad Nacional de Colombia. Fundación HOMI, Hospital Pediátrico la Misericordia. Bogotá, Colombia.

^cDepartamento de Patología, Fundación HOMI, Hospital Pediátrico la Misericordia. Bogotá, Colombia.

^dServicio de Oncohematología pediátrica Fundación HOMI, Hospital Pediátrico la Misericordia. Bogotá, Colombia.

*Ambas autoras contribuyeron en la misma medida como primer autor en este trabajo de investigación.

Recibido: 3 de marzo de 2022; Aceptado: 4 de junio de 2022

¿Qué se sabe del tema que trata este estudio?

En osteosarcomas los mecanismos biológicos asociados a su comportamiento clínico no están dilucidados y se ha planteado la transición epitelio mesénquima como un mecanismo que pueda explicar su agresividad clínica.

¿Qué aporta este estudio a lo ya conocido?

En este trabajo se identificaron mediante inmunohistoquímica dos factores de transcripción involucrados en la transición epitelio mesénquima en muestras de osteosarcoma pediátrico, estos resultados sugieren este tipo de células tumorales puede usar este mecanismo para diseminarse e invadir otros tejidos.

Resumen

La transición epitelio-mesénquima (TEM) es la capacidad de las células epiteliales y mesenquimales de intercambiar de fenotipo de forma transitoria; su identificación en células tumorales carcinomatosas se ha asociado con fenotipos clínicos agresivos. En sarcomas, este evento biológico se encuentra en estudio. **Objetivo:** evaluar la expresión de dos factores de transcripción involucrados en la TEM mediante inmunohistoquímica en osteosarcoma en pacientes pediátricos y su asociación con desenlaces clínicos. **Pacientes y Método:** Estudio retrospectivo en menores de 18 años con diagnóstico de osteosarcoma. Se realizó inmunohistoquímica para Snail y Twist-1 en muestras obtenidas al momen-

Palabras clave:

Factores de Transcripción;
Familia Snail;
Proteína 1 Relacionada con Twist;
Osteosarcoma;
Transición Epitelio-Mesénquima

to del diagnóstico. Posteriormente fue explorada la correlación entre la positividad de los marcadores con los desenlaces clínicos y con la supervivencia global. **Resultados:** 53 pacientes fueron incluidos. Para Snail, se encontró positivo en localización citoplasmática en 26 casos (49,1%) y esto se correlacionó con la presencia de metástasis múltiples ($p = 0,02$) y metástasis de localización ósea distantes ($p = 0,01$). Twist fue positivo en localización nuclear en 45 casos (84,9%) y no se encontraron asociaciones con las variables clínicas analizadas. **Conclusiones:** Snail y Twist-1, se detectaron en una frecuencia importante en muestras de pacientes pediátricos con osteosarcoma. Snail citoplasmático se correlacionó con presencia de enfermedad metastásica múltiple y metástasis óseas distantes. La positividad de ambos marcadores sugiere la activación de estas proteínas como reguladores de eventos de TEM en este tumor y se plantea un rol en los fenómenos que se relacionan con la presentación clínica de la enfermedad.

Abstract

The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is the ability of epithelial and mesenchymal cells to exchange phenotypes transiently. Its identification in carcinomatous cells has been associated with aggressive clinical phenotypes. In sarcomas, this ability is under study. **Objective:** to evaluate the expression of two transcription factors involved in EMT by immunohistochemistry in pediatric osteosarcoma and its association with clinical outcomes. **Patients and Method:** A retrospective cohort study in children under 18 years of age with osteosarcoma diagnosis. Immunohistochemistry was performed for Snail and Twist-1 expressions from samples collected at the time of diagnosis. Correlations between immunohistochemistry and the clinical outcomes and overall survival were performed. **Results:** 53 patients were included. There were 26 positive cytoplasmic cases (49.1%) in Snail expression and were correlated with the presence of multiple metastases ($p = 0.02$) and distant bone metastases ($p = 0.01$). On the other hand, 45 cases (84.9%) were positive in Twist-1 expression in the nuclear location, showing no association with the analyzed clinical variables. **Conclusions:** Snail and Twist-1 were frequently expressed in pediatric cases of osteosarcoma. Cytoplasmic Snail was correlated with the presence of multiple metastatic disease and distant bone metastases. The positivity of both markers suggests the activation of these proteins as regulators of EMT events in this tumor, suggesting a role in the phenomena related to the clinical presentation of the disease.

Keywords:

Transcription Factors;
Snail Family;
Twist-Related
Protein 1;
Osteosarcoma;
Epithelial-Mesenchymal
Transition

Introducción

La transición epitelio-mesénquima (TEM), un evento biológico en el cual las células epiteliales adoptan características de células mesenquimales y su inverso la transición mesénquima-epitelio (TME) que implica que células mesenquimales se comportan como células epiteliales. Estos intercambios fenotípicos son reversibles y las células tienen la capacidad de volver a adquirir su fenotipo original¹; ambos son procesos esenciales en fenómenos fisiológicos como la embriogénesis, organogénesis y cicatrización².

Los procesos de TEM/TME fueron identificados en células tumorales de origen epitelial que adquieren propiedades mesenquimales lo que les da la habilidad de extravasar, migrar e invadir tejidos distantes al tumor primario, cualidades que se han asociado con presentaciones clínicas de mayor agresividad y desenlaces de mal pronóstico³. Los sarcomas parecen también presentar este tipo de plasticidad celular exhibiendo un comportamiento inverso en el cual hay transición desde la célula mesenquimal al fenotipo epitelial, capa-

cidad que parece también asociarse a una mayor agresividad de la enfermedad⁴.

El sarcoma más frecuente en la edad pediátrica es el osteosarcoma es un tumor primario de hueso cuya incidencia oscila de 3 a 5 casos por millón en hombres y de 2 a 4 casos por millón en mujeres⁵. A la fecha los mecanismos biológicos subyacentes al comportamiento agresivo de los osteosarcomas no están completamente dilucidados, algunos trabajos indican que este tipo de tumores pueden sufrir cambios fenotípicos involucrados en la TME y TEM y esto tener implicaciones en la agresividad y desenlaces clínicos⁶⁻⁸.

Los eventos de TEM/TME se encuentran orquestados por un grupo de factores transcripcionales activadores cuyo conjunto básico incluye Snail1 (Snail), Snail2 (Slug), Twist-1, Twist-2, Zeb1 y Zeb2, estas moléculas regulan tanto los fenómenos biológicos como la activación en células tumorales^{9,10}.

Snail, además de regular procesos de TEM/TME durante el periodo embrionario y de organogénesis, su sobre-expresión se ha documentado en varios carcinomas, donde se ha correlacionado con una mayor

frecuencia de metástasis y mayor agresividad en la presentación clínica¹¹, y con quimio-resistencia, fundamentalmente a cisplatino, doxorubicina y 5-fluoracilo en cáncer de mama y ovario¹².

Twist-1, por su parte, tiene la capacidad de reprimir o inducir la expresión proteínas relacionadas con la regulación de la embriogénesis; y es fundamental en la regulación de cambios celulares, como la formación de invadopodios y la inducción de mimetismo vasculogénico¹⁰. Diversas investigaciones han demostrado que la expresión de Twist-1 se asocia con resultados clínicos desfavorables y una mayor frecuencia de metástasis en varios tipos de tumores sólidos, incluyendo próstata, cuello uterino, mama, estómago y páncreas¹³.

El objetivo de este estudio es evaluar la expresión de Snail y Twist-1 mediante inmunohistoquímica (IHQ) en osteosarcomas en pacientes pediátricos en el diagnóstico, y se estudia una posible correlación de la positividad con el comportamiento clínico, la respuesta y toxicidad de la quimioterapia y la supervivencia de los pacientes.

Pacientes y Método

Se realizó un estudio de cohorte, retrospectivo en pacientes pediátricos con diagnóstico confirmado de osteosarcoma manejados en una institución de referencia nacional en la ciudad de Bogotá en el periodo entre 2012 hasta mayo 2020. Para determinar el tamaño de la población a incluir se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, dado que no se podía estimar la proporción de casos que contaban con el material biológico necesario para la realización de los estudios de IHQ, por lo que fueron incluidos todos los pacientes con diagnóstico confirmado de osteosarcoma que contaban con bloque de parafina y láminas de hematoxilina-eosina del diagnóstico inicial para estudio de IHQ. Se excluyeron los casos en los cuales existieron limitaciones con los registros clínicos por no tener seguimiento o abandono de tratamiento en la institución.

Se analizaron variables demográficas, clínicas y de desenlace. Dentro de las variables clínicas se registraron: localización de la lesión, estadio según Enneking, presencia metástasis al diagnóstico y localización de estas, respuesta a quimioterapia medida como: porcentaje (%) de necrosis posterior a la neo-adyuvancia. Además, se registraron los eventos de toxicidad asociada a la quimioterapia en los dos periodos: neo-adyuvancia y adyuvancia y fueron incluidas variables de toxicidad hematológica, cardíaca, renal y la presencia de mucositis. Las variables desenlace fueron: recaída o progresión de la enfermedad, supervivencia global y el desarrollo de segundas neoplasias.

Para la realización del estudio de histopatología, después de la identificación de los casos, se revisó el material biológico del diagnóstico de la enfermedad (bloque de parafina y estudio de IHQ) y se seleccionaron aquellos con mayor representatividad del tumor para el procesamiento con los anticuerpos Snail y Twist-1.

Las muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina fueron cortadas a 4 micras en 6 láminas cargadas para cada caso y luego desparafinadas en xileno y deshidratadas en etanol, seguido por la recuperación antigénica en buffer citrato por 10 minutos e inactivación de la enzima peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% por 20 minutos. Posteriormente, las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios contra Snail y Twist-1 (Novusbio®), durante una hora. Después se lavó cada tejido por 1 minuto con solución salina buffer fosfato. Luego las láminas fueron incubadas con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano a 37°C por 30 minutos y visualizadas por incubación con la solución de 3,3'-diaminobenzidina (Sangon Biotech®, Shanghai, China). Posteriormente, las láminas se colorearon con hematoxilina por 1 minuto y se lavaron por 3 minutos con agua. Finalmente, los cortes se deshidrataron con etanol seguido por xilol y fueron montados con resina y un portaobjetos.

La IHQ fue leída así: no informativa en caso de material escaso, artefacto, necrosis tumoral; negativa: < 5% de las células tumorales; focal: entre 5-50% de las células tumorales; difusa: entre 50-100 % de las células tumorales. En cuanto a la intensidad, se consideró leve si solo se observó a 40X, moderada si era observable en 10x o intensa si observaba en 4X y según la localización en: citoplasmática, nuclear o membranosa. Todos los casos fueron evaluados por dos patólogos con experiencia en patología pediátrica y las diferencias fueron resueltas por consenso.

El procesamiento de la base de las variables se realizó en IBM Statistical Package for the Social Sciences 22 system (IBM Corp., Armonk, NY). El análisis descriptivo se realizó para las variables cuantitativas en sus medidas de tendencia central y para las variables nominales en frecuencias absolutas y relativas.

Se realizó la caracterización descriptiva de la IHQ de la cohorte. Los casos que fueron considerados como positivos (definido como marcación leve basado en la intensidad) de cada factor de transcripción se realizó el análisis de correlación estadística con las características clínicas mediante la prueba de chi cuadrado y mediante el método de Kaplan-Meier con prueba log rank se evaluó la correlación con la supervivencia global. Los resultados fueron interpretados con base en un nivel de significancia estadística de 0,05.

Este trabajo fue aprobado por el comité de ética de la institución según acta CEI 75-17 No. 007.

Resultados

Características generales de la cohorte

En total 53 pacientes cumplieron los criterios de inclusión en el periodo evaluado. De estos, 33 casos (62,2%) eran hombres. La mediana para la edad fue de 13 (RIQ 3-17) años. La localización más frecuente del tumor primario fue el fémur en 29 pacientes (54,7%), seguido por tibia 14 casos (26,4%), húmero 8 pacientes (15,1%) y peroné y alerón iliaco cada uno con 1 paciente (1,9%). En 51 pacientes (96,2%) la clasificación histológica del osteosarcoma fue de tipo convencional, se registró 1 caso con osteosarcoma de célula pequeña (1,9%) y 1 caso (1,9%) de tipo telangiectásico. En 18 pacientes (34%) se encontraron metástasis al diagnóstico.

Las características del tratamiento de la cohorte fueron las siguientes: 27 pacientes (50,9%) recibieron manejo basado en dosis altas de metotrexato, 23 pacientes (43,4%) según el protocolo ACHOP 2017 (protocolo basado en Ifosfamida, Etopósido, Doxorubicina), en tres (5,7%) casos se combinaron ambos esquemas de terapia; En 48 pacientes (90,5%) se logró realizar cirugía de control local de la enfermedad, y en solo 1 paciente (2,8%) fueron informados bordes de resección positivos. En 3 pacientes (5,6%) se realizó metastasectomía como terapia en manejo de primera línea. La media del % de necrosis de toda la cohorte fue de 67,8% (DE 34,4); del total de la cohorte 20 pacientes

(37,7%) tenían necrosis superior al 90% posterior a la quimioterapia neo-adyuvante. No se usó radioterapia en primera línea en ninguno de los casos.

Durante el seguimiento se registraron 10 pacientes (18,9%) con progresión de su enfermedad y 9 casos (16,9%) de recaída de la enfermedad después de terminar tratamiento. En total 15 pacientes (28,3%) fallecieron por diferentes causas: 7 (46,6%) por progresión del osteosarcoma, 4 (26,6%) fallecen en recaída de la enfermedad, 3 (20%) fallecen por segundas neoplasias y 1 (6,6%) caso por complicaciones derivadas de la terapia.

Resultados de inmunohistoquímica

Snail

Se encontró una inmunomarcación más frecuente en la localización citoplasmática con 26 casos (49,1%), de estos 14 casos (53,8%) tuvieron distribución focal y los 12 casos (46,1%) restantes tenían distribución difusa; respecto a la intensidad de marcación, se distribuyó así: 7 casos (26,9%) con marcación intensa, 7 casos (26,9%) moderada y 12 casos (46,1%) con marcación débil. En 26 casos (49,0%) no se documentó positividad de Snail en la muestra en ninguna localización. La tabla 1 presenta las variables clínicas de los casos Snail citoplasmático positivo y su correlación. Se encontró una asociación estadística entre la positividad de Snail citoplasmático positivo e intenso y la presencia de me-

Tabla 1. Correlación de expresión de Snail citoplasmático con características clínicas

Variable	Snail n (%)		Valor p	n de casos según intensidad de marcación			Valor p
	- n = 26	+ n = 26		+ (n = 12)	++ (n = 7)	+++ (n = 7)	
Metástasis al diagnóstico	11 (42,3)	7 (26,9)	0,38	4	1	2	0,53
Tipo de metástasis							
Único sitio	11 (42,3)	4 (15,4)		3	1	-	
Múltiple sitio	-	3 (11,5)	0,04*	1	-	2	0,02*
Localización de las metástasis							
Salterinas	3 (11,5)	3 (11,5)	0,62	3	-	-	0,43
Pulmonares	8 (30,7)	3 (11,5)	0,33	1	1	-	0,64
Óseas distantes del primario	-	4	0,06	2	-	2	0,01*
Recaída de la enfermedad	22 (84,4)	4 (15,4)	0,52	3	1	-	0,24
Progresión de la enfermedad	22 (84,4)	4 (15,4)	0,72	3	-	1	0,65
Necrosis > 90% posterior a quimioterapia	10 (38,5)	10 (38,5)	0,76	3	4	3	0,39
Toxicidad hematológica	4 (15,4)	22 (84,6)	0,50	12	5	5	0,59
Toxicidad hepática	17 (65,4)	9 (34,6)	0,27	5	3	1	0,35
Toxicidad renal	25 (96,2)	1 (3,8)	0,74	-	1	-	0,74
Toxicidad cardíaca	24 (92,3)	2 (7,7)	0,68	1	-	1	0,45
Mucositis	24 (92,3)	2 (7,7)	0,51	1	1	-	0,47
Segundas neoplasias	24 (92,3)	2 (7,7)	0,57	-	1	1	0,31

tástasis múltiples al debut de la enfermedad ($p = 0,02$) y con la localización ósea en la enfermedad metastásica ($p = 0,01$).

Solo en dos 2 casos (3,8%) se registró inmuno-marcación en el núcleo, ambos presentaron distribución difusa en la muestra y la intensidad fue moderada. El primero de estos casos, se trató de una paciente femenina, de 12 años, que debuta con fractura patológica, la localización del tumor fue femoral, sin metástasis en el diagnóstico, recibió neo-adyuvancia, cirugía de salvamento y el grado de necrosis pos-quimioterapia fue del 25%, sin embargo, durante el tratamiento presenta progresión de la enfermedad a nivel pulmonar y fallece debido a esta causa. El segundo caso, otra paciente femenina, de 13 años, con localización primaria del tumor a nivel femoral, sin metástasis en el momento del diagnóstico de la enfermedad, recibió neo-adyuvancia, cirugía de salvamento y el grado de necrosis pos-quimioterapia fue de 89%, la paciente recae en el primer año de seguimiento posterior al finalizar el tratamiento.

Dada la frecuencia alta de positividad en el citoplasma de este marcador, se decidió realizar análisis de la supervivencia global usando el método de Kaplan-Meier de los casos de osteosarcoma con Snail positivo a nivel citoplasmático, no se encontraron diferencias significativas entre quienes tuvieron inmuno-marcación positiva comparado con el grupo con inmunomarcación negativa y la supervivencia global (figura 1).

Twist-1

En 12 casos (22,5%) se documentó inmuno-marcación en el citoplasma, de estos 8 casos (66,6%) la localización del marcador era difusa a lo largo de la muestra y los 4 casos (33,3%) tenían localización focal; respecto a la intensidad de la positividad se comportaron así: 5 casos (41,6%) con marcación débil, 5 casos (41,6%) moderada y 2 casos (16,6%) fuerte. No se documentó asociación estadística entre la positividad citoplasmática de Twist y las variables clínicas estudiadas.

Se encontró Twist nuclear en 45 casos (84,9%), de estos 31 casos (68,8%) tenían localización difusa y 14 casos (31,1%) localización focal; de acuerdo con el grado de intensidad de la marcación se comportaron así: 15 casos (33,3%) con marcación débil, 17 casos (37,7%) moderada y 13 casos (28,8%) con marcación intensa; 10 casos tenían marcación nuclear y citoplasmática al mismo tiempo. En el caso de Twist-1, 6 casos (11,3%) no se documentó ningún tipo de inmuno-marcación. En la tabla 2 se presenta el resumen de las características clínicas y la marcación nuclear de Twist-1.

No se encontró correlación entre la positividad de la inmuno-marcación del núcleo y las variables: presencia o tipo de metástasis, recaída, progresión de la enfermedad, respuesta a la quimioterapia o algún tipo de toxicidad relacionada con la quimioterapia.

Se realizó el análisis de la supervivencia global y libre de evento usando el método de Kaplan-Meier de los casos de osteosarcoma con Twist-1 positivo a nivel

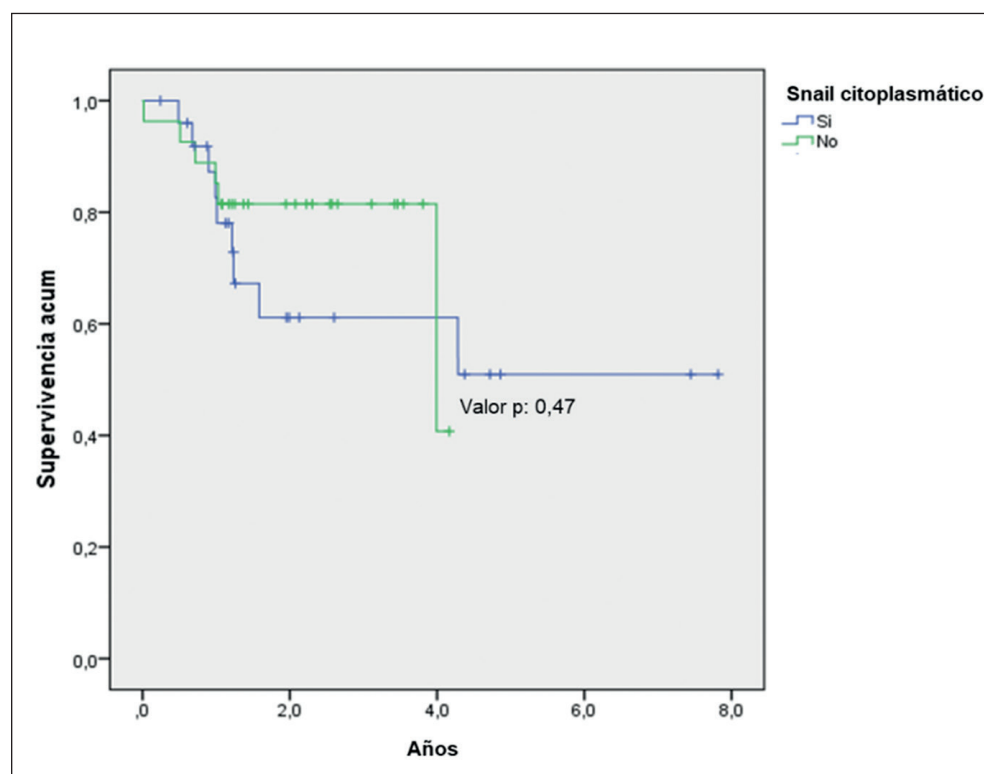


Figura 1. Supervivencia global y Snail citoplasmático

Tabla 2. Correlación de expresión de Twist-1 nuclear con características clínicas

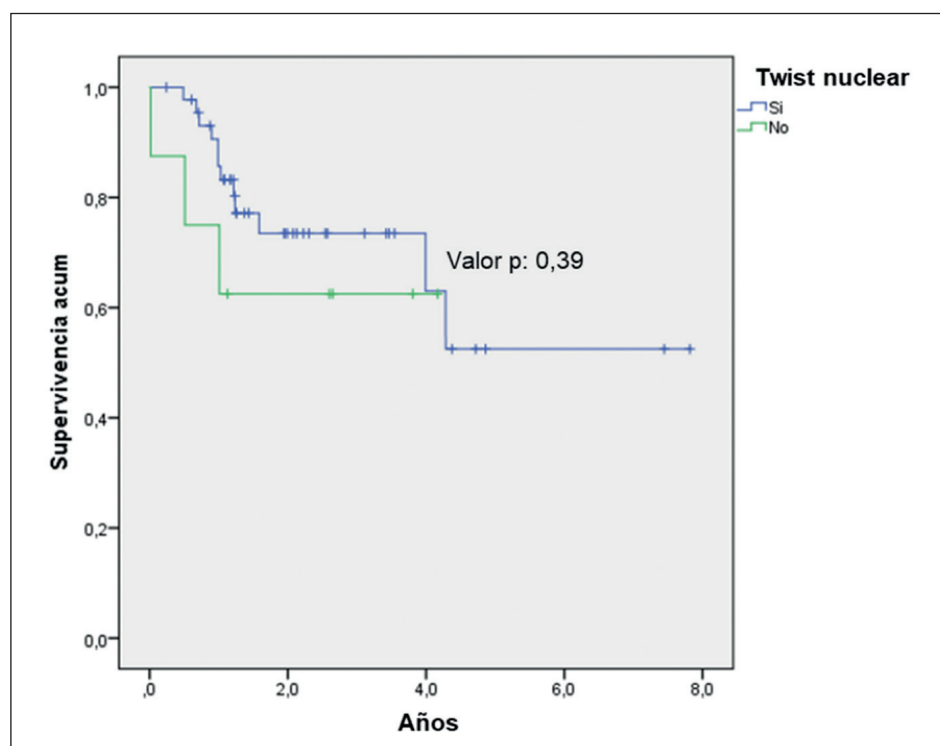
Variable	Twist n (%)		Valor p	n de casos según intensidad de marcación			Valor p
	- (n = 6)	+ (n = 45)		+ (n = 15)	++ (n = 17)	+++ (n = 13)	
Metástasis al diagnóstico	1	17	0,16	7	6	4	0,24
Tipo de metástasis							
Único sitio	1	14		6	5	3	
Múltiple sitio		3	0,83	1	1	1	0,83
Localización de las metástasis							
Saltarinas	1	6	0,66	3	2	1	0,66
Pulmonares	1	10	0,61	5	4	1	0,61
Óseas distantes del primario	-	4	0,85	1	1	2	0,85
Recaída de la enfermedad	1	8	0,58	3	5	-	0,58
Progresión de la enfermedad	1	9	0,52	3	4	2	0,52
Necrosis > 90% posterior a quimioterapia	4	16	0,35	8	3	5	0,35
Toxicidad hematológica	3	37	0,34	12	12	13	0,20
Toxicidad hepática	1	21	0,44	7	8	6	0,22
Toxicidad renal	-	2	0,71	-	-	2	0,71
Toxicidad cardíaca	-	4	0,50	1	2	1	0,50
Mucositis	1	4	0,57	1	3	-	0,57
Segundas neoplasias	1	2	0,40	-	-	-	-

nuclear, no se encontraron diferencias significativas entre quienes tuvieron inmuno-marcación positiva (figura 2).

Los dos casos que mostraron marcación para Snail

a nivel nuclear, se encontró también en Twist-1 positividad nuclear.

La figura 3 presenta los hallazgos en imágenes encontrados en la IHQ de Snail y Twist-1.

**Figura 2.** Supervivencia global y Twist-1 nuclear

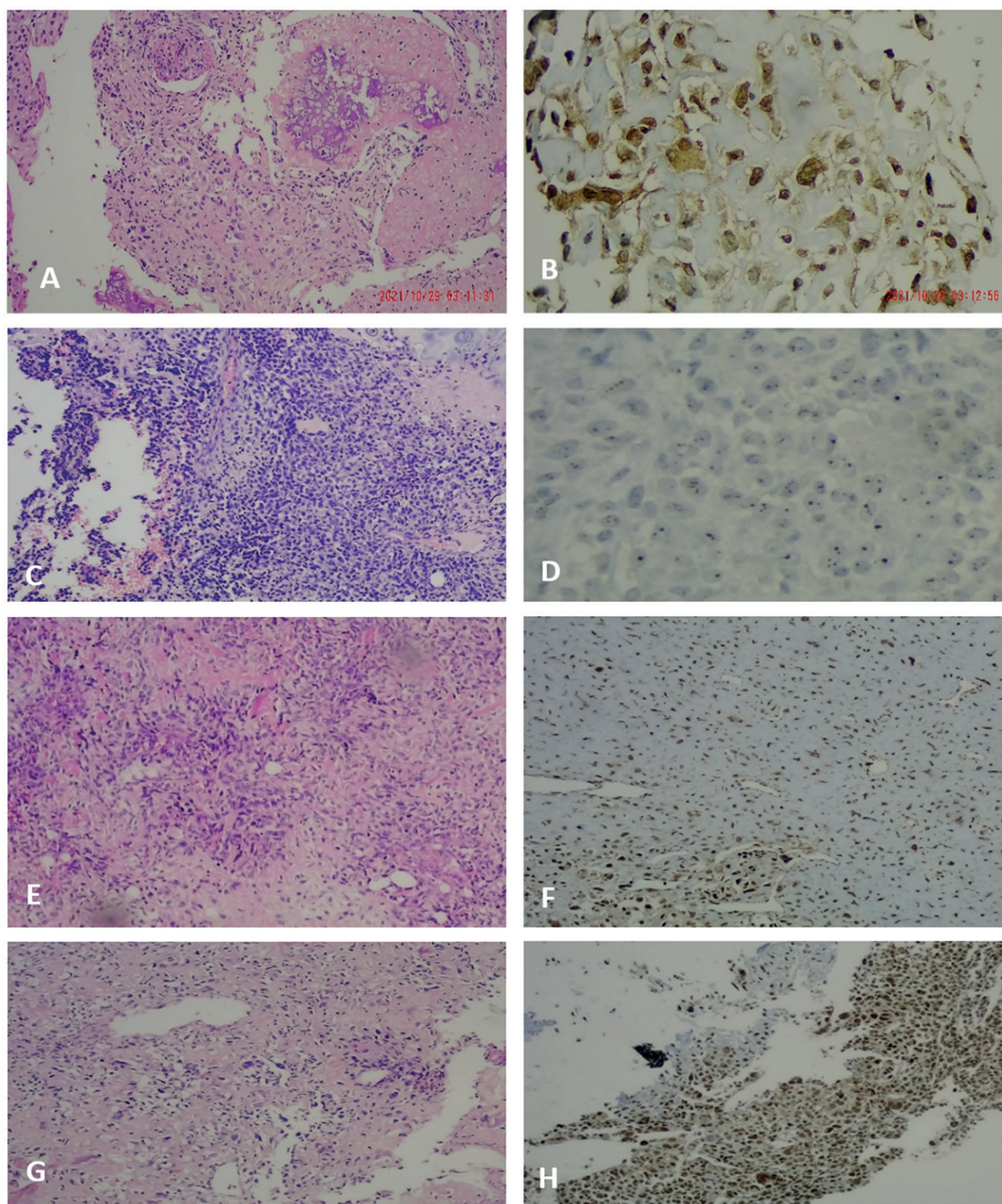


Figura 3. *Snail* y *Twist-1* por inmunohistoquímica. *Snail*. En la imagen se aprecia un osteosarcoma convencional (A) positivo para marcación citoplasmática de *Snail* en células tumorales (B). El osteosarcoma hiper celular con menos formación de osteoide (C) muestra expresión nuclear en dot para *Snail* (D). *Twist-1*. Se observa un osteosarcoma convencional (E), positivo para *Twist-1* nuclear por IHQ (f) se resaltan que los núcleos están embebidos en el estroma osteoide. Otro osteosarcoma semejante (G) en el cual también se observa *Twist-1* fuertemente positivo nuclear (H). En este caso el estroma es menos abundante.

Discusión

La plasticidad celular regulada por factores de transcripción como Twist-1, Snail y otros como Slug, ZEB1 y ZEB2 juega un papel fundamental en la regulación de la transición entre el estado epitelial y mesenquimal¹⁴⁻¹⁶. Este trabajo realizó una evaluación de la expresión mediante IHQ de Snail y Twist-1 en osteosarcomas en edad pediátrica y evaluó la correlación de dicha expresión con las diferentes variables clínicas y desenlaces.

Siendo Snail y Twist-1 factores de transcripción, se esperaba que la marcación se encontrara fundamentalmente en el núcleo para ser considerada como positiva y se correlacionara con actividad de cada una de estas moléculas, sin embargo, las localizaciones variaron para ambos marcadores.

Para el caso de Snail, la localización nuclear fue infrecuente y solo dos pacientes registraron este patrón de inmuno-marcación, sin embargo, es llamativo que comparten características clínicas como la edad, el género y el debut de la enfermedad sin metástasis, ambas pacientes también pese a recibir tratamiento se documentaron recaídas de la enfermedad; si bien corresponde solo con dos casos de la cohorte evaluada y no es posible por el tamaño de la muestra generalizar, si pudiera sugerir que la expresión nuclear de Snail evaluado mediante IHQ es un factor que puede predecir la presencia de recaídas.

Adicionalmente, se encontró que hasta el 49% de los casos tiene marcación positiva de Snail con localización citoplasmática, se decidió explorar la correlación con las variables clínicas y de desenlace dado la positividad tan importante en la cohorte y de forma llamativa se encontró correlación estadística con la presencia de múltiples sitios metastásicos al diagnóstico y con la presencia de metástasis óseas distantes del sitio del tumor primario, esta asociación se acentuó con la positividad intensa del Snail; otros autores han documentado expresión citoplasmática por IHQ de Snail en tumores también de origen mesenquimal, y se presume que esta ubicación podría estar relacionada con un tipo de nivel regulador pos-transcripcional del crecimiento y diferenciación celular¹⁷.

Snail ya ha sido en otros trabajos asociado como factor que puede lograr predecir la progresión de la enfermedad cuando se sobre-expresa en osteosarcomas, esto por su capacidad de regular moléculas como la E-cadherina¹⁸, sin embargo la marcación citoplasmática previamente no ha sido correlacionada con desenlaces clínicos, por lo que se plantea como un hallazgo que amerita atención porque pudiera tratarse de una expresión subrogada de TEM/TEM, y que eventualmente pueda funcionar como un marcador temprano de mal

pronóstico, sin embargo investigaciones adicionales se requieren al respecto.

Twist-1, es un factor de transcripción fundamental en la regulación de TEM/TME y la evidencia actual muestra que su expresión en células tumorales favorece la diseminación del tumor primario y su posterior establecimiento en órganos distantes^{10,13}. De forma llamativa, en este trabajo se encontró una expresión frecuente de Twist-1 a nivel nuclear, alcanzando casi el 85% de los casos evaluados, sin embargo contrario a lo documentado por Ying y cols.¹⁹ no conseguimos encontrar asociación de esta expresión con factores como la presencia de metástasis o la supervivencia global.

Snail y Twist, como factores de transcripción requieren ingresar al núcleo para cumplir su función; sin embargo, es posible que los sistemas de transporte hacia el núcleo, importinas y exportinas, que deben estar intactos para su movilidad, presenten algún tipo de alteración en este tipo de tumores. Por otra parte, Snail es una proteína inestable que se degrada rápidamente. Es posible, igualmente, que en estos casos alguna modificación postranscripcional (fosforilación, ubiquitinación oxidación de lisina) aumente la estabilidad de la proteína en el citoplasma. Ambos mecanismos biológicos deberán ser explorados en posteriores estudios^{20,21}.

Pese a que los factores de transcripción relacionados con la TEM/TME también se han asociado con quimio resistencia y respuesta a la quimioterapia^{11,12,22,23}, en esta investigación no se encontró asociación con (% necrosis posterior a neoadyuvancia), ni con la toxicidad relacionada con la terapia.

Dentro de las limitaciones de este trabajo, se encuentra que se trata de un estudio de un único centro con un número limitado de muestras para estudio, fueron explorados solo dos marcadores relacionados con los eventos de TME/TEM y la herramienta usada fue la IHQ. Podrían explorarse otros aspectos estructurales de ambas proteínas para confirmar o descartar nuestros hallazgos como lo muestra la literatura; Aunque nuestros resultados con el análisis de Twist no fueron concluyentes, ha sido implicado como marcador pronóstico en osteosarcoma en otras investigaciones²⁴⁻²⁶.

En conclusión, Snail y Twist-1 pueden expresarse en diferentes localizaciones sub-celulares y de forma frecuente en una muestra de pacientes pediátricos con osteosarcoma. El hallazgo más llamativo de este estudio fue la correlación entre la presencia de Snail citoplasmático positivo y la presencia de enfermedad metastásica de múltiple localización. Es posible que Snail participe en eventos facilitadores de migración y metástasis en osteosarcoma pediátricos y se plantea un rol esencial en los fenómenos que se relacionan con la agresividad clínica de la enfermedad. Sugerimos que la

positividad de estas proteínas a través de la IHQ está relacionada con su activación y posible inducción de los eventos de TEM/TME en estas células tumorales, sin embargo, no conseguimos demostrar un rol claro en correlación con los diferentes eventos clínicos o desenlaces de los pacientes en esta cohorte. Se requieren estudios adicionales que confirmen o descarten nuestros hallazgos.

Responsabilidades Éticas

Protección de personas y animales: Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos: Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado: Los autores han obtenido el consentimiento in-

formado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

Para la Fundación HOMI, Hospital Pediátrico La Misericordia y el grupo de investigación en Oncohematología pediátrica por el apoyo durante el desarrollo de la presente investigación.

Financiación

Este trabajo fue financiado por el Centro de Investigaciones – HOMI Fundación Hospital Pediátrico La Misericordia- Grupo de investigación de Oncohematología pediátrica (CC 400032).

Referencias

- Sannino G, Marchetto A, Kirchner T, Grünwald TGP. Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transition in mesenchymal tumors: A paradox in sarcomas? *Cancer Res.* 2017;77(17):4556-61.
- Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell.* 2017;168(4):670-91.
- Stamatopoulos A, Stamatopoulos T, Gamie Z, et al. Mesenchymal stromal cells for bone sarcoma treatment: Roadmap to clinical practice. *J Bone Oncol.* 2019;16(March):100231.
- Ware KE, Gilja S, Xu S, et al. Induction of mesenchymal-epithelial transitions in sarcoma cells. *J Vis Exp.* 2017;2017(122):1-11.
- Sadykova LR, Ntekim AI, Muyaungwa-Semenova M, et al. Epidemiology and Risk Factors of Osteosarcoma. *Cancer Invest.* 2020;38(5):259-69.
- Somarelli JA, Shetler S, Jolly MK, et al. Mesenchymal-Epithelial Transition in Sarcomas Is Controlled by the Combinatorial Expression of MicroRNA 200s and GRHL2. *Mol Cell Biol.* 2016;36(19):2503-13.
- Domann FE, Fitzgerald MP, Gourronc F, et al. Human chondrosarcoma cells acquire an epithelial-like gene expression pattern via an epigenetic switch: Evidence for mesenchymal-epithelial transition during sarcomagenesis. *Sarcoma.* 2011;2011.
- Alba-Castellón L, Batlle R, Francí C, et al. Snail1 Expression Is Required for Sarcomagenesis. *Neoplasia (United States).* 2014;16(5):413-21.
- Baulida J, Díaz VM, Herreros AG De. Snail1: A transcriptional factor controlled at multiple levels. *J Clin Med.* 2019;8(6).
- Zhu QQ, Ma C, Wang Q, Song Y, Lv T. The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. *Tumor Biol.* 2016;37(1):185-97.
- Kaufhold S, Bonavida B. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: A target for therapeutic intervention. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33(1):1-19.
- Seo J, Ha J, Kang E, Cho S. The role of epithelial-mesenchymal transition-regulating transcription factors in anti-cancer drug resistance. *Arch Pharm Res.* 2021;44(3):281-92.
- Kang E, Seo J, Yoon H, Cho S. The post-translational regulation of epithelial-mesenchymal transition-inducing transcription factors in cancer metastasis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7).
- Yang J, Du X, Wang G, et al. Mesenchymal to epithelial transition in sarcomas. *Eur J Cancer.* 2014;50(3):593-601.
- Gill J, Gorlick R. Advancing therapy for osteosarcoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18(10):609-24.
- Yu X, Yustein JT, Xu J. Research models and mesenchymal/epithelial plasticity of osteosarcoma. *Cell Biosci.* 2021;11(1):1-12.
- Adisa A, Udeabor S, Orlowska A, Sader R, Ghanaati S. Immunohistochemical expression of Twist, E-cadherin and N-cadherin in ameloblastoma. *Afr J Biomed Res.* 2018;21:327-31.
- Yang H, Zhang Y, Zhou Z, Jiang X, Shen A. Transcription factor Snail-1 induces osteosarcoma invasion and metastasis by inhibiting E-cadherin expression. *Oncol Lett.* 2014;8(1):193-7.
- Yin K, Liao Q, He H, Zhong D. Prognostic value of Twist and E-cadherin in patients with osteosarcoma. *Med Oncol.* 2012;29(5):3449-55.
- Tang Y, Weiss SJ. Snail/Slug-YAP/TAZ complexes cooperatively regulate mesenchymal stem cell function and bone formation. *Cell Cycle.* 2017;16(5):399-405.
- Wang Z, Chen X, Zhao Y, Jin Y, Zheng J. G-protein-coupled estrogen receptor suppresses the migration of osteosarcoma cells via post-translational regulation of Snail. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019;145(1):87-96.
- Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou

- B. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. 2014;13(9):963-72.
23. Ding L, Wang C, Cui Y, et al. S-phase kinase-Associated protein 2 is involved in epithelial-mesenchymal transition in methotrexate-resistant osteosarcoma cells. *Int J Oncol*. 2018;52(6):1841-52.
 24. Entz-Werlé N, Stoetzel C, Berard-Marec P, et al. Frequent genomic abnormalities at TWIST in human pediatric osteosarcomas. *Int J Cancer*. 2005;117(3):349-55.
 25. Entz-Werlé N, Choquet P, Neuville A, et al. Targeted Apc;twist double-mutant mice: A new model of spontaneous osteosarcoma that mimics the human disease. *Transl Oncol*. 2010;3(6):344-53.
 26. Entz-Werle N, Lavaux T, Metzger N, et al. Involvement of MET/TWIST/APC combination or the potential role of ossification factors in pediatric high-grade osteosarcoma oncogenesis. *Neoplasia*. 2007;9(8):678-88.