

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA.

**FACTORES PRONÓSTICOS EN EL RABDOMIOSARCOMA  
INFANTIL. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PLOIDÍA Y DEL  
ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR CON OTROS  
PARÁMETROS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS.**



X-53-3733 66-1

**TESIS DOCTORAL**

**M<sup>a</sup> PILAR SAN MIGUEL FRAILE.**

**Julio, 1998.**



BIBLIOTECA



**HOSPITAL RAMON Y CAJAL**

AREA SANITARIA 4  
28034 MADRID

D<sup>a</sup> ROSARIO CARRILLO GIJON, Médico Adjunto del Servicio de Anatomía  
Patológica del Hospital "Ramón y Cajal" de Madrid

**CERTIFICA:**

Que D<sup>a</sup> Pilar San Miguel Fraile ha realizado bajo mi dirección el trabajo  
titulado: "Factores pronósticos en el rhabdomyosarcoma infantil. Estudio comparativo  
de la ploidía y del índice de proliferación celular con otros parámetros clínicos e  
histológicos", que presenta los requisitos necesarios para su defensa.

Madrid, 19 de Junio de 1998-06-19

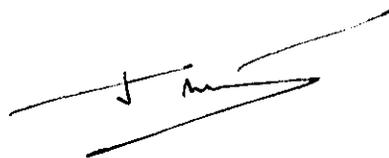
Fdo.- Dra. Carrillo Gijón

D. JOSE LUIS RODRIGUEZ PERALTO, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICA:

Que Doña Pilar San Miguel Fraile ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado "FACTORES PRONOSTICOS EN EL RABDOMIOSARCOMA INFANTIL. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PLOIDIA Y DEL INDICE DE PROLIFERACION CELULAR CON OTROS PARAMETROS CLINICOS E HISTOLOGICOS", que a mi juicio reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

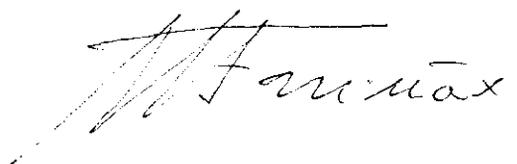
Y para que así conste firmo el presente en Madrid a 24 de Junio de 1998



Prof. J.L. Rodríguez Peralto

Dña. Juliana Fariña González, Catedrático de Anatomía Patológica y Tutor del trabajo denominado "FACTORES PRONOSTICOS EN EL RABDOMIOSARCOMA INFANTIL. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PLOIDIA Y DEL INDICE DE PROLIFERACION CELULAR CON OTROS PARAMETROS CLINICOS E HISTOLOGICOS", realizado por Dña. María Pilar San Miguel Fraile, y dirigido por los Dres. Dña. Rosario Carrillo Gijón y D. Jose Luis Rodriguez Peralto, cumple las condiciones científicas por lo que considera que puede ser defendido para optar al grado de Doctor.

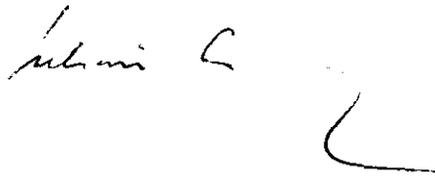
Madrid, 25 - Mayo - 1998



FDO.: JULIANA FARIÑA GONZALEZ

D. Julián Sanz Esponera, Catedrático Director del Departamento de Anatomía Patológica informa que, el trabajo denominado "FACTORES PRONOSTICOS EN EL RABDOMIOSARCOMA INFANTIL. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PLOIDIA Y DEL INDICE DE PROLIFERACION CELULAR CON OTROS PARAMETROS CLINICOS E HISTOLOGICOS", realizado por Dña. María Pilar San Miguel Fraile, y dirigido por los Dres. Dña. Rosario Carrillo Gijón y D. Jose Luis Rodriguez Peralto, cumple las condiciones científicas por lo que considera que puede ser defendido para optar al grado de Doctor.

Madrid, 25 - Mayo - 1998



FDO.: JULIAN SANZ ESPONERA

***A mis padres.***

## **AGRADECIMIENTOS**

La elaboración de esta tesis no hubiera sido posible sin la colaboración de muchas personas a las que me gustaría agradecerle la ayuda que me han prestado.

En primer lugar quiero agradecer a los directores de esta tesis, Rosario Carrillo Gijón y José Luis Rodríguez Peralto, el que lo hayan sido y que hayan volcado toda su capacidad de trabajo para que este proyecto pudiera acabarse. Gracias por todo lo que me habéis enseñado y el apoyo que me habéis prestado.

Al Dr. Victor Abaira, de la Unidad de Bioestadística por su inestimable colaboración en la ejecución e interpretación del estudio estadístico, gracias a su paciencia y profundos conocimientos en Bioestadística ha sido posible extraer la mayoría de las conclusiones de este trabajo.

Al Dr. Fernando González Palacios, por haber sido un verdadero maestro y amigo durante mis años de residencia en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal, estimulando siempre con su ejemplo mi vocación.

A las Dras. Mercedes García Villanueva y Carmen Bellas, por su ayuda y por los valiosos consejos que me han proporcionado a lo largo de toda la residencia.

A mis compañeros de residencia: Antonio, Magdalena, José Luis, Charo y Mónica, por su constante apoyo, ayuda y amistad. Ellos serán los artífices de que esta etapa de mi vida, en la que ha habido momentos duros y largas horas de trabajo la recuerde con ilusión y cariño.

A Dña Valvanera Martínez Arrieta ATS del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal que realizó la extracción y preparación de los núcleos para la cuantificación del ADN. Su gran experiencia, dedicación y pericia técnica aportaron la base técnica fiable indispensable en este tipo de estudios.

Al personal de secretaría y técnico del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal y especialmente a Dña Carmen López, Rosa Ocaña y Carmen Massa, que con su generosa contribución técnica en el estudio inmunohistoquímico e histológico han hecho viable este proyecto.

Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. El sitio donde me he formado, donde he realizado gran parte de este trabajo y que es mi casa desde hace casi cinco años. Quisiera agradecer a todo su personal, el apoyo que de ellos he recibido.

Al Servicio de Pediatría del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. En especial, a la Sección de Oncología Pediátrica (Dr. Muñoz Villa y Dra. Maldonado), por su estrecha colaboración en la recogida de datos clínicos.

Al Hospital 12 de Octubre y en especial a su servicio de Anatomía Patológica del que he recibido todo tipo de facilidades para obtener datos y contar con su material de archivo.

Finalmente, a toda mi familia y amigos, pero especialmente a Curro por su inagotable paciencia, y a mis padres y a mi hermana por su incondicional apoyo.

Muchas gracias a todos.

Pilar

## **I.- INTRODUCCIÓN**

## **I.- INTRODUCCIÓN.**

El **rabdomiosarcoma** (RMS) es el sarcoma de partes blandas más frecuente en niños y adolescentes (Enzinger, 1995), supone el 4-8% de los tumores malignos en la infancia (Sutow, 1970; Young, 1975; Kramer, 1983; Maurer, 1991; Raney, 1993; Harms, 1995) y tiene un comportamiento clínico variable y una representación histológica diversa.

Aunque la supervivencia en el RMS infantil ha mejorado notablemente con el empleo de tratamientos combinados, todavía existe un porcentaje alto de recidivas y evoluciones fatales, sobre todo entre los casos irreseccables (Maurer, 1988; Maurer, 1993). Las características clínicas e histológicas no son suficientes para prever el pronóstico en todos los casos (Neifeld, 1979; Gehan, 1981; Newton, 1988; Lawrence, 1987; Rodary, 1988; Maurer, 1993; Pappo (B), 1995); por eso, en los últimos años se están buscando nuevos datos pronósticos que permitan predecir la respuesta a la quimioterapia y, por lo tanto, propiciar tratamientos más selectivos, que mejoren la supervivencia de estos pacientes.

Hasta hace relativamente poco tiempo, los únicos factores con influencia pronóstica reconocida en este tumor eran: **el tipo histológico, el estadio clínico, el tamaño, la localización y la edad** (Jaffe, 1973; Ransom, 1977; Maurer, 1981; Gehan, 1981; Raney, 1981; Wharam, 1986). Sin embargo, en los últimos años se ha venido investigando también la influencia de la **ploidía y la actividad proliferativa**, cuya importancia pronóstica ya ha sido demostrada en otros tumores malignos infantiles, como el neuroblastoma (Look, 1984) y la leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Look, 1985).

Trabajos previos han demostrado una estrecha relación entre tipo histológico y ploidía (Shapiro, 1991; Kilpatrick, 1994; De Zen, 1997), observando que los RMSs de tipo

embrionario mayoritariamente son hiperdiploides y los alveolares tetraploides. Además, algunos autores han observado que la ploidía es la variable que mejor predice la respuesta a la quimioterapia, que es superior en los casos hiperdiploides que en los tetraploides y diploides (Shapiro, 1991; Pappo, 1993; Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997). La posibilidad de predecir la respuesta a la quimioterapia ofrece una enorme esperanza de mejorar el tratamiento del RMS. Si estos resultados se confirmaran, podrían emplearse tratamientos más agresivos en los casos diploides, mientras que los aneuploides podrán beneficiarse de una quimioterapia más conservadora. La actividad proliferativa en los RMSs (Shapiro, 1991; Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997; Noguchi 1997) se ha estudiado relativamente poco y con resultados contradictorios.

Desde la descripción del RMS por Arthur Purdy Stout (Stout, 1946) hasta nuestros días se ha avanzado mucho en el conocimiento de las características histológicas, biológicas y clínicas del RMS, así como en su tratamiento. En cuanto a la histogénesis, tradicionalmente se consideró que el RMS tenía un origen en el músculo esquelético (Stout, 1946), mientras que actualmente se piensa que es una neoplasia mesenquimal primitiva con diferenciación muscular (Coffin (A), 1997). En cualquier caso, el RMS es una neoplasia con una marcada heterogeneidad histológica, lo que unido a la diversidad de las series, dificulta la creación de una clasificación histológica universal, que permita relacionar adecuadamente los criterios morfológicos con la agresividad clínica y evolución del enfermo.

Con el presente estudio se ha intentado contribuir al conocimiento del RMS, analizando algunos aspectos todavía confusos, como la clasificación histológica y el comportamiento biológico. El objetivo principal ha consistido en evaluar el valor pronóstico del contenido

de ácido desoxirribonucleico (ADN) y del índice de proliferación celular (IPC) y, mediante un estudio estadístico multivariable, compararlo con el de los factores pronósticos clásicos.

## **I.1.- REVISIÓN HISTÓRICA Y CLASIFICACIONES HISTOLÓGICAS.**

En 1946 Arthur Purdy Stout (Stout, 1946) describió, bajo el término de RMS, una nueva variante de sarcoma con origen en el músculo esquelético estriado.

Durante los años 50 fueron apareciendo sucesivas publicaciones sobre estos tumores, la mayoría con un pequeño número de casos, que describieron la variante botriode (Mostofi, 1952; Ober, 1954; Horn, 1955; Farinacci 1956), embrionaria (Stobbe, 1950) y alveolar (Riopelle, 1956); pero fueron Horn y Enterline (Horn, 1958) los que definieron con precisión las características del RMS y lo clasificaron según criterios clínicos e histológicos.

### **I.1.1.- CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA CLÁSICA.**

**Horn y Enterline** (Horn, 1958) reconocieron cuatro tipos histológicos: **pleomórfico, alveolar, embrionario y botriode** (Tabla I-I).

**1.-RMS pleomórfico:** Stout en 1946 (Stout, 1946) describió esta variante, anteriormente denominada RMS clásico, como un tumor de células fusiformes, muy pleomórficas, frecuentemente multinucleadas, con citoplasma eosinófilo y estriaciones transversales ocasionales, que se disponían formando un sincitio. Esta neoplasia muestra marcada predilección por las extremidades inferiores de personas adultas y se comporta como una masa tumoral de crecimiento rápido, con elevado índice de recidivas y frecuentes

metástasis a pulmón y ganglios linfáticos.

2.-**RMS alveolar:** Tumor que fue descrito por Riopelle y Thériault (Riopelle, 1956) en 1956 y denominado alveolar por su característico aspecto histológico. Aunque presenta cierta variabilidad morfológica siempre se suele observar una interrelación entre el estroma y las células neoplásicas. Estas células son redondeadas o poligonales de diferentes tamaños, algunas de ellas gigantes y con estriaciones longitudinales o transversales, y se disponen alrededor de ejes de tejido conectivo con vascularización variable, remedando a tumores de estirpe epitelial, especialmente adenocarcinomas. La localización es diversa y suele presentarse en adolescentes o adultos jóvenes. La agresividad clínica es semejante a la del RMS pleomórfico.

3.- **RMS embrionario:** En 1950 Stobbe y Dargeon (Stobbe, 1950) describieron las características morfológicas de la variante embrionaria. En su forma más típica son neoplasias sólidas constituidas por células fusiformes, con núcleo único central y abundante citoplasma eosinófilo. Otras veces predomina una población celular predominantemente pequeña e indiferenciada, intercalada con otras células de mayor tamaño, que tienen un núcleo pequeño, oval, con abundante citoplasma eosinófilo y escasas estriaciones transversales. El estroma en general es escaso, con cierta tendencia a la degeneración mixoide. Son tumores de niños y adolescentes que afectan a la cabeza y el cuello, especialmente la órbita, y al tracto urogenital.

4.- **RMS botrioide:** En 1955 Horn (Horn, 1955) describió las características morfológicas del RMS botrioide, considerado una variante del RMS embrionario. Macroscópicamente son tumores vegetantes, multilobulados, con aspecto de racimo de uvas. El aspecto histológico de este tumor es característico, y está constituido por masas polipoides,

edematosas y muy poco celulares en el centro que están revestidas por la membrana mucosa del lugar de origen. Una característica histológica esencial para su diagnóstico, no siempre bien desarrollada, es la presencia de una banda de células tumorales, situada inmediatamente por debajo de la mucosa llamada “capa de cambio” de Nicholson (Nicholson, 1950). Estas células son fusiformes y monomorfas, con moderada cantidad de citoplasma y se disponen paralelas a la superficie del pólipo. Las mitosis pueden ser abundantes. La edad media de presentación es inferior a la de otros RMSs, y se localiza exclusivamente en la submucosa de cavidades.

Esta clasificación (Horn, 1958), que supuso el primer intento de gradación histológica en el RMS, tuvo una gran aceptación, manteniéndose durante largo tiempo en vigencia. Fue adoptada por la **Organización Mundial de la Salud (OMS)** (Enzinger, 1969; Agamandis, 1986) y el **Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS)** (Newton, 1988; Crist, 1990; Asmar, 1994; Crist, 1995; Newton, 1995). Pero a pesar de su gran difusión, su aplicación en la rutina diagnóstica carecía de una implicación pronóstica y una gradación histológica bien definida.

CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA CONVENCIONAL	
➤	RMS embrionario.
➤	RMS botrioide.
➤	RMS alveolar.
➤	RMS pleomórfico.

**Tabla I-I.- Clasificación histológica clásica.**

**I.1.2.- CLASIFICACIÓN CITO HISTOLÓGICA.**

Así se establecieron las bases para posteriores sistemas de gradación, como la **clasificación citohistológica** creada por **Palmer** (Palmer, 1981; Palmer, 1982), en la que se empleó la atipia nuclear como principal criterio y se identificaron dos subtipos de mal pronóstico: el monomorfo y el anaplásico (Tabla I-II). Esta clasificación citohistológica tuvo escasa aceptación, probablemente debido a la diferente valoración histológica, con respecto a los otros sistemas (OMS, IRS I) que definían constantemente el tipo alveolar y embrionario.

El problema para establecer una correcta clasificación histológica, que permitiera dividir a los pacientes en diferentes grupos de riesgo, persistió durante mucho tiempo, en gran parte debido a la relativa rareza de estos tumores, a su falta de uniformidad histológica (González -Crussi, 1979) y finalmente a la gran diversidad de factores con influencia pronóstica: localización, edad, terapéutica y estadio clínico.

<b>CLASIFICACIÓN CITO HISTOLÓGICA</b>	
➤	RMS anaplásico
➤	RMS monomorfo
➤	Otros: * RMS indiferenciado * RMS inclasificable * RMS mixto

**Tabla I-II.- Clasificación citohistológica, propuesta por Palmer.**

### **I.1.3.- GRUPOS COOPERATIVOS DE ESTUDIO DEL RABDOMIOSARCOMA.**

Todo ello propició la creación de grandes grupos cooperativos de estudio como el **inter-Americano** (IRS I-II-III) (Maurer, 1977; Maurer, 1981; Gehan 1981; Lawrence, 1987; Newton, 1988; Maurer, 1988; Maurer, 1989; Crist, 1990; Parham, 1991; Kodet, 1993; Maurer, 1993; Newton, 1995; Crist, 1995; Kodet, 1997) y el **inter-Europeo** (SIOP) (Flamant, 1984; Flamant, 1985; Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Rodary, 1991; Reboult-Marty, 1991; Flamant, 1991) que intentaron:

- Reclutar casos de forma conjunta para introducir la *aleatorización* en los estudios.
- Aumentar la supervivencia de los pacientes.
- Mejorar su calidad de vida reduciendo las secuelas del tratamiento.
- Investigar nuevos factores pronósticos.
- Establecer una clasificación histológica universal con implicación pronóstica.

#### **I.1.3.1.- INTERGROUP RHABDOMYOSARCOMA STUDY I Y II.**

##### **A) OBJETIVOS Y CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA.**

El **Intergroup Rhabdomyosarcoma Study** es una organización anglo-americana constituida por tres grandes asociaciones (Children's Cancer Study Group, Pediatric Oncology Group y United Kingdom Children's Cancer Study Group) que pretende integrar los RMSs de diferentes centros de referencia con el objetivo de diseñar estudios experimentales multidisciplinarios. El IRS en sus trabajos I (Gerson, 1978; Maurer, 1988) y II (Newton, 1988; Crist, 1990; Maurer, 1993), que empezaron en 1972 y 1978 respectivamente, aceptaron la clasificación convencional (Horn, 1958) con la adición de subcategorías para las formas de **sarcoma indiferenciado** (inicialmente llamado sarcoma

de células pequeñas tipo indeterminado), **sarcoma inclasificable** (cuando la escasa cantidad o calidad del tejido impide una clasificación más precisa) y **sarcoma de Ewing extraóseo** (EOE), que ya había sido descrito (Angervall, 1975) (Tabla I-III).

CATEGORIAS ADICIONALES DEL IRS-I Y EL IRS-II.
➤ EOE
➤ Sarcoma de célula pequeña, tipo indeterminado.
➤ Sarcoma no clasificable.

**Tabla I-III.- Categorías adicionales a la clasificación histológica convencional.**

## **B) APORTACIONES DEL IRS.**

Las aportaciones de estos trabajos I y II del IRS se pueden resumir de la manera siguiente:

- Son los primeros estudios (Newton, 1988) importantes dirigidos a comprobar la relación entre el patrón histológico y el curso clínico. Revisan 1782 casos y los clasifican según la clasificación convencional modificada en: alveolar, embrionario, botrioide, pleomórfico, indiferenciado y EOE. Encuentran una clara relación con el pronóstico, siendo la supervivencia a los tres años del 53% para los tipos histológicos alveolar e indiferenciado, 68% para el embrionario, 75% en el EOE y RMS pleomórfico y del 88% para el RMS botrioide.
- Observan que la distribución de las diferentes variantes histológicas difiere sustancialmente de acuerdo a la localización primaria del tumor. La mayoría de los tumores del aparato genitourinario son embrionarios (71%) o botrioides (20%), mientras que los tumores de extremidades son alveolares (50%) o embrionarios (24%).

- Es el primer gran comité que busca una clasificación pronóstica internacional, sugiriendo la importancia que podría tener la inmunohistoquímica (IHQ) para su desarrollo.
- Por último, la filosofía del IRS fue establecer protocolos terapéuticos multidisciplinarios empleando una quimioterapia inicial más agresiva, con el objetivo de aumentar la supervivencia global de estos pacientes y disminuir las secuelas físicas y funcionales.

### **I.1.3.2.- SOCIEDAD INTERNACIONAL DE ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA.**

#### **A) OBJETIVOS Y CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA.**

La **Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica (SIOP)** (Flamant, 1984; Flamant, 1985; Rodary, 1988; Calliaud, 1989; Rodary, 1991; Reboult-Marty, 1991; Flamant, 1991) abordó un estudio multidisciplinario realizado por colaboradores europeos, entre 1975 y 1983, que pretendía comparar el tratamiento con quimioterapia antes y después del tratamiento local definitivo. Su otro objetivo era mejorar la clasificación histológica convencional; sus criterios fueron diferentes a los empleados en otras clasificaciones y se basaron fundamentalmente en el grado de diferenciación celular, como ya se había descrito anteriormente en la literatura (Schmidt, 1986) (Tabla I-IV).

CLASIFICACIÓN DE LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA	
➤	<b>Sarcoma embrionario.</b>
➤	<b>RMS embrionario.</b>
◊	<i>Laxo.</i>
	* <i>Botrioide</i>
	* <i>No botrioide.</i>
◊	<i>Denso.</i>
	* <i>Pobremente diferenciado.</i>
	* <i>Bien diferenciado.</i>
◊	<i>Alveolar.</i>
◊	<i>No especificado.</i>
➤	<b>RMS pleomórfico del adulto.</b>
➤	<b>Otros sarcomas de partes blandas especificado.</b>
➤	<b>Sarcomas no especificados.</b>

Tabla I-IV.- Clasificación histológica de los RMSs según la SIOP.

Este ensayo clínico analizó 513 RMSs del Registro Europeo de Tumores Pediátricos y aunque ninguna de las dos opciones terapéutica mostró mejores resultados, los pacientes que recibieron quimioterapia inicial seguida de tratamiento local dirigido a la masa residual consiguieron similar supervivencia pero con menos secuelas importantes (Flamant, 1984). Además, observaron un mejor pronóstico en el RMS botrioide laxo y RMS bien diferenciado denso que en el RMS no botrioide laxo, el RMS denso pobremente diferenciado y el RMS alveolar.

## **B) ENSAYOS TERAPEÚTICOS.**

El primer ensayo de la SIOP se realizó entre 1975 y 1984 y los resultados aparecieron en los estudios **MMT 84** (1975-1984) (Flamant, 1984), **MMT 89** (1989-1994) (Carli, 1993) y

**MMT 95** (iniciado el 1 de Julio de 1995) en los cuales se investigó, al igual que en el IRS, el uso de protocolos de quimioterapia inicial más agresiva y la restricción del tratamiento local (cirugía y radioterapia) agresivo.

Las aportaciones de estos dos estudios cooperativos han contribuido extraordinariamente a desarrollar nuevas clasificaciones histológicas y distintas modalidades terapéuticas multidisciplinarias en los pacientes con este tumor. Los objetivos con que se iniciaron estos trabajos persisten en la actualidad en el IRS IV y el MMT 95. Estos trabajos pretenden colaborar en el diseño de un nuevo protocolo de tratamiento, especialmente para los RMSs en estadio IV.

### **C) ESTRATEGIA TERAPEÚTICAS DEL MMT 89.**

La estrategia terapéutica empleada actualmente por el MMT 95, en función de los resultados obtenidos en el MMT 89 es la siguiente:

#### **1) ESTRATEGIA TERAPEÚTICA PARA LOS RMSs DE BAJO RIESGO.**

❖ Criterios de inclusión.

Se incluyen en este grupo todos los tumores localizados y resecaos totalmente de cualquier localización (T1 N0 M0 o estadio I), excluyendo los RMSs alveolares.

❖ Tratamiento.

El tratamiento es en todos los casos resección quirúrgica completa y quimioterapia limitada con Vincristina y Actinomicina D.

#### **2) ESTRATEGIA TERAPEÚTICA PARA LOS RMSs DE RIESGO ESTÁNDAR.**

❖ Criterios de inclusión. Se incluyen en este grupo:

- Tumores localizados incompletamente resecaos.

- Tumores que se extienden más allá del órgano de origen, completa o incompletamente resecados.
- En todos los casos deben estar localizados en regiones favorables (Tabla I-V) y no ser de tipo alveolar.

<b>LOCALIZACIÓN</b>	
<b>FAVORABLE</b>	<b>DESFAVORABLE</b>
Orbita	Extremidades
Paratesticular	Retroperitoneo
A. Gastrointestinal	Intratorácico
Próstata	Cabeza y cuello
A. Genitourinario	Partes blandas
Otros	Periné
	Oído
	Senos

**Tabla I-V. Clasificación pronóstica de los RMSs según la localización. Criterios empleados por el IRS e INC.**

❖ Tratamiento.

El tratamiento estándar en este grupo es quimioterapia inicial (Vincristina, Actinomicina D y Ifosfamida) con la intención de reducir el tratamiento local agresivo en los pacientes que alcanzaban la remisión completa. Los pacientes que alcanzan la remisión completa con quimioterapia no reciben cirugía agresiva. Los pacientes en remisión parcial reciben tratamiento local definitivo con radioterapia y cirugía.

**3) ESTRATEGIA TERAPEÚTICA PARA LOS RMSs DE ALTO RIESGO.**

❖ Criterios de inclusión. Se incluyen en este grupo:

- Tumores con la misma extensión que el grupo anterior, pero con localización desfavorable (Tabla I-V).
- RMSs alveolares en cualquier estadio.

❖ Tratamiento.

- Cirugía inicial o biopsia y quimioterapia intensiva. Los pacientes son divididos aleatoriamente entre dos esquemas de tratamiento distintos:
  - Esquema A: Carboplatino, Epirubicina, Vincristina, Ifosfamida, Actinomicina D y Etopósido.
  - Esquema B: Ifosfamida, Vincristina y Actinomicina D.

**4) ESTRATEGIA TERAPEÚTICA PARA LOS RMSs EN ESTADIO IV.**

❖ Criterios de inclusión

Tumores metastásicos en el momento del diagnóstico.

❖ Tratamiento.

En este protocolo no se contemplan las recomendaciones para este grupo. La poliquimioterapia y radioterapia personalizada, fue el tratamiento de elección en estos pacientes según sus necesidades.

**5) ESTRATEGIA TERAPEÚTICA PARA LAS RECAÍDAS**

❖ Recaídas en RMSs de bajo riesgo y riesgo estándar.

Poliquimioterapia con: Ifosfamida, Carboplatino, Epirubicina y Etopósido.

❖ Recaídas en RMSs de alto riesgo.

Poliquimioterapia con: Epirubicina, Carboplatino, Etopósido y Vincristina.

Se pretende pues que el MMT95 investigue nuevos factores pronósticos y explore el valor terapéutico de una quimioterapia más intensiva para los RMSs en estadio IV y los

pacientes de alto riesgo sin metástasis.

#### **I.1.4.- INSTITUTO NACIONAL DEL CANCER.**

##### **A) CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA.**

Posteriormente, el **Instituto Nacional del Cancer (INC)** de EEUU (Tsokos, 1992) (Tabla I-VI), en un estudio también dirigido a comprobar la relación entre patrón histológico y curso clínico, clasifica a los RMSs de acuerdo con el patrón de crecimiento y las características citológicas en dos tipos básicos: **embrionario y alveolar**.

##### **B) APORTACIONES.**

Las principales aportaciones del INC fueron:

- ❑ Reconocer la variante sólida del RMS alveolar que consiste en una versión “compacta” de este tumor, constituida por células redondas con características citológicas similares a las del tipo alveolar convencional, escasa miogénesis y ausencia de patrón alveolar.
- ❑ Encontrar una clara asociación con el pronóstico. Los tumores con patrón alveolar (clásico y sólido) tienen un comportamiento muy maligno, mientras que los de patrón embrionario tienen un pronóstico más favorable.

Esta clasificación incrementó el problema diagnóstico al reconocer la variante **alveolar sólida**. Este tumor presenta semejanza en su aspecto histológico con algunos RMSs embrionarios, pero implica el mismo pronóstico desfavorable que la variante alveolar clásica.

CLASIFICACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DEL CANCER.	
<input type="checkbox"/>	RMS embrionario (favorable) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Convencional</li> <li>• Con características histológicas agresivas.</li> <li>• Pleomórfico</li> <li>• Leiomiomatoso</li> </ul>
<input type="checkbox"/>	RMS alveolar (desfavorable). <ul style="list-style-type: none"> <li>• Convencional.</li> <li>• Alveolar sólido.</li> </ul>
<input type="checkbox"/>	RMS pleomórfico.
<input type="checkbox"/>	Otros.

Tabla I-VI.- Clasificación histológica del INC.

#### I.1.5.- OTRAS APORTACIONES HISTOLÓGICAS.

Poco después **Cavazzana** (Cavazzana, 1992) describió el **RMS embrionario de células fusiformes**. Este tumor se caracteriza por mostrar una marcada diferenciación muscular esquelética, tener bajo potencial de malignidad y localizarse preferentemente en la zona paratesticular. Según los datos publicados (Cavazzana, 1992; Leuschner, 1993; Newton, 1995), el pronóstico llamativamente favorable de este tumor justifica su separación como variante histológica en la última clasificación del IRS III (Newton, 1995) y de la OMS (Weiss, 1995).

Posteriormente **Wijnaendts** (Wijnaendts, 1994) en una revisión de 113 casos encontró una asociación estadística significativa entre la clasificación histopatológica y la supervivencia en los RMSs no parameníngeos. Mientras que el pronóstico fue favorable para el RMS de células fusiformes, botrioide y sarcoma embrionario, el tipo embrionario convencional

tuvo un pronóstico intermedio y el tipo alveolar se asoció al peor pronóstico. Según este estudio la localización parameningea es por sí misma un factor pronóstico en la predicción del riesgo de recidiva en pacientes con RMS, independiente del tipo histológico (Tabla I-VII).

	LOCALIZACIÓN	TIPO HISTOLÓGICO	PRONÓSTICO
<b>RMS</b>	No-parameningeo	Sarcoma embrionario	Bueno
		RMS Botriode	
		RMS de células fusiformes	
	Parameningeo	RMS embrionario	Intermedio
		RMS alveolar	Malo

Tabla I-VII. Clasificación pronóstica de los RMSs según tipo histológico y localización (Wijnaendts, 1994).

### **I.1.6.- INTERGROUP RHABDOMYOSARCOMA STUDY III.**

#### **A) CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA.**

En 1994 el **IRS-III** (Asmar, 1994) se propuso estudiar las características morfológicas asociadas a un buen o mal pronóstico en 800 RMSs, según los cuatro sistemas de clasificación histológica (Tabla I-VIII): **Sistema convencional, SIOP, INC y sistema citohistológico**. Su objetivo era encontrar una clasificación universal, verificada, reproducible y con implicaciones pronósticas que fuera aceptada por todos sus participantes.

#### **B) APORTACIONES.**

C) Las principales aportaciones de este estudio fueron las siguientes:

- El RMS embrionario con algunas áreas de aspecto alveolar, debe ser clasificado como alveolar con vistas al pronóstico.
- El EOE es una neoplasia confundida frecuentemente con el RMS pobremente diferenciado.
- Todas las clasificaciones demuestran asociación estadística con la supervivencia, pero está es más marcada cuando se emplea el sistema convencional.
- La variante sólida del RMS es un subtipo de la forma alveolar.
- La variante pleomórfica queda eliminada pues es un tipo histológico inusual en la edad pediátrica que podría ser equiparable a la variante anaplásica de RMS embrionario.

CONVENCIONAL	SIOP	NCI	CITOHISTOLÓGICO
- EOE	- EOE		
- INDIFERENCIADO	- NO ESPECIFICADO - SARCOMA EMBRIONARIO	- INCLASIFICABLE	- INDIFERENCIADO
- EMBRIONARIO	- LAXO NO BOTRIOIDE - BIFÁSICO - DENSO POBREMENTE DIFERENCIADO - DENSO BIEN DIFERENCIADO	- EMBRIONARIO CLÁSICO - EMBRIONARIO AGRESIVO - EMBRIONARIO LEIOMIOMATOSO	- MIXTO
- BOTRIOIDE	- LAXO BOTRIOIDE	- ALVEOLAR SOLIDO - OTROS	- ANAPLÁSICO
- PLEOMÓRFICO	- PLEOMÓRFICO	- PLEOMÓRFICO	
- ALVEOLAR	- ALVEOLAR MIOGÉNICO - ALVEOLAR INTERMEDIO	- ALVEOLAR MONOMÓRFICO - ALVEOLAR PLEOMÓRFICO	- MONOMÓRFICO
- INDIFERENCIADO	- ALVEOLAR PLEOMÓRFICO	- INCLASIFICABLE	- INDIFERENCIADO

**Tabla I-VIII.- Comparación de los cuatro sistemas de clasificación histológica de los RMSs.**

**I.1.7.- NUEVA CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL.**

Con este trabajo se crearon las bases para la **nueva clasificación internacional** (Tabla I-IX) desarrollada entre 1994 y 1995 por el IRS (Asmar, 1994; Newton, 1995) que reconoce cuatro tipos: 1) En la categoría de buen pronóstico están las variantes botrioide y fusocelular del RMS embrionario. 2) El grupo de pronóstico intermedio está constituido por el RMS embrionario convencional. 3) Como tipos de mal pronóstico figuran el alveolar (clásico y sólido) y el sarcoma indiferenciado. 4) El grupo de pronóstico indeterminado lo constituyen el RMS con características rabdoideas. El RMS embrionario de células fusiformes, es una variante infrecuente que equivale a la forma leiomiomatosa de la clasificación del INC (Tsokos, 1992). El sarcoma indiferenciado es fundamentalmente un diagnóstico de exclusión y el grupo 4 es una rareza, con lo que en la práctica, actualmente, la clasificación histológica de los RMSs queda reducida a tres grupos, dos de ellos constituidos por los RMSs embrionarios y el otro por los RMSs alveolares.

<b>CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL DE LOS RMS</b>
Buen pronóstico. <ul style="list-style-type: none"> <li>• RMS botrioide.</li> <li>• RMS de células fusiformes</li> </ul>
Pronóstico intermedio. <ul style="list-style-type: none"> <li>• RMS embrionario.</li> </ul>
Mal pronóstico. <ul style="list-style-type: none"> <li>• RMS alveolar.</li> <li>• Sarcoma indiferenciado.</li> </ul>
Pronóstico incierto. <ul style="list-style-type: none"> <li>• RMS con características rabdoideas.</li> </ul>

**Tabla I-IX.- Nueva clasificación internacional de los RMSs.**

**I.1.8.- CLASIFICACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.**

La actual clasificación de la **OMS** (Weiss, 1995) es una variante de la gradación propuesta por Horn y Enterline (Horn, 1958) pero con la adición de dos nuevas categorías: **RMS embrionario de células fusiformes y ectomesenquimoma** (Tabla I-X). A pesar de su aceptación por este prestigioso comité internacional, esta clasificación de la OMS presenta dificultades de aplicación en la rutina diagnóstica.

En resumen, la gradación histológica de esta neoplasia con fines pronósticos sigue siendo motivo de controversia en la literatura, a pesar de que son numerosos los estudios que han demostrado una correlación altamente significativa entre el tipo histológico y la supervivencia (Newton, 1988; Caillaud, 1989; Crist, 1990; Tsokos, 1992; Asmar, 1994; Newton, 1995; Coffin (A), 1997).

<b>CLASIFICACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.</b>
• RMS embrionario
• RMS botrioide
• RMS de células fusiformes
• RMS alveolar
• RMS pleomórfico
• RMS con diferenciación gangliónica (ectomesenquimoma).

**Tabla I-X.- Actual clasificación de la OMS.**

La biología molecular ha contribuido extraordinariamente al desarrollo de una clasificación genética con implicaciones pronósticas y terapéuticas en otros tumores pediátricos como el sarcoma de Ewing y el tumor neuroectodérmico primitivo (Delattre, 1994), sin embargo en

el RMS se conocen muy poco los factores genéticos que influyen en el comportamiento biológico. Mientras que esto se logra, la clasificación internacional del RMS (Newton, 1995) ha pretendido crear un sistema morfológico, fácilmente reproducible que permita estandarizar protocolos terapéuticos y diagnósticos en función del pronóstico.

## **I.2.- FACTORES PRONÓSTICOS.**

La supervivencia en el RMS infantil ha mejorado mucho con el empleo de tratamientos combinados. *Un dato constante en los estudios de la SIOP y el IRS anteriormente citados,* es que la supervivencia a los 5 años para este grupo de tumores ha aumentado progresivamente en las últimas décadas (desde el 25% en 1970 al 70% en 1995) (Pappo (A), 1995), pero todavía la evolución clínica del RMS es muy variable, lo que traduce la diferente respuesta a la quimioterapia que tienen unos casos frente a otros (Neifeld, 1979; Gehan, 1981; Lawrence, 1987; Newton, 1988; Rodary, 1988; Maurer, 1993; Pappo (B), 1995). En el pasado, se consideró al RMS como una enfermedad sin pautas terapéuticas bien establecidas y evolución casi siempre mortal; esto es debido a la infrecuencia de este tumor así como a la escasez de información en la literatura. En la actualidad, la aportación de nuevos protocolos terapéuticos por los grupos inter-Europeo e inter-Americano están contribuyendo extraordinariamente a la planificación de estrategias terapéuticas conservadoras así como a identificar nuevos marcadores pronósticos que mejoren sustancialmente la supervivencia y calidad de vida de estos pacientes.

El pronóstico de los RMSs parece asociado a distintos factores, unos relacionados con el paciente: **edad, sexo, localización, tamaño y estadio**, y otros con las características biológicas de la neoplasia. Entre estos últimos algunos son bien conocidos como el **tipo**

**histológico**, otros están poco estudiados como **la ploidía y el IPC**. El efecto sobre el pronóstico del RMS que pueden tener algunos marcadores tumorales ya conocidos como la p53, mdm-2, p21 y p16 está por determinar. Es muy posible que la respuesta a la quimioterapia, y por tanto el pronóstico de los RMSs, se vea influenciada por la acción sinérgica de varios de estos factores y de otros que estén por descubrir.

### **1.2.1.- FACTORES PRONÓSTICOS CLÁSICOS.**

#### **1.2.1.1.-EDAD.**

Tradicionalmente se ha considerado que la edad es un factor pronóstico de enorme importancia en los tumores sólidos malignos infantiles, como el neuroblastoma (Breslow, 1971; Kinnier-Wilson, 1974) y LLA (Reaman, 1985; Hammond, 1986).

La influencia de la edad en la supervivencia de los RMSs está todavía por aclarar, pero se ha demostrado suficientemente una peor respuesta a la quimioterapia en los adultos (Lloyd, 1983; De Jong, 1987; Miettinen, 1988; Prestidge, 1989; Nakleh, 1991; La Quaglia, 1994). Existe la posibilidad de que esta mala respuesta sea debida a características intrínsecas de la neoplasia o bien a una peor tolerancia al tratamiento (Lawrence, 1964; Lloyd, 1983; De Jong, 1987; Prestidge, 1989).

La mayor parte de los estudios clinicopatológicos de series infantiles amplias no han encontrado diferencia significativa en el pronóstico según la edad (Ragab, 1986; Maurer, 1988; Maurer, 1993; Mameghan, 1993; Wijnaendts, 1993; Wijnaendts, 1994; Niggli, 1994; Crist, 1995; De Zen, 1997). Sin embargo, algunos trabajos del IRS (Crist, 1990; Andrassy, 1996), de la SIOP (Rodary, 1988; Reboul-Marty, 1991) y de otros autores (Sutow, 1970; Tsokos, 1992; Kilpatrick, 1994; La Quaglia, 1994) han demostrado una influencia de la

edad en la supervivencia (Sutow, 1970; Crist, 1990; Reboul-Marty, 1991; Kilpatrick, 1994; Andrassy, 1996) y en el intervalo libre de enfermedad (ILE) (Rodary, 1988; Reboul-Marty, 1991; La Quaglia, 1994), mostrando un pronóstico más favorable los niños menores. En un sólo estudio (La Quaglia, 1994) se ha demostrado que la edad es un factor pronóstico independiente. La Quaglia (La Quaglia, 1994) en una serie amplia y homogénea de 290 RMSs, la mayor parte de ellos infantiles (85 % en menores de 21 años), demostró que la edad era un factor pronóstico independiente, estadísticamente significativo y determinante en los tumores invasivos no metastásicos. Este autor atribuye el fenómeno a la diferente respuesta a la quimioterapia, o bien a que las células neoplásicas sean biológicamente diferentes.

Por último, la relación entre la edad y el tipo histológico en el RMS está ampliamente descrita en la literatura (Caillaud, 1989; Tsokos, 1992; Wijnaendts, 1994; La Quaglia, 1994; Harms, 1995; Coffin (A), 1997). Ambos parámetros siguen una distribución bimodal: los tumores embrionarios son más frecuentes en niños menores de 10 años, mientras que los alveolares predominan en niños mayores y adolescentes (Gaiger, 1981; Newton, 1988; Caillaud, 1989; Tsokos, 1992; Wijnaendts, 1994; Harms, 1995; Coffin (A), 1997). Estos datos podrían justificar que la edad no sea un factor pronóstico independiente en la mayoría de las series (Ragab, 1986; Maurer, 1988; Maurer, 1993; Mameghan, 1993; Wijnaendts, 1993; Wijnaendts, 1994; Niggli, 1994; Crist, 1995; De Zen, 1997) ya que su valor pronóstico iría ligado al tipo histológico.

### **1.2.1.2.- SEXO.**

En la mayoría de las series se aprecia un ligero predominio del sexo masculino (Newton,

1988; Maurer, 1988; Molenaar, 1988; Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Reboult-Marty, 1991; Shapiro, 1991; Maurer, 1993; Enzinger, 1995; De Zen, 1997) que es más marcado en los RMSs embrionarios (Newton, 1988; Molenaar, 1988; Caillaud, 1989; Enzinger 1995), lo que podría justificar la aparente mejor evolución de este tumor en los varones. Un solo estudio del registro de la SIOP (Rodary; 1988) demostró que el sexo era un factor pronóstico independiente en los RMSs no metastásicos; según este estudio, el sexo masculino implicaría mejor pronóstico y evolución.

### **I.2.1.3.- LOCALIZACIÓN.**

La localización del tumor se relaciona con el pronóstico en los RMSs, de tal forma que esta asociación ha permitido enunciar el concepto de **localizaciones favorables y desfavorables**. Sin embargo, no existe un acuerdo general a la hora de agrupar los casos en localizaciones favorables y desfavorables lo que dificulta extraordinariamente la comparación de los resultados entre las diferentes series. La clasificación con mayor aceptación internacional ha sido la empleada por el IRS (Sutow, 1970; Gehan, 1981; Raney, 1981), que posteriormente ha sido adoptada por el INC (Tsokos, 1992) (Tabla I-V), mientras que otros estudios multivariados de supervivencia agrupan la localización en genitourinario/resto (De Zen, 1997), o parameningeos/resto como la SIOP y otros autores (Caillaud, 1989; Rodary, 1988; Wijnaendts, 1994) (Tabla I-XI).

LOCALIZACIÓN		
Buen pronóstico	Pronóstico intermedio	Mal pronóstico
1-Orbitarios (no parameníngeos)	1-Otras localizaciones (no parameníngeos)	1-Parameníngeos
2-Vaginales		
3-Paratesticulares		

Tabla I-XI. Clasificación de la SIOP según el pronóstico y la localización.

A pesar de estas disparidades la mayor parte de los estudios que valoran la asociación entre localización y pronóstico en series amplias de RMSs muestran una correlación estadística independiente (Sutow, 1970; Neifeld, 1979; Gehan, 1981; Flamant, 1984; Lawrence, 1987; Rodary, 1988; Maurer, 1988; Caillaud, 1989; Crist, 1990; Rodary, 1991; Tsokos, 1992; Wijnaendts, 1994; Newton, 1995; Andrassy, 1996; Nakanishi, 1997), aún cuando los datos provengan de diferentes registros y se empleen diferentes sistemas de clasificación. Por otra parte, varios autores (Gehan, 1981; Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Wijnaendts, 1994; Andrassy 1996) han demostrado en estudios multivariados que las localizaciones parameníngea (Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Wijnaendts 1994) y en extremidades (Gehan, 1981; Andrassy, 1996) son factores de mal pronóstico, independientemente del tipo histológico. Sin embargo en otros estudios clínicopatológicos, la localización no muestra repercusión pronóstica (Reboul-Marty, 1991; Pappo, 1993; Kilpatrick, 1994; De Zen, 1997). Estos datos sugieren que la localización podría estar condicionada por otros factores pronósticos, como la ploidía, el tipo histológico y el IPC:

**La ploidía:** Según algunos estudios la mayor parte de los tumores localizados en el aparato urogenital son hiperdiploides, mientras que los tumores tetraploides están localizados más

frecuentemente en las extremidades (De Zen, 1997). Para otros autores (Wijnaendts, 1993), la mayoría de los tumores localizados en aparato urogenital, cabeza y cuello son aneuploides, y los localizados en tórax, abdomen y extremidades son más frecuentemente diploides.

**Tipo histológico:** Alrededor del 70% de los tumores situados en a. genitourinario, órbita y senos paranasales son botrioides, mientras que en las extremidades predomina el tipo alveolar. (Caillaud, 1989; Enzinger, 1995; Andrassy, 1996; De Zen, 1997).

**IPC:** Algunos estudios demuestran que los tumores de extremidades y parameníngeos tienen IPC superiores al 14% en el 90% de los casos; mientras que los tumores urogenitales y de cabeza y cuello no parameníngeos tienen IPC inferiores al 14% (De Zen, 1997).

Por último, cabe resaltar que la localización es un factor pronóstico determinante en la clasificación por estadios previa al tratamiento según el sistema propuesto por el IRS (Lawrence, 1987) (Tabla I-XII) y por lo tanto es un factor decisivo para la estrategia terapéutica a seguir.

ESTADIO	DESCRIPCIÓN
I	Localización favorable, M0
II	Otra localización Ta N0 M0
III	Otra localización Tb N0, Tb N1 M0 o Ta N1 M0
IV	M1

**Tabla I-XII. Clasificación del IRS según el estadio clínico previo al tratamiento.**

Abreviaturas: **M0**, ausencia de metástasis. **M1**, metástasis a distancia. **T0**, sin invasión fuera del músculo de origen. **T1**, invasión fuera del músculo de origen. **N0**, sin metástasis en ganglios linfáticos regionales. **N1**, metástasis en ganglios linfáticos regionales. **a**, tamaño <5 cms. **b**, tamaño >5 cms.

#### **I.2.1.4.- TAMAÑO.**

El tamaño podría ser un factor pronóstico independiente en el RMS, junto con el estadio y la localización, según dos trabajos clínico-patológicos recientes del IRS III (Newton, 1995; Andrassy, 1996); con unos resultados que difieren de los obtenidos por el IRS en los proyectos I y II en los que no se demostró dicha asociación (Lawrence, 1987; Maurer, 1988; Crist, 1990). Posiblemente el desarrollo de las nuevas técnicas de imagen haya contribuido a una valoración más correcta del tamaño en el RMS. No obstante, es llamativa la escasez de estudios que valoran este parámetro pronóstico tan importante en otras neoplasias. La estratificación empleada por el IRS (Maurer, 1981), que es la clasificación por estadios más empleada en este tumor, no considera el tamaño en su valoración (Tabla I-XIII), a diferencia del tradicional sistema TNM/UICC (Harmer, 1982) (Tabla I-XIV). Sin embargo, es aceptado por el IRS en la clasificación por estadios previa al tratamiento, evaluando el tamaño de los tumores según sean mayores o menores de 5 cms.

#### **I.2.1.5.- ESTADIO.**

En el RMS, como en la mayoría de los tumores, el estadio clínico es un factor pronóstico de máxima importancia (Kingston, 1983; Donaldson, 1984; Pedrick, 1986; Lawrence, 1987; Rodary, 1988; Reboult-Marty, 1991; Gansey, 1991; Wijnaendts 1994; Newton, 1995; Crist, 1995), determina que la supervivencia del RMS a los 3 años varíe de un 48% para el estadio I a un 8% para el estadio IV (Crist 1995) según los resultados del IRS III.

De todos los métodos de estratificación en diferentes estadios, dos son los que han tenido mayor aceptación: el sistema **TNM/UICC** (Harmer, 1982) (Tabla I-XIII) de amplio uso en la SIOP (Caillaud, 1989; Reboul-Marty, 1991; Kodet, 1997) y la clasificación propuesta por el **IRS** (Tabla I-XIV) (Maurer 1975) que tiene mayor difusión y aceptación internacional (Tsokos, 1992; Mameghan, 1993; Wijnaendts, 1994; Pappo (A), 1995; Crist, 1995; De Zen, 1997).

El sistema del IRS es el método más útil para clasificar el tumor después de la resección quirúrgica, ya que valora su resección total o parcial. Sin embargo, este sistema ha sido duramente criticado en función de los consejos terapéuticos de los dos registros internacionales (Pappo (A), 1995), que recomienda una quimioterapia inicial agresiva y la restricción terapéutica local. Según estas conclusiones, es necesaria una clasificación pronóstica estricta previa al tratamiento.

Sobre la base de estos criterios, el IRS (Lawrence, 1987) adopta una modificación del sistema de clasificación TNM. Esta nueva clasificación anteriormente comentada (tabla I-XII), es sustancialmente mejor para la valoración del tumor previa al tratamiento y además introduce la localización y el tamaño como factores pronósticos determinantes en la clasificación por estadios previa a la quimioterapia (Pappo (A), 1995) (tabla I-XII).

<b>CLASIFICACIÓN SEGÚN EL SISTEMA TNM/UICC</b>
<b>ESTADIO T.</b>
➤ <u>T= Tumor primario.</u>
T0: Sin evidencia de tumor primario. T1: Tumor confinado al órgano o sistema de origen. T1a: Tumor de 5 cm o menos en su dimensión máxima. T1b: Tumor de más de 5 cm en su dimensión máxima. T2: Tumor con afectación de uno o más órganos contiguos o con derrames tumorales, o múltiples tumores en el mismo órgano. T2a: Tumor de 5cm o menos en su dimensión máxima. T2b: Tumor de más de 5 cm en su dimensión máxima. Tx: No se dispone de las valoraciones mínimas necesarias.
<b>ESTADIO N</b>
➤ <u>N= Adenopatías regionales</u>
N0: Sin evidencia de afectación linfática regional. N1: Afectación linfática regional. Nx: No se dispone de la valoración mínima necesaria. Nx debe considerarse como N0 en los estadios I y II.
<b>ESTADIO M</b>
➤ <u>M= Metástasis a distancia</u>
M0: sin evidencia de metástasis. M1: con metástasis. Mx : no se dispone de la valoración mínima necesaria.

**Tabla I-XIII. Estadios clínicos según el sistema TNM.**

En cuanto a la influencia del estadio en la evolución clínica, los estadios I y II tienen un pronóstico semejante cuando son del mismo tipo histológico, y por lo tanto podrían considerarse conjuntamente (Pappo (A), 1995; Maurer, 1988). Por otro lado, aunque los estadios III y IV tienen mucho peor pronóstico, se describe que la afectación parameningea y de extremidades confiere peor pronóstico que otras extensiones locales (Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Wijnaendts, 1994; Andrassy, 1996).

CLASIFICACIÓN SEGÚN EL IRS	
<b>Estadio I.</b>	Enfermedad localizada y reseçada completamente, sin invasión de los ganglios linfáticos regionales. Dos son las opciones: Confinada al músculo o al órgano de origen. Afectación por contigüidad. Infiltración fuera del músculo o del órgano de origen, como ocurre en los planos aponeuróticos. Se incluyen en este grupo tanto la resección completa comprobada microscópicamente como la impresión macroscópica de la misma.
<b>Estadio II.</b>	Tumor reseçado, con restos microscópicos de la enfermedad. No hay evidencia clínica o microscópica de invasión de ganglios regionales. Enfermedad regional totalmente reseçada. No quedan restos microscópicos. Enfermedad regional con invasión ganglionar ampliamente reseçada, pero con evidencia de restos microscópicos.
<b>Estadio III</b>	Resección incompleta o biopsia del tumor con restos macroscópicos importantes.
<b>Estadio IV</b>	Enfermedad con presencia de metástasis desde el principio.

**Tabla I. XIV. Estadios clínicos después del tratamiento. Esquema del IRS.**

La existencia de metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico es un factor con gran influencia en la supervivencia y el ILE, por lo que éstas implican que el tumor sea incluido automáticamente en el estadio clínico III (Gehan, 1981; Lawrence, 1987; La Quaglia, 1994, Andrassy 1996) y constituyen por lo tanto un factor que ensombrece significativamente el pronóstico (Reboul-Marty, 1991). Las metástasis a distancia suponen el estadio clínico más avanzado y comportan por tanto el pronóstico más grave (Niggli, 1994; Wijnaendts, 1994; La Quaglia, 1994).

Finalmente algunos autores han demostrado que el estadio clínico se relaciona estadísticamente con la ploidia (Kowal-Vern, 1990) y el tipo histológico (Caillaud, 1992), de forma que los tumores aneuploides y alveolares son con más frecuencia diagnosticados en estadios III y IV.

### **I.2.1.6.- TIPO HISTOLÓGICO.**

El RMS es un tumor muy heterogéneo y complejo morfológicamente. En general es una neoplasia fácil de diagnosticar histológicamente como entidad (Enzinger, 1995), pero con importantes problemas de subtipificación y clasificación que todavía persisten en la actualidad y que reflejan un grado considerable de superposición entre las distintas variantes histológicas y la ausencia de unos criterios morfológicos estrictos para separar cada una de ellas.

Tradicionalmente, los RMSs infantiles se han clasificado en dos grandes grupos con importancia pronóstica: el embrionario con pronóstico favorable y el alveolar con pronóstico desfavorable (Tsokos, 1992). Sin embargo, esta asociación parece desaparecer cuando se valoran otros datos pronósticos como el estadio (Maurer, 1988; Pedrick 1986) y la localización (Gehan, 1981; Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Wijnaendts, 1994; Andrassy 1996). La nueva clasificación internacional (Newton, 1995) (tabla I-IX) considera que el tipo embrionario es histológicamente más variado y que tiene formas de buen pronóstico: botrioides y fusocelular y otras de pronóstico intermedio: embrionario convencional. Sin embargo, a pesar del indudable progreso que suponen las nuevas clasificaciones, siguen existiendo problemas para clasificar histológicamente algunos RMSs como alveolares o embrionarios, sobre todo después de la descripción (Tsokos, 1992) de la variante sólida del RMS alveolar.

Algunos autores no han encontrado diferencias pronósticas entre las distintas variantes histológicas (Jaffe, 1973; Marsden, 1976; Gehan, 1981; Bale, 1983; Suder, 1986; Rodary, 1988; De Zen, 1997). Otros demuestran una asociación estadística entre tipo histológico y ploidía, de tal forma que la mayoría de los RMSs embrionarios son hiperdiploides,

mientras que los RMSs alveolares son mayoritariamente tetraploides (Shapiro, 1991; Kilpatrick, 1994). Según estos estudios (Shapiro, 1991; Kilpatrick, 1994) la ploidía parece ser un factor pronóstico importante en los RMSs. Estos hallazgos sugieren que la ploidía en los RMS infantiles podría contribuir a clarificar el pronóstico, especialmente en los casos difíciles de tipificar histológicamente (Kilpatrick 1994).

Recientemente, Coffin (Coffin (B), 1997) y anteriormente otros autores (Molenaar, 1984; d'Amore, 1994) han sugerido en series pequeñas, que la citodiferenciación rabdomioblástica postquimioterapia en los RMSs, podría ser un indicador de buen pronóstico. Estos resultados deberán confirmarse en posteriores estudios con series más amplias.

## **1.2.2.- OTROS FACTORES PRONÓSTICOS.**

El conocimiento que se tiene acerca de las características biológicas de los sarcomas de partes blandas, y en concreto del RMS, es aun muy limitado. No obstante, parece que la histología, base fundamental del diagnóstico, no permite predecir por sí sola el comportamiento biológico de este tumor. La ploidía, actividad proliferativa y diferentes marcadores celulares han sido recientemente incorporado como técnicas de estudio en el RMS. El principal objetivo de los estudios con estos nuevos marcadores biológicos y citométricos es determinar su valor como criterios diagnósticos y pronósticos.

### **1.2.2.1.- PLOIDÍA.**

#### **1.2.2.1.1.- CICLO CELULAR.**

El ciclo celular tiene como objetivo final la duplicación de la información genética de una

célula para, una vez conseguida, repartirla con precisión absoluta, generando dos células hijas idénticas a la progenitora.

La división celular comprende dos periodos: **la interfase o fase de síntesis** (fase-S), en la que se produce la duplicación del ADN y **la división o fase de multiplicación** (fase-M) (que tiene lugar por mitosis, meiosis u otros mecanismos de duplicación celular), en la que se produce un reparto equitativo de los diferentes componentes celulares (Fig. I-1). En la interfase se distinguen tres periodos fundamentales:

**Fase G<sub>1</sub>** que es aquella etapa de la interfase que precede a la síntesis del ADN, por ello las células en este periodo se preparan para la entrada en la fase S y presentan un contenido de ADN diploide (2n).

**Fase S** que es el periodo de síntesis del ADN, por lo que el contenido de ADN nuclear oscilará entre diploide (2n) y tetraploide (4n).

**Fase G<sub>2</sub>** que es el periodo comprendido entre la fase S y la mitosis. En esta etapa las células presentan una cantidad de ADN tetraploide (4n).

Posteriormente se produce la **mitosis** que ocurre en distintos periodos: **Profase**, en la que los cromosomas se condensan; **prometafase** en la que los cromosomas se reorientan terminando en **metafase**; **anafase**, durante la cual, los cromosomas se dividen en dos partes iguales y se separan y **telofase** en la que los núcleos se reconstruyen. Después de la mitosis las células hijas entran nuevamente en el periodo de quiescencia o fase G<sub>0</sub>, que corresponde pues a un estado de células en reposo.

En las células que se encuentran en proliferación, estas cuatro fases se suceden de forma continua, ordenada y sujeta a una estricta regulación mediante los puntos de control y restricción (Sherr, 1994; Nurse, 1994) (Fig I-1). La pérdida de regulación del ciclo celular

ocasionará la transformación maligna, que se caracteriza básicamente por una proliferación celular incontrolada y una pérdida de la diferenciación celular (Cohen, 1990; Preston-Martin, 1990).

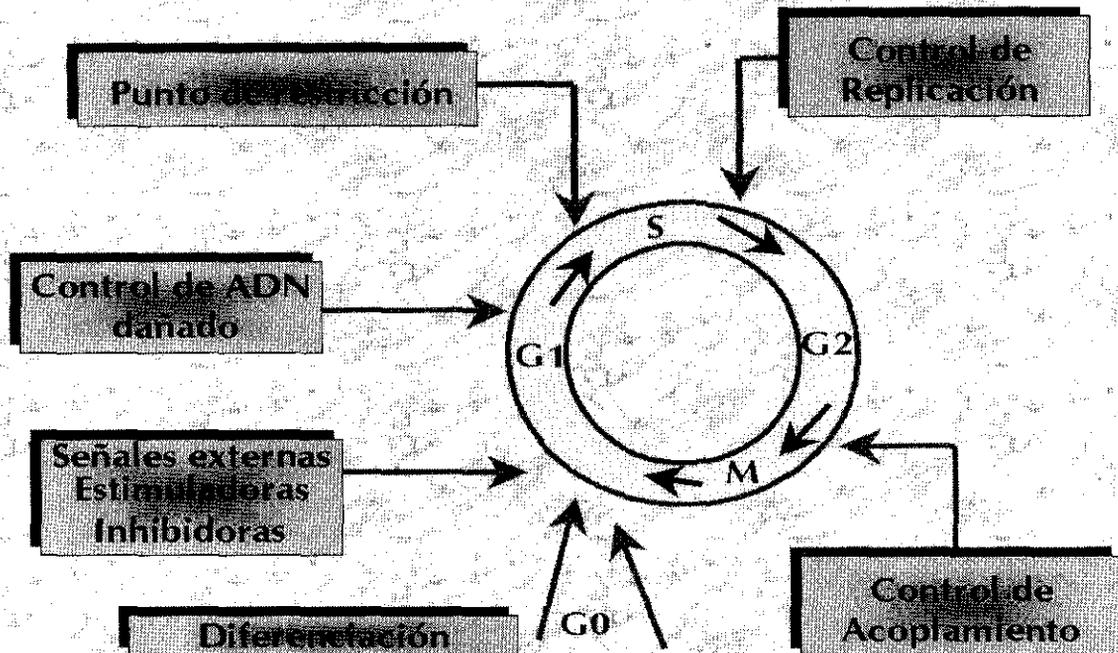


Fig.I-1. Fases del ciclo celular y posición de los principales puntos de control y restricción.

La incorporación de la cuantificación del ADN por citometría de imagen o de flujo al arsenal diagnóstico y pronóstico está aumentando nuestra capacidad para valorar la agresividad de los tumores y diseñar nuevas estrategias terapéuticas más eficaces.

### 1.2.2.1.2.- CITOMETRÍA DE FLUJO Y CITOMETRÍA ESTÁTICA.

La citometría estática (CME) y la citometría de flujo (CMF) son las dos técnicas citofotométricas que permiten cuantificar diferentes sustancias químicas celulares. Los dos

fenómenos ópticos en que se basan son la absorción y la fluorescencia respectivamente.

La citometría de absorción, se basa en la captación de energía luminosa de una determinada longitud de onda por parte de diferentes grupos químicos coloreados. En la tinción se deben emplear reacciones químicas estequiométricas, en las que la intensidad de la tinción del producto final sea proporcional a la cantidad de sustancia a detectar (Rost, 1980).

La citometría de fluorescencia se basa en la cuantificación de la fluorescencia emitida por diversos grupos químicos celulares marcados con un fluorocromo, de forma que el tamaño del impulso fluorescente sea proporcional a la cantidad de la sustancia química analizada.

En el campo de la patología tumoral humana, uno de los componentes celulares más analizado por citometría ha sido el contenido nuclear de ADN. Los estudios en este campo son numerosísimos y encaminados en su mayor parte a determinar si dicho contenido de ADN constituye un factor determinante del pronóstico de los tumores. Existen numerosos trabajos que demuestran que la ploidía es un factor pronóstico objetivo, fiable y reproducible en una amplia gama de tumores (Friedlander, 1984; Zimmerman, 1987; Dressler, 1987; Joensuu, 1990; Bauer, 1993; Wijnaendts, 1993).

Para la determinación del ADN nuclear en CME la tinción estequiométrica más utilizada es la de Feulgen (Koss, 1989; Grace, 1993). En CMF, el fluorocromo más utilizado para cuantificar el ADN es el yoduro de propidio (Darzynkiewicz, 1984).

La CME ó de imagen es una técnica interactiva con la que se puede medir el contenido de ADN de células aisladas teñidas con Feulgen. Para obtener resultados válidos las medidas deben de hacerse en extensiones citológicas y no en cortes histológicos para evitar medir secciones de núcleos en vez de núcleos enteros.

El operador selecciona visualmente los núcleos para la determinación automática de su densidad óptica y contenido de ADN. Después de que cada elemento es medido los datos son recogidos y almacenados por el ordenador para generar un histograma con el contenido de ADN de todos los núcleos analizados.

El índice de ADN (DI) para una población de células medida con CME es el cociente:

$$\frac{\text{ADN de las células tumorales seleccionadas}}{\text{ADN de las células normales seleccionadas}}$$

La obtención de un histograma válido requiere al menos 100-200 núcleos tumorales y un control interno de 20-40 núcleos de células normales diploides.

La CMF utiliza núcleos marcados con un fluorocromo para medir su contenido de ADN a partir de la fluorescencia que emiten. Con este método, la obtención de un histograma válido requiere la medida de 10-20000 núcleos, pues cantidades menores no producen valores estadísticamente significativos (Leader, 1994). Las muestras analizadas en CMF son suspensiones celulares.

El aparato realiza las medidas automáticamente, por lo que debe estar sujeto a rigurosos controles tecnológicos. Además, con cada batería de muestras medidas se deben incluir controles con tejidos normales diploides humanos. También se requiere que el coeficiente de variación de las poblaciones detectadas no sea superior al 10%, lo que refleja la anchura del pico dibujado en el histograma (Leader, 1994).

El DI en CMF se obtiene con el cociente:

$$\frac{\text{ADN de las células en el segundo pico}}{\text{ADN de las células en el primer pico}}$$

La introducción de la técnica de Hedley para extracción de núcleos a partir de bloques de parafina supuso un gran empuje para el desarrollo de la citometría de ADN en patología tumoral, pues posibilitó la realización de estudios retrospectivos en grandes series, con casos en los que se conocía la evolución. De esta forma se ha podido investigar ampliamente el contenido de ADN de muchos tumores y el papel de la ploidía en su diagnóstico y pronóstico (Murphy, 1986; Hedley, 1987; Clark, 1989; Merkel, 1990; Bosari, 1993; Susini, 1994; Vesalainen, 1994; Carmichael, 1995).

Las principales ventajas de la CMF estriban en su carácter totalmente automático que supone una gran rapidez de la medición (más de 1000 células/segundo), capacidad de analizar un gran número de células y una significación estadística alta. El gran número de núcleos analizados permite además estudiar el ciclo celular, cuantificando la fase S y G<sub>2</sub> M. La principal ventaja de la CME deriva de su carácter interactivo por lo que el operador tiene un control visual de los elementos que mide. Esto permite detectar pequeñas poblaciones aberrantes que pasan desapercibidas en CMF, por lo que su sensibilidad a la aneuploidía es superior (Merkel, 1990; Bauer, 1990; Lanigan, 1993; Clemo, 1993).

Las limitaciones, ventajas y desventajas de ambas técnicas citométricas han sido ampliamente comentadas en la literatura (Koss, 1989; Joensuu, 1989; Lanigan, 1993; Kilpatrick, 1994):

### **CITOMETRÍA DE FLUJO.**

#### ➤ Ventajas:

- Rapidez.
- Capacidad de analizar gran número de núcleos.
- Significación estadística elevada.

- No necesita personal muy cualificado para realizar la medición.

➤ Desventajas:

- Es totalmente automática.
- Imposibilidad de observar los elementos analizados (detritus, agrupamientos celulares, etc.).
- Aparataje caro.
- Factores tisulares y de procesamientos afectan la precisión de la medición produciendo coeficientes de variación elevados que invalidan el histograma.
- Requiere mayor cantidad de tejido.
- Falta de normas estandarizadas para la interpretación de los histogramas.

**CITOMETRÍA ESTÁTICA.**

➤ Ventajas:

- Es interactiva.
- Conservación de la morfología de los elementos analizados, evitando células en mal estado y detritus.
- Mayor sensibilidad a la aneuploidía.
- Posibilidad de almacenar material para su utilización posterior.
- Menor requerimiento de material en cuanto al número de núcleos y menor cantidad de tejido.

➤ Desventajas:

- Gran laboriosidad lo que limita su aplicación a grandes series.

- La medición requiere una alta cualificación del personal que la realiza, ya que debe interpretar características cito-nucleares.
- Aparataje caro.
- Factores tisulares y de procesamiento afectan a la precisión de la medición y pueden producir histogramas no válidos.

### **I.2.2.1.3.- PLOIDÍA EN LOS TUMORES INFANTILES.**

Los resultados más espectaculares en la aplicación de la cuantificación del ADN nuclear en la patología tumoral se han obtenido en el campo de los tumores infantiles, especialmente en el neuroblastoma y la leucemia linfoblástica aguda.

#### **I.2.2.1.3.A.- PLOIDÍA EN LOS NEUROBLASTOMAS.**

Desde los primeros estudios de Look en 1984 se demostró que los **neuroblastomas** con contenido de ADN aneuploide tienen una buena respuesta a la quimioterapia, incluso en estadios clínicos avanzados (Look, 1984; Gansler, 1986; Oppedal, 1988; Taylor, 1988). Desde entonces, ha sido reiteradamente comprobado que la presencia de una línea celular aneuploide predice un comportamiento clínico favorable y una buena respuesta a la quimioterapia en el neuroblastoma (Gansler, 1986). Estudios más recientes (Bourhis, 1991; Brodeur, 1992) indican que entre todos los factores significativamente asociados al pronóstico del neuroblastoma: edad, estadio clínico, índice de ADN y amplificación del oncogen N-myc, sólo los dos últimos son factores pronósticos independientes. Así pues, la determinación de la ploidía y el análisis citogenético son actualmente las dos pruebas de

mayor importancia para establecer el pronóstico en los neuroblastomas (Bourhis, 1991; Brodeur, 1992; Muraji, 1993). De esta forma, se pueden establecer tres grupos pronósticos: los tumores con contenido de ADN aneuploide, con pocos o ningún reordenamiento citogenético que tienen buen pronóstico; los tumores diploides sin anomalías citogenéticas detectadas que tienen una progresión lenta pero a menudo fatal; los tumores diploides en los que se detectan deleciones o pérdida de la heterozigosidad para el brazo corto del cromosoma 1, o amplificación del oncogen N-myc que tienen una evolución rápidamente fatal (Brodeur, 1992).

#### **1.2.2.1.3.B.- PLOIDÍA EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.**

Por lo que respecta a la LLA, el número de cromosomas en las células tumorales es conocido desde hace tiempo como el factor pronóstico independiente más importante, lo que ha convertido al cariotipo en la prueba de laboratorio más importante en estos niños, después del recuento de blastos en sangre periférica (Jackson, 1990). Los casos cuyos blastos tienen más de 51 cromosomas presentan una buena respuesta al tratamiento y esto corresponde exactamente a un índice de ADN (DI) de 1.16 (Look, 1985; Jackson, 1990). Así pues la determinación del contenido de ADN se ha convertido en una prueba analítica de primer orden en la LLA.

#### **1.2.2.1.3.C.- PLOIDÍA EN OTROS TUMORES INFANTILES.**

En otros tumores infantiles los resultados han sido menos concluyentes. Así, mientras que

en algunas series encuentran superior supervivencia en los **meduloblastomas** aneuploides (Schofield, 1992), en otros estudios la condición diploide es indicativa de una evolución clínica favorable, junto a la adecuada dosis de radiación (Zerbini, 1993).

En el **sarcoma de Ewing** el valor pronóstico de la ploidía ha sido poco estudiado y posiblemente tenga escasa repercusión en la supervivencia, dado el escaso número de tumores aneuploides que se han hallado (Dierick, 1993). Sin embargo, en el **nefroblastoma** se ha encontrado una correlación estadística entre ploidía y tipo histológico, siendo los casos de histología favorable mayoritariamente diploides, mientras los casos con anaplasia son aneuploides (Schmidt, 1986; Kumar, 1989); sin embargo, no se ha demostrado que la ploidía aporte información pronóstica suplementaria a la obtenida del tipo histológico. En el **tumor neuroectodérmico periférico** los pocos ejemplos estudiados por citometría son mayoritariamente diploides (Molenaar, 1988) y la ploidía no parece contribuir de manera importante a establecer el pronóstico (Swanson, 1992).

#### **1.2.2.1.4.- PLOIDÍA EN LOS RABDOMIOSARCOMAS.**

El carácter heterogéneo del **RMS**, tanto desde el punto de vista histológico como clínico, es un hecho que desconcierta a patólogos y clínicos desde hace mucho tiempo. No es extraño pues, que en los últimos años se investigue también la influencia de la ploidía y la actividad proliferativa en este tumor. La determinación de la ploidía en el RMS pretende principalmente aclarar la heterogeneidad biológica y pronóstica de esta neoplasia (Shapiro, 1991). El método básico para el diagnóstico del RMS es el estudio histopatológico del

tejido neoplásico. Durante años la clasificación histológica, junto a otros factores pronósticos clínicos, han sido determinantes a la hora de instaurar el tratamiento. Sin embargo, aún sumando todos estos parámetros clásicos, no se puede realizar una predicción pronóstica razonablemente segura en los RMSs; de ahí surge la necesidad de encontrar otros factores pronósticos adicionales en estos tumores.

Los estudios de ploidía en el RMS no son muy abundantes, y los resultados de los trabajos más antiguos o con series más reducidas han sido contradictorios (Boyle, 1988; Molenaar, 1988; Kowal-Vern, 1990; Leuschner, 1991; Dias, 1992; El Naggar, 1993; Kilpatrick, 1994) (Tabla I-XV). En las series más antiguas se identificaron dos grupos fundamentales de RMSs en función del contenido de ADN: diploides y aneuploides, y se sugirió la escasa utilidad pronóstica de esta técnica debido al porcentaje tan elevado de aneuploidía (Boyle, 1988; Molenaar, 1988), o bien a la gran heterogeneidad clínica e histológica de las series (Kowal-Vern, 1990, Leuschner, 1991; Dias, 1992; El Naggar, 1993; Kilpatrick, 1994). En los últimos años, trabajos más amplios han intentado determinar la susceptibilidad de la célula neoplásica a la quimioterapia (Shapiro, 1991; Pappo, 1993; Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997), en función de su contenido de ADN, de forma similar a lo realizado en el neuroblastoma.

En este sentido han sido importantes los estudios de Shapiro (Shapiro, 1991; Pappo, 1993) que demostraron una estrecha relación entre contenido de ADN, tipo histológico y pronóstico en el RMS infantil, observando que los tumores embrionarios son mayoritariamente hiperdiploides (DI comprendido entre 1.10 y 1.80); mientras que un

contenido de ADN casi-tetraploide (DI comprendido entre 1.80 y 2.60) estaba fuertemente asociado al patrón histológico alveolar. Además, demostraron que la ploidía era la variable que mejor predecía la respuesta a la quimioterapia, siendo máxima en los tumores hiperdiploides, intermedia en los tetraploides y mínima en los diploides.

En un trabajo posterior (Wijnaendts,1993), que incluye 70 RMSs infantiles se analiza, con estudio estadístico multivariable, el papel de la ploidía en la supervivencia y se confirma su valor pronóstico pero no su relación con el tipo histológico. En dos trabajos posteriores (Niggli, 1994; De Zen, 1997) se demuestra el valor pronóstico independiente del contenido de ADN en la supervivencia y en el ILE del RMS, de forma que la hiperdiploidía parece conferir el mejor pronóstico y la diploidía el peor (tabla I-XV).

Según estos estudios la ploidía aportaría una valiosa información para predecir la efectividad del tratamiento y plantear estrategias terapéuticas más o menos agresivas; ajustadas a las características de cada tumor. Se supone que la mala respuesta a la quimioterapia en los casos diploides, se debe a la baja proporción de células en proliferación (fase-S) (Shapiro, 1991).

Por otra parte, la no-disyunción cromosómica y la endoreduplicación constituyen las alteraciones genéticas más comunes encontradas en los RMSs embrionarios y alveolares respectivamente, habiéndose relacionado estas aberraciones moleculares con la hiperdiploidía de los primeros y la casi-tetraploidía de los segundos (Shapiro, 1991).

Autor/ Año	Nº casos	Estadio/T. Histológico	Edad Años	CMF/ CME	F. pronósticos (univariable)	F. pronósticos (multivariable)	Relación estadística de la ploidía con otros parámetros
Boyle/ 1988	13	I-IV /todos	<1-11	CMF	-	-	-
Molenaar /1988	11	I-IV/ todos	2-23	CMF	-	-	-
Leuschner/ 1991	66	I-IV/todos	-	CMF	-	-	-
Kowal-Vern/ 1990	23	I-IV/ todos	<1-18	CMF/ CME	Estadio	-	Estadio
Dias/ 1992	?	I-IV/todos	Todos	CMF	-	-	-
Shapiro /1991	37	III-IV/ todos	<1-20	CMF	Ploidía	Ploidía	Tipo histológico
Wijnaendts/ 1993	70	I-IV/ todos	<1-22	CMF	Ploidía Localización Estadio T. histológico	Ploidía	Localización
El-Naggar / 1993	13	I-III/ todos	18-77	CMF	-	-	-
Pappo /1993	34	III/ Embrionario	<1-18	CMF	Ploidía	Ploidía	-
Niggli /1994	81	I-IV/Todos	<1-20	CMF	Estadio Ploidía Fase S Localización Tamaño	Ploidía Estadio Fase S	Fase S
Kilpatrick /1994	26	I-IV/Todos	<1-27	CMF/C ME	Sexo Edad Estadio	Edad Estadio	T. histológico
De Zen / 1997	59	I-IV/Todos	<1-25	CMF	Ploidía IPC	Ploidía	Localización T. histológico IPC

Tabla I. XV. La ploidía como factor pronóstico en el RMS. Series publicadas en la literatura.

### **1.2.2.2.- ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR**

La actividad proliferativa y su influencia en la conducta biológica de las neoplasias humanas se ha estudiado repetidamente en gran variedad de tumores, pero en los sarcomas, y en particular en el RMS, todavía se conoce de modo insuficiente (Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997; Noguchi, 1997).

El método más tradicional y simple de medir la actividad proliferativa es el recuento de figuras mitóticas en el corte histológico, trabajo arduo y lento (Burger, 1986; Ellison, 1987), además de ser un método subjetivo e incompleto (Woosley, 1991; Linden, 1992) ya que valora únicamente la parte visible del ciclo celular.

Otro procedimiento empleado para el estudio de la actividad proliferativa consiste en determinar la fracción celular en **fase-S** mediante CMF, que se ha convertido en un método muy extendido en patología tumoral humana, demostrándose una importante asociación entre la presencia de una alta fracción celular en fase-S y un peor pronóstico en muchas neoplasias (Kimura,1991; Lerma,1994). Sin embargo, la CMF presenta deficiente resolución para determinar la fase S de los tumores aneuploides y aunque hay programas matemáticos desarrollados para obtenerla, todavía no se ha conseguido una homogeneidad en el método; además la CMF es una técnica cara y exige una metodología compleja, por lo que en la cuantificación de la actividad proliferativa está siendo sustituida por las modernas técnicas de inmunohistoquímica (Woosley, 1992; Linden, 1992).

Para la detección mediante IHQ de antígenos nucleares asociados a la proliferación celular, se han empleado distintos marcadores monoclonales: **Ki-67** (Gerdes, 1984) (congelación), antígeno nuclear de proliferación celular (**PCNA**) (Bravo, 1980; Morris,

1989; McCormick, 1992) y **MIB-1** (McCormick (A), 1993; McCormick (B), 1993) (parafina).

El primer marcador IHQ empleado utilizaba el anticuerpo (Ac) PC10 que detecta el antígeno (Ag) nuclear de proliferación celular **PCNA**, que es una proteína nuclear no histona, cofactor de la DNA polimerasa, y se marca con mayor intensidad en la fase S y con intensidad variable en las fases G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y M, lo que dificulta su correcta cuantificación (Woods, 1991; Filipe, 1993). Por otra parte, la determinación de PCNA no discrimina entre células con una fase S lenta o rápida, debido a la larga vida media de esta proteína, de ahí que en general, la fracción de núcleos positivos usando este marcador sea mayor que la fase S detectada con CMF (Yu, 1991). El marcador de proliferación más estudiado ha sido el que utiliza el Ac monoclonal **Ki-67**, que detecta una proteína no histona, presente en todas las fases del ciclo celular excepto en las fases G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub> temprana (Brown, 1990; Gerdes, 1991; Linden, 1992), pero tenía la desventaja frente al PCNA de que sólo funcionaba sobre tejido fresco. La utilización de un nuevo Ac monoclonal, el **MIB-1**, que reacciona con el mismo epítipo antigénico que el Ki-67, pero mantiene su actividad en tejidos fijados con formol (Cattoretti, 1992; Key, 1993), ha resuelto este problema. El Ac monoclonal MIB-1 marca todos los núcleos con la misma uniformidad (McCormick (A), 1993; Kreipe 1993) y es actualmente el método de elección para determinar la actividad proliferativa de tejidos incluidos en parafina pues su expresión es más estable que la de PCNA y menos sensible que ésta a variaciones en el tiempo de fijación y otras circunstancias relacionadas con el procesamiento del tejido en parafina (Rose, 1994; Keshgegian, 1995).

La cuantificación de la actividad proliferativa del tumor una vez realizada la inmunotinción

con el marcador de proliferación, se puede realizar de diferentes formas: el método más simple es la evaluación visual aproximada de la reactividad de la inmunotinción estableciendo un grado (elevado o bajo; elevado, medio o bajo, etc) o bien el conteo visual de núcleos positivos obteniendo un porcentaje o índice. El conteo automático por análisis de imagen es el método de elección siempre que se cuente con el equipo técnico necesario. De esta forma se mejora la exactitud de la medición al evaluar un gran número de núcleos de forma rápida y precisa (Carrillo, 1997).

### **I.2.2.2.1.- ACTIVIDAD PROLIFERATIVA EN LOS RABDOMIOSARCOMAS.**

El efecto de la actividad proliferativa tumoral en la progresión de la enfermedad o el pronóstico, se ha estudiado escasamente en los tumores de partes blandas (Ueda, 1989; Zehr, 1990; Oda, 1993; Niggli, 1994; Michie, 1994; Oshiro, 1995; Amada, 1995;) y en concreto en el RMS (Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997; Noguchi, 1997) (Tabla I-XV).

<b>Estudios</b>	<b>F. pronóstico</b>	<b>Técnica</b>	<b>Asociación a otros factores</b>
Wijnaendts /1993	Si	Fase-S	-
Niggli /1994	Si	Fase-S	Tipo histológico
De Zen /1997	Si	Fase-S	Ploidía Tipo histológico
Noguchi/1997	No	MIB-1	-

**Tabla I-XV. Estudios previos sobre el valor pronóstico de la actividad proliferativa en el RMS.**

Algunos estudios con RMS han demostrado una relación estadística entre la fracción celular en fase S determinada por CMF y el pronóstico de los pacientes (Wijnaendts, 1993;

Niggli, 1994; De Zen, 1997). En estos trabajos, se han podido establecer de forma clara dos categorías pronósticas de acuerdo al porcentaje de células en fase-S: bajo (0-14%) con evolución favorable y alto (>14%) con evolución desfavorable. Además, el porcentaje de células en fase-S se relaciona estadísticamente con el tipo histológico (Niggli, 1994; De Zen, 1997) y la ploidía (De Zen, 1997) en el RMS. El más alto grado de proliferación celular fue encontrado en los RMSs alveolares (Niggli, 1994; De Zen, 1997) y los RMS diploides o tetraploides (De Zen, 1997).

Solamente un estudio (Noguchi, 1997) ha investigado la actividad proliferativa en los RMSs utilizando el Ac monoclonal MIB-1. En este estudio el IPC se obtuvo por contaje visual y no se observó relación estadística de la actividad proliferativa con la supervivencia y su posible relación con el ILE no se investigó. El valor pronóstico de la determinación del IPC mediante cuantificación de Ag de proliferación está todavía por determinar en series más amplias de RMS.

## **II.- OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN**

## **II.- OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.**

Los RMSs son tumores poco frecuentes y extremadamente variables clínica e histológicamente. La supervivencia en el RMS infantil ha mejorado considerablemente con el empleo de tratamientos combinados, pero todavía existe un porcentaje alto de recidivas y casos fatales. Las características clínicas e histopatológicas no permiten prever la evolución clínica de una forma tan ajustada como sería deseable.

Por otra parte, en el diagnóstico histopatológico de estas neoplasias persisten en la actualidad problemas derivados de la diversidad de clasificaciones histológicas que existen, así como de la semejanza morfológica entre tumores con pronóstico diferente.

Estas circunstancias han favorecido la búsqueda de nuevos factores pronósticos predictivos que permitan seleccionar la estrategia terapéutica a seguir en cada caso, y así aumentar la supervivencia y disminuir las secuelas físicas y funcionales de los enfermos.

Nuestro estudio se centra en recopilar y revisar desde un punto de vista clínico-patológico una serie de RMSs y determinar el valor pronóstico de los factores clínicos e histológicos convencionales, comparándolo con el de dos posibles nuevos factores, la ploidía y el IPC. Dentro de este marco de trabajo, los objetivos concretos de la presente tesis han sido:

- 1.- Determinar el valor pronóstico que tienen en nuestra serie los factores clínicos **edad, sexo, localización y estadio clínico**, mediante estudio estadístico de su relación con la **supervivencia y con el periodo libre de enfermedad.**
- 2.- Revisar la actual **clasificación histológica** de los RMSs y analizar su valor pronóstico en nuestra serie, mediante estudio estadístico de su relación con la **supervivencia y con el periodo libre de enfermedad**

- 3.- Determinar el valor pronóstico de la **ploidía y el IPC** en nuestra serie, analizando su relación estadística con la **supervivencia y con el periodo libre de enfermedad**.
  
- 4.- Establecer si la **ploidía y el IPC son factores pronósticos independientes**. Si aportan información pronóstica suplementaria de la obtenida con los factores pronósticos clásicos. Para ello, se ha realizado un estudio estadístico multivariable comparando estos dos factores con los restantes parámetros clínicopatológicos analizados.

### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **III.1. MATERIAL.**

##### **III.1.1.- SELECCIÓN DEL MATERIAL.**

El estudio retrospectivo se realizó en pacientes diagnosticados de RMS en los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal de la Universidad de Alcalá de Henares (25 casos) y del Hospital 12 de Octubre de la Universidad Complutense de Madrid (20 casos).

Se han incluido en el estudio 45 RMSs infantiles, diagnosticados desde Enero de 1979 hasta Diciembre de 1997, con seguimiento clínico hasta Marzo de 1998. La supervivencia y el ILE se calcularon desde la fecha de diagnóstico hasta el momento del éxitus o cierre del estudio. Todos los enfermos fueron tratados según el protocolo terapéutico de la SIOP vigente en el momento del diagnóstico.

##### **III.1.2. CRITERIOS DE SELECCIÓN.**

Todos los casos seleccionados cumplieron los criterios que a continuación se exponen:

- ① Corresponder a pacientes menores de 22 años con el diagnóstico de RMS.
- ② Disponer de muestras de tejido neoplásico fijadas en formol e incluidas en parafina.
- ③ Obtener de este material un histograma válido del contenido de ADN de los núcleos tumorales.
- ④ Disponer de una historia clínica completa.

## **III. 2. MÉTODOS.**

### **III. 2. 1. REVISIÓN CLÍNICA.**

Para la revisión clínica se ha seguido un protocolo retrospectivo que recoge los siguientes parámetros:

- EDAD EN EL MOMENTO DEL DIAGNÓSTICO.
- SEXO.
- LOCALIZACIÓN. Para la valoración estadística, la localización de los tumores se dividió en dos grandes grupos pronósticos: favorable y desfavorable, según los criterios empleados por el IRS (Raney 1981, Gehan 1981, Sutow 1970) y aceptados por el INC (Tsokos 1992) (Tabla I-IX).
- ESTADIO. La clasificación de los pacientes por estadios se realizó según el sistema propuesto por el IRS (Maurer 1975 y Lawrence 1987), que es una adaptación de la clasificación TNM. En todos los casos se evaluó el estadio clínico en el momento del diagnóstico y cuando ingresaron en el Hospital Ramón y Cajal ó 12 de Octubre. Para el estudio estadístico se tuvo en cuenta el estadio inicial en el momento del diagnóstico, aunque este diagnóstico se realizara en otro centro hospitalario. Los casos clasificados en las historias clínicas según el sistema TNM, se transformaron en la seguida por el IRS según la correlación reflejada en la tabla III-I, que fue la empleada en el estudio estadístico.

IRS	T	N	M
Estadio I	T1a, T1b	N0, Nx	M0
Estadio II	T2a, Tab	N0, Nx	M0
Estadio III	Cualquier T	N1	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

**Tabla III-I. Correlación entre los sistemas de estadios clínicos del IRS y TNM.**

- **TAMAÑO.** La valoración del tamaño, en los casos extirpados quirúrgicamente, fue siempre macroscópica, referida en tres dimensiones y en cms. El tamaño de los tumores no extirpados se valoró con las técnicas de imagen, siempre que fue posible.
- **TRATAMIENTO.** Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron tratados siguiendo las estrategias terapéuticas de la SIOP vigentes en el momento del diagnóstico en función de la localización, estadio y tipo histológico del RMS.
- **EVOLUCIÓN.** La fuente de obtención de datos fue la historia clínica. Se actualizaron hasta Marzo de 1998 por entrevista personal con el equipo médico que trataba al enfermo o mediante contacto telefónico con la familia, siempre que fue necesario. La evolución clínica del enfermo se clasificó en uno de los siguientes apartados según la información más actualizada:
  - vivo sin evidencia de enfermedad.
  - vivo con recidiva locoregional o metástasis.
  - muerto por el tumor.
  - muerto por otras causas.

Además, se ha valorado el ILE considerando como tal el periodo de tiempo transcurrido desde el tratamiento curativo hasta la detección de la primera recidiva local, regional o metastásica.

### **III.2.2.- REVISIÓN HISTOLÓGICA.**

Se realizó la revisión histológica y confirmación del diagnóstico inicial de todos los casos utilizando todas las secciones de parafina de las que se disponía en cada caso teñidas con hematoxilina-eosina (H&E). La diferenciación muscular fue comprobada en los casos necesarios mediante técnicas de IHQ. El subtipo histológico se determinó siguiendo la nueva clasificación internacional (tabla I-VII) (Newton 1995).

Para el estudio estadístico se agruparon en dos grandes grupos, separando los RMSs embrionarios, incluyendo los tipos botrioide y de células fusiformes, de los alveolares. Aquellos casos en los que se apreciaban los dos tipos histológicos (embrionario y alveolar), se consideraron tumores alveolares, fuera cual fuera la proporción representada por cada tipo, de acuerdo a los criterios de la nueva clasificación internacional (Newton, 1995).

### **III.2.3.- DETERMINACIÓN DE LA PLOIDIA.**

El estudio de la ploidía se realizó por CME sobre material incluido en parafina. Para ello se eligió un bloque representativo de cada tumor y se procedió a la obtención y preparación de los núcleos según los siguientes apartados:

**III.2.3.1.- OBTENCIÓN DEL MATERIAL:** El contenido de ADN de cada tumor se determinó mediante análisis de núcleos enteros obtenidos de los bloques de parafina según la técnica de Hedley modificada (Hedley, 1983). En cada caso se seleccionó un bloque de parafina representativo del tumor y en los casos necesarios se desecharon áreas hemorrágicas o las que contenían excesivo tejido no tumoral.

➤ **Extracción de núcleos a partir de bloques de parafina (técnica de Hedley).** Consta de los siguientes pasos:

- ❑ Cortar a temperatura ambiente dos o más secciones de 50  $\mu$  de cada bloque y colocar en el fondo de un tubo de ensayos el tejido recogido cuidadosamente del borde de la cuchilla.
- ❑ Hacer un corte para H&E después de los cortes de 50  $\mu$  para control morfológico de la muestra.
- ❑ Desparafinar y rehidratar el tejido según el siguiente esquema:
  - 1.- Xilol o sustituto y cambiar 3 veces con intervalos de 15 minutos.  
Agitar enérgicamente el tubo durante todo este tiempo.
  - 2.- Alcohol absoluto 2 veces, 10 minutos y agitar.
  - 3.- Alcohol de 95 grados 2 veces, 10 minutos y agitar.
  - 4.- Alcohol de 80 grados 1 vez, 10 minutos y agitar.
  - 5.- Alcohol de 70 grados 1 vez, 10 minutos y agitar.
  - 6.- Alcohol de 50 grados 1 vez, se deja toda la noche y se cubren los tubos.
- ❑ Rehidratar, tratar con enzimas proteolíticas y filtrar para obtener las suspensiones nucleares según el siguiente esquema:

- 1.- Rehidratar dos veces en DPBS centrifugando durante 10 minutos a 1.500 revoluciones por minuto (rpm) a 4 grados centígrados (C°).
- 2.- Absorber el PBDS lo más posible y añadir de 2.5 a 3 ml. de pepsina a temperatura ambiente.
- 3.- Incubar en pepsina (pepsina al 0.5% en agua destilada con 5.5% de CIH 1 normal (N), llevando el pH a 1.5 con el CIH 1N) durante 20-40 minutos en baño a 37 grados C°.
- 4.- Separar mecánicamente las células del tejido aspirando y expulsando varias veces el contenido del tubo con una pipeta Pasteur.
- 5.- Colocar los tubos sobre hielo picado para detener la digestión.
- 6.- Lavar con DPBS una vez y centrifugar después.
- 7.- Añadir 2cc de DPBS y filtrar a través de un filtro milipore con poros de 32-37 micras en un tubo limpio.

**Preparación de extensiones citológicas.** De las suspensiones nucleares obtenidas se extraen 200 lambdas ( $\lambda$ ), y se realizan extensiones citológicas mediante citocentrífuga durante 5 minutos a 1700 r.p.m. Las extensiones se fijan en formol tamponado al 10% durante 30 minutos y se dejan secar al aire para posteriormente proceder a la tinción de Feulgen.

### **III.2.3.2.- TINCIÓN DE FEULGEN.**

#### **➤ Preparación del reactivo.**

- **Soluciones ácidas.**

- Clorhídrico 5N (para la hidrólisis): Añadir 431 ml. de ácido clorhídrico concentrado (35%) a 569 ml de agua destilada.

- Clorhídrico 0.1N (para preparar el reactivo de tinción): Añadir 2 ml de clorhídrico 5N a 98 ml de agua destilada.
  - Clorhídrico 0.05N (para preparar el reactivo de lavado): Añadir 3 mls de clorhídrico 5N a 297 ml de agua destilada.
  - **Solución de tinción.** En un Erlenmeyer de 125 ml poner 100 ml de clorhídrico 0.1N y añadir el contenido de un frasco de reactivo de tinción. Tapar herméticamente y agitar hasta su perfecta disolución durante una hora al menos. Al cabo de dicho tiempo filtrar cuidadosamente y lo más rápidamente posible. Debe usarse inmediatamente y desecharse al final de la tinción.
  - **Solución de lavado.** Poner 300 ml de clorhídrico 0.05N en un Erlenmeyer de 500 ml y añadir el contenido de un frasco de reactivo de lavado. Tapar herméticamente y agitar hasta su perfecta disolución. Mantener tapado hasta su utilización. Una vez preparado este reactivo es estable durante dos o tres horas. Tirar después de su utilización.
- **Técnica de Feulgen.** Se han utilizado los reactivos de tinción y lavado preparados por Bekton Dickinson®. La tinción se realizó según el siguiente esquema.
- Preparar los reactivos.
  - Colocar los portas con la muestra en ácido clorhídrico 5N e hidrolizar durante 60 minutos.
  - Sin lavar, teñir las preparaciones en el reactivo de tinción, en un recipiente tapado herméticamente y agitando muy a menudo durante 60 minutos. Preparar durante este tiempo el reactivo de lavado.

- Colocar en tres Coplin distintos 100 ml de la solución de lavado de cada uno. Pasar sin lavar la preparación al primer Coplin durante 30 segundos. Pasar entonces los cristales al segundo Coplin y lavar durante 5 minutos.
- Finalmente, pasar las preparaciones al tercer Coplin antes y durante el lavado deben permanecer tapados.
- Lavar las preparaciones en agua destilada durante 5 minutos. Cambiar el agua durante otros 5 minutos.
- Colocar las preparaciones en una solución de ácido clorhídrico al 1% en alcohol de 70° y lavar durante 5 minutos.
- Directamente desde el alcohol ácido, deshidratar las preparaciones en alcohol absoluto durante 6 minutos en dos cambios de 3 minutos cada uno.
- Aclarar en xilol en dos cambios de tres minutos cada uno.
- Montar en DePex ® según técnicas habituales.

### **III.2.3.3.- ANALIZADOR DE IMAGEN.**

El análisis de la ploidía se realizó utilizando un **sistema computerizado de análisis de imagen**. Un analizador de imagen es un sistema que incorpora a un microscopio óptico un sistema “Hardware” (ordenador, pantalla, teclado e impresora), diseñado para aceptar programas específicos de “Software” que facilitan la medida, cuantificación y análisis de parámetros histológicos y celulares por medio de la densitometría y el análisis estadístico.

El analizador de imagen (“Hardware”) **CAS 200 ®** (Fig. III-1) consta de:

- **Microscopio óptico** modificado, al incorporar dos cámaras de televisión que producen señales en función de la longitud de onda que trasmite el microscopio al observar las muestras.

- **Ordenador** con una memoria interna de 4 Mbytes y disco duro de 80 Mbytes, con un paquete informático de “software” IBM ® de análisis celular.
- Dos **monitores** en color: un sistema de control y selección y otro de reproducción.
- **Impresora** con capacidad para gráficos.

Este analizador de imagen pertenece a la última generación de sistemas informáticos adaptados al trabajo con microscopía óptica y su utilidad principal es la de cuantificar objetivamente datos morfológicos que tradicionalmente sólo se podía estudiar de modo subjetivo.

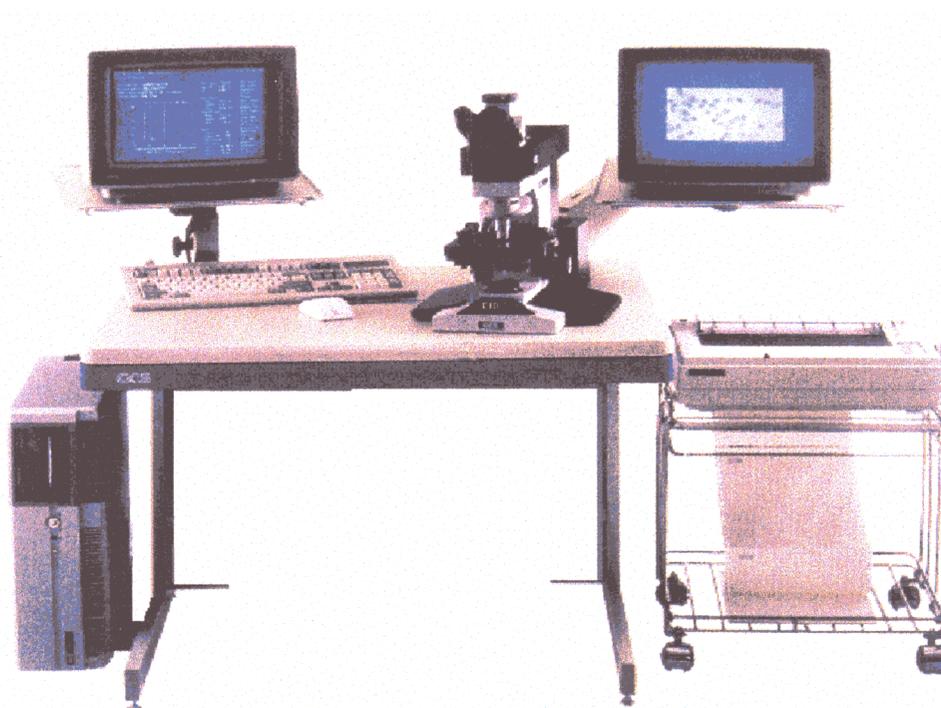


Fig III-1.- Sistema CAS® 200 para análisis de imagen.

El equipo CAS-200 ® puede analizar multitud de parámetros morfológicos y en este trabajo hemos empleado:

- El programa de análisis de ADN. “Quantitative DNA Analysis”.

- El programa de proliferación celular. "Quantitative proliferation index".

#### **III.2.3.4.- PROGRAMA DE DETERMINACIÓN DE LA PLOIDÍA.**

La cuantificación citofotométrica del ADN se realizó en el analizador de imágenes CAS-200 ®, con el programa "Quantitative DNA Analysis". En cada tumor se ha determinado el contenido de ADN en más de 150 núcleos de células tumorales. Como control interno diploide se ha valorado el ADN nuclear de al menos 20 linfocitos, polimorfonucleares o células estromales. Como control externo se han utilizado hepatocitos de rata preparados por la casa Becton-Dikinson ® en portas de calibración (Fig III-2). Sobre estos portas conteniendo el control externo se depositó la muestra de núcleos de cada tumor y de esta forma se aseguró que los núcleos control y los de cada muestra han sido sometidos a las mismas condiciones durante la tinción.

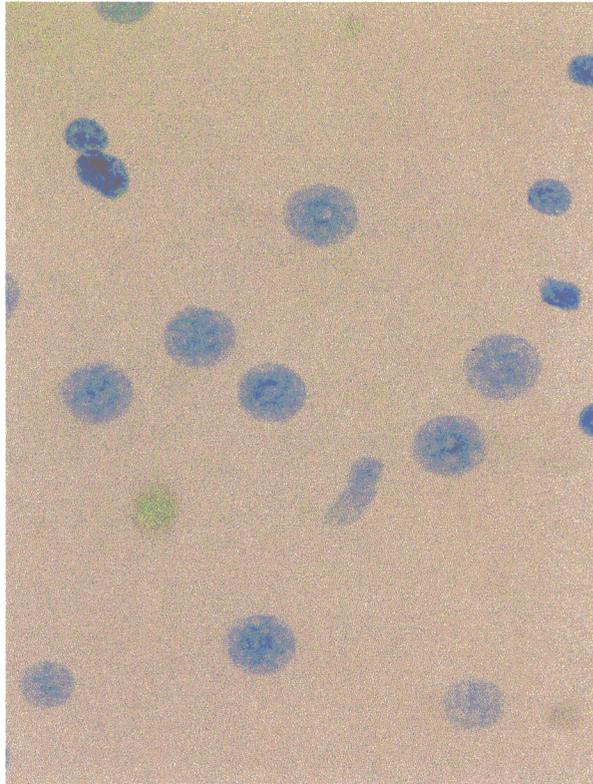


Fig III-2.- Técnica de Feulgen. A: Control de hepatocitos de rata.

Antes de medir los núcleos tumorales, es necesario establecer un control externo midiendo al menos 20 núcleos del control, lo que asegura que la tinción realizada está en condiciones óptimas. El coeficiente de variación de este control externo no superó en ningún caso el 3%. La medida de los núcleos de la muestra se realiza por un método semiautomático interactivo que permite al observador despreciar núcleos en mal estado fragmentados o conglomerados nucleares (Fig III-3). El programa transforma automáticamente las medidas de densidad óptica, que obtiene el densitómetro, en picogramos de ADN y así se consiguió directamente un histograma que representa el contenido de ADN de los núcleos analizados. También, se obtiene automáticamente el índice de ADN (DI) de los núcleos, resultado de dividir el contenido de ADN de un núcleo neoplásico por el contenido de ADN de un núcleo diploide (7.18 pgr. en el ser humano).

Siguiendo normas generalmente admitidas (Leader, 1994) los histogramas fueron clasificados de acuerdo al DI de la población tumoral predominante y la distribución de los valores, de la siguiente forma:**DIPLOIDES: Tumores en los que el DI de la población tumoral está situado en el intervalo 0,8 y 1,12.**

- **HIPERDIPLOIDES:** Tumores en los que el DI de la población tumoral está situado entre 1,13 y 1,79.
- **TETRAPLOIDES:** Tumores en los que el DI de la población tumoral esta comprendido entre 1,80 y 2,12, siempre que dicha población suponga más del 20% de los núcleos.
- **POLIPLOIDES:** Tumores en los que aparece más de una población tumoral no diploide.

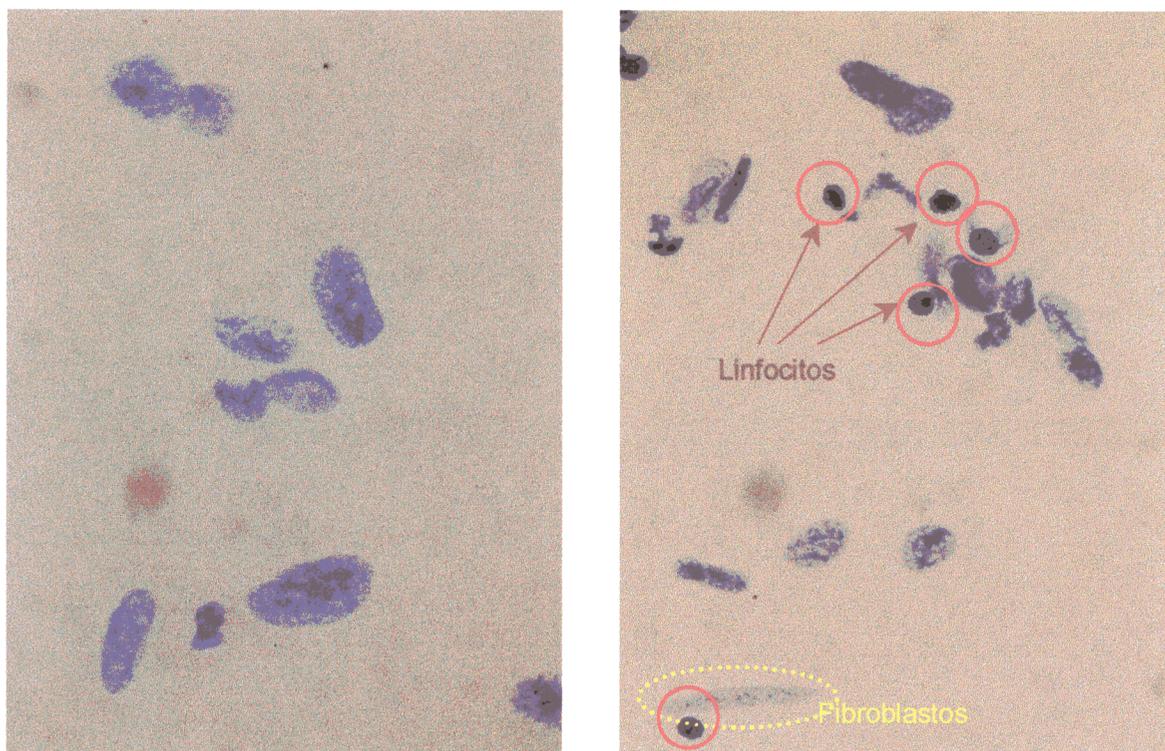


Fig III-3.- Técnica de Feulgen. A.-Ejemplo de los núcleos obtenidos en un RMS alveolar los núcleos son grandes e irregulares. B.- Ejemplo de los núcleos obtenidos en un RMS embrionario, junto a los núcleos tumorales que son ovalados o redondos aparecen núcleos del control interno : linfocitos y fibroblastos.

#### III.2.4.-DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA.

Para la cuantificación de la fracción de crecimiento de la neoplasia se utilizó el Ac monoclonal **MIB-1** de Immunotech® que reacciona con el Ag nuclear Ki-67 asociado a la proliferación nuclear y al desarrollo del ciclo celular (fase G<sub>1</sub> tardía, S, G<sub>2</sub> y M) y ausente en la fase de reposo nuclear (G<sub>0</sub>) y fase G<sub>1</sub> temprana.

##### III.2.4.1. TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA.

La técnica IHQ se realizó sobre secciones tratadas previamente a la inmunotinción, para

facilitar el acceso de los anticuerpos a los antígenos tisulares. En la mayoría de los casos y siempre que fue posible, se utilizó el mismo bloque de parafina que para la determinación del ADN. Se utilizó un método no enzimático (Shi 1991, Mckee 1993) de desenmascaramiento de antígenos, que consiste en calentar las preparaciones en un horno microondas sumergidas en un tampón 0,01 M de citrato sódico a pH 6, durante un tiempo de 10 a 30 minutos.

Se empleó la técnica del complejo avidina-biotina (ABC) (Cattoreti 1988). Las secciones de parafina se montaron sobre portas tratados con poli-L-lisina, siendo desparafinadas y rehidratadas en alcohol. Con objeto de inhibir la peroxidasa endógena, las secciones se incubaron en una solución fresca de metanol al 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10-15 minutos, en cámara húmeda. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario diluido adecuadamente en tampón tris-salino (TBS) durante 30 minutos, se lavaron con TBS durante 5 minutos y se cubrieron con el complejo estrepto avidina-biotina, marcado con peroxidasa (Strep AB HRP) diluido al 1/250. Tras un nuevo lavado con TBS durante 5 minutos, se incubaron en una solución de fast red (Sigma®) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, tras un último lavado con TBS durante 5 minutos se contrastaron con hematoxilina de Mayer durante 2-5 minutos y se procedió al lavado con agua y diferenciación con alcohol para luego deshidratar, clarificar y montar.

#### **III.2.4.1.- PROGRAMA DE PROLIFERACIÓN NUCLEAR.**

Antes de proceder a la cuantificación del índice de proliferación celular, se valoró en todos

los casos la calidad de la técnica IHQ y se seleccionaron las áreas con más cantidad de núcleos por campo y mayor actividad proliferativa (“áreas calientes”), evitando mediciones en áreas periféricas, zonas desvitalizadas, con necrosis o artefactos.

El analizador de imagen CAS-200 ® valora la actividad proliferativa en el programa de índice de proliferación (“Quantitative proliferation index”). En este programa se selecciona la opción de cuantificación sobre improntas, extensiones o cortes histológicos y antes de iniciar la medición se calibran las cámaras y el analizador, ajustando los sensores de las dos cámaras incorporadas al microscopio. Este paso se lleva a cabo con el objetivo enfocado en un área libre de tejido.

Finalizados estos ajustes se procede a cuantificar la actividad proliferativa de las células parenquimatosas neoplásicas. El programa calcula automáticamente el área nuclear positiva en relación con el área nuclear total, expresando el resultado en tantos por ciento. En cada tumor se han medido como mínimo 1500 células. Para la valoración estadística, el IPC se estratificó en dos grupos, en función del punto de corte con mayor asociación estadística: IPC bajo: Menos de 19% de células positivas e IPC alto: a partir de 19% de células positivas (Lámina III-1).

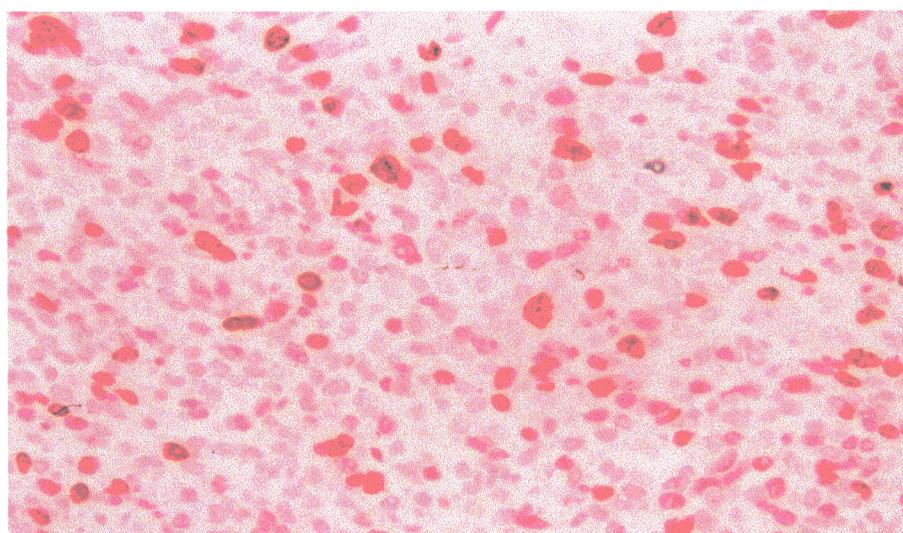
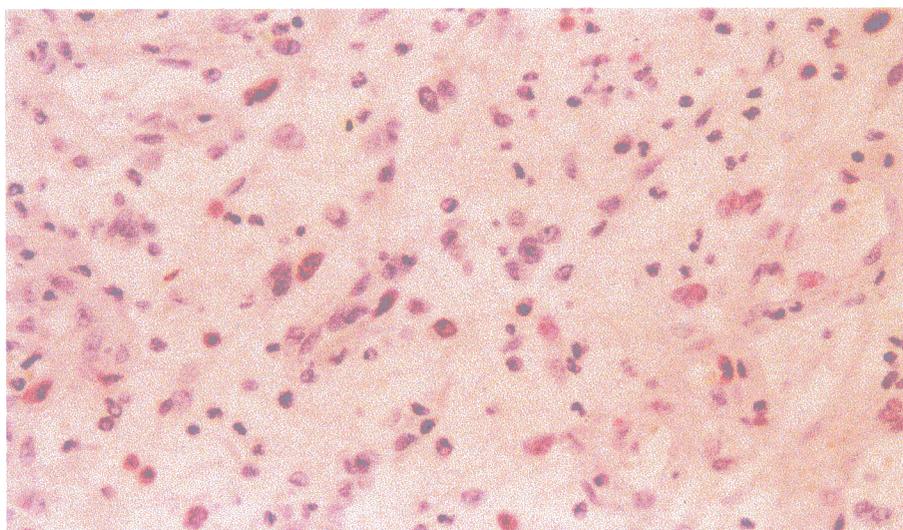


Lámina III-1.-A.Fracción de crecimiento celular. Los núcleos de las células neoplásicas muestran inmunopositividad esporádica con Ac MIB-1 (IPC<19%). B. Fracción de crecimiento celular. Los núcleos de las células neoplásicas muestran elevado porcentaje de células positivas (IPC>19%).

### **III. 3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Se elaboró un fichero de base de datos en el programa informático DBASE IV ® para recoger los resultados de las variables estudiadas. Las variables que se consideraron en cada caso fueron las siguientes:

- **Clínicas**: Edad, sexo, localización, estadio clínico, supervivencia e intervalo libre de enfermedad (ILE).
- **Histológicas**: Tipo histológico.
- **Morfométricas**: Ploidía e índice de proliferación celular (IPC).

Como medidas descriptivas, se han empleado la media, la desviación estándar y la mediana para las variables cuantitativas (edad, supervivencia, ILE, IPC) y las proporciones para las variables cualitativas (sexo, localización, estadio clínico, tipo histológico, ploidía).

La asociación entre las distintas variables se investigó mediante análisis de tablas de contingencia, prueba basada en la  $\chi^2$ . Previamente las variables fueron estratificadas de la siguiente forma:

- Edad (mayor o menor de 8 años).
- Localización (favorable o desfavorable) según criterio del IRS y el INC.
- Estadio clínico (I, II, III, IV).
- Tipo histológico (embrionario o alveolar). En el tipo embrionario se incluyeron los RMSs botrioides y de células fusiformes.
- Ploidía (diploide, hiperdiploide, tetraploide, poliploide)
- IPC (superior o inferior al 19%)

Para el punto de corte de las variables cuantitativas continuas (edad e IPC) se escogió el que mostraba mayor significación estadística con el pronóstico.

En el análisis multivariable, la influencia de las distintas variables en la supervivencia y en el intervalo libre de enfermedad se analizó por el método de Kaplan y Meier, y las diferencias se compararon con el test log-rank.

Para el análisis multivariable se utilizó el modelo de **regresión de Cox**, determinando el

riesgo relativo, su significación estadística y el intervalo de confianza. En el modelo máximo se incluyeron todas las variables que en el análisis univariable habían demostrado relación estadística con la supervivencia o con el ILE. Las variables se codificaron como en el análisis de tablas de contingencia, excepto la ploidia que se aplicó como variables “dummy”, usando la categoría diploide como referencia y la categoría diploide y poliploide se colapsaron en una sola por prueba de colinealidad.

Como estrategia de modelización se usó una “estrategia hacia atrás” y se empleó el cociente de los logaritmos de verosimilitud como estadística para comparar modelos y evaluar la bondad del ajuste (Abraira, 1996).

Por último, se empleó el paquete estadístico **PRESTA** ® (Abraira y Zaplana, 1984) y en todas las pruebas se consideró como significativo un error alfa  $<0.05$ .

## **IV.- RESULTADOS**

## IV.- RESULTADOS.

Se han estudiado 45 RMSs seguidos clínicamente durante un intervalo de tiempo que oscila entre los 5 y 172 meses (media=49.5348, DE=50.6798, mediana=52). Todos los pacientes incluidos en este estudio fueron tratados homogéneamente según el protocolo terapéutico de la SIOP vigente en el momento del diagnóstico. En la tabla IV-I se resumen las características clínicas, histológicas, citométricas e IHQ de la serie completa.

CARACTERÍSTICAS	Nº de PACIENTES	%
<b>SEXO:</b>		
➤ Hombres:	29	(64%)
➤ Mujeres:	16	(36%)
<b>LOCALIZACIÓN:</b>		
➤ Desfavorable:	28	(62%)
- Extremidades:	8	(18%)
- Retroperitoneo:	6	(13%)
- Intratorácicos:	0	
- Cabeza y cuello:	5	(11%)
- Tronco y partes blandas:	0	
- Periné:	0	
- Oído:	0	
- Senos paranasales:	9	(20%)
➤ Favorable:	17	(38%)
- Órbita:	5	(11%)
- Paratesticular:	5	(11%)
- A. gastrointestinal:	0	
- Próstata:	2	(4%)
- A. genitourinario:	5	(11%)
<b>ESTADIO:</b>		
➤ I:	9	(20%)
➤ II:	13	(29%)
➤ III:	19	(42%)
➤ IV:	4	(9%)
<b>TIPO HISTOLÓGICO:</b>		
➤ RMS botriode:	3	(7%)
➤ RMS de células fusiformes:	4	(9%)
➤ RMS embrionario:	24	(53%)
➤ RMS alveolar:	14	(31%)
<b>PLOIDÍA:</b>		
➤ Hiperdiploides:	30	(67%)
➤ Diploides:	6	(13%)
➤ Poliploides:	3	(7%)
➤ Tetraploides:	5	(11%)
➤ No valorable:	1	(2%)
<b>MIB-1:</b>		
➤ ≤ 19%:	21	(47%)
➤ > 19%:	24	(53%)

Tabla IV-I. RESULTADOS. Características globales de los RMSs.

## IV.1.- RESULTADOS CLÍNICOS.

### IV.1.1.- EDAD.

La edad de los enfermos oscila entre 1 mes y 21 años (media=9 años, DE=5,8851, mediana=8,5 años), apreciándose en nuestra serie una distribución bimodal, con un pico a los dos años y otro a los 14 (Fig IV-1).

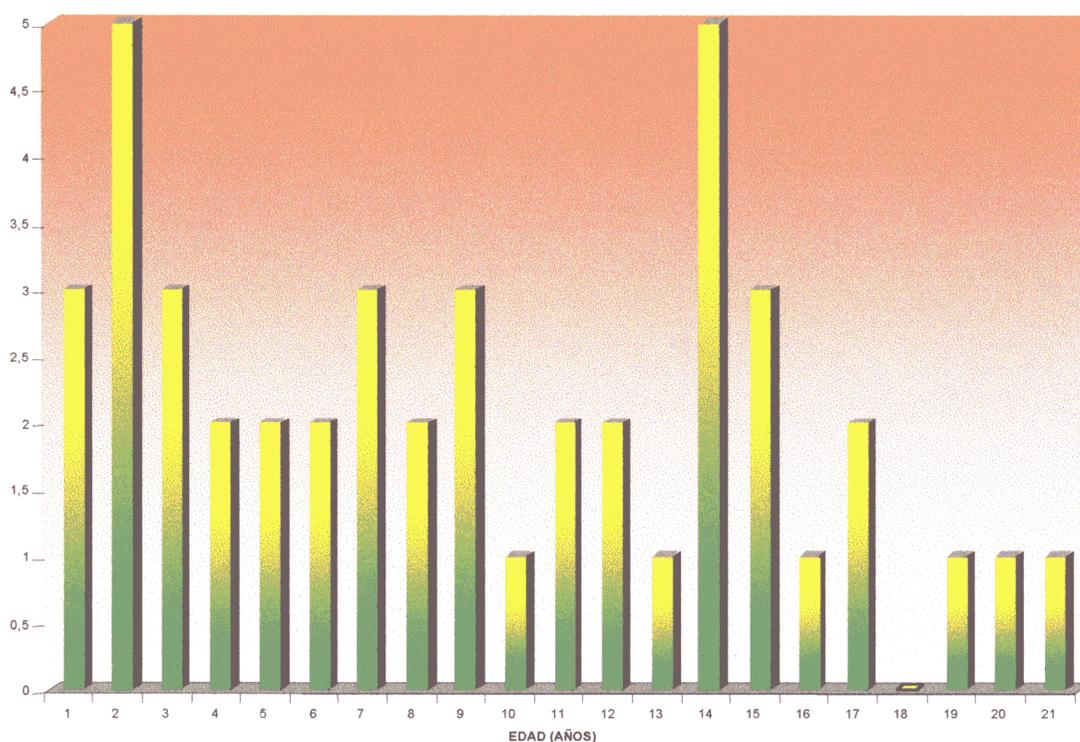
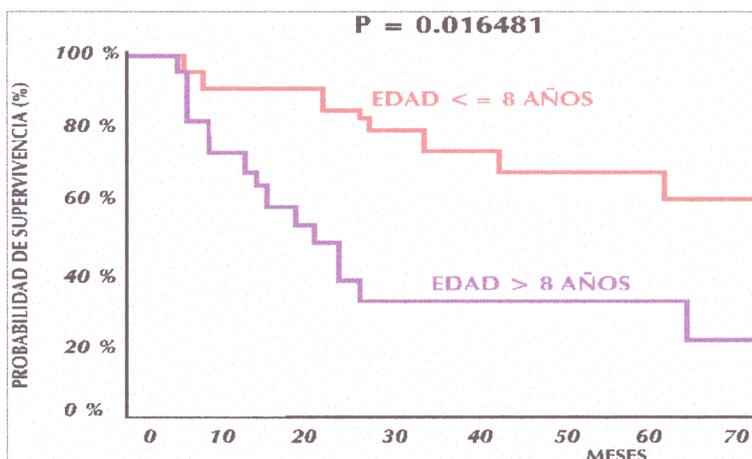


Fig IV-1. RESULTADOS. Distribución de los RMSs según la edad.

La relación estadística de las **características clínico-patológicas** de los pacientes con la edad de presentación ( $\leq 8$  años,  $> 8$  años) aparece reflejada en la tabla IV-II. Con esta estratificación se conseguía una distribución muy homogénea y el análisis estadístico puso de manifiesto la ausencia de asociación significativa entre la edad y el resto de los

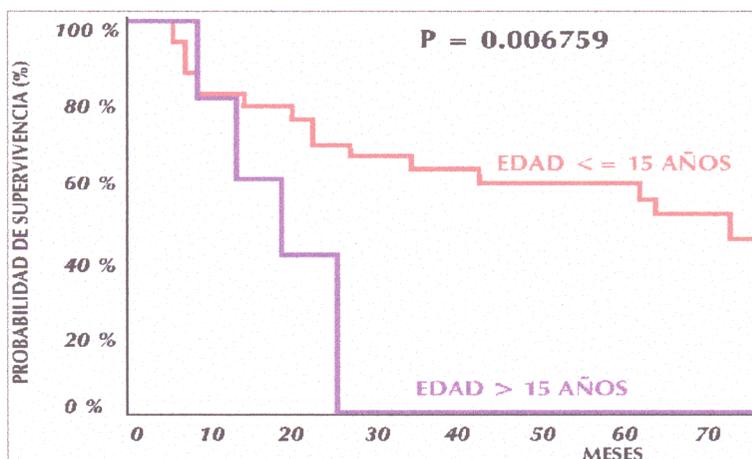
parámetros clínicos e histológicos. Tampoco se detectó asociación estadística, si estratificábamos la edad en 15 años, y a diferencia de la estratificación anterior, la distribución fue muy heterogénea (tabla IV-III). También, se intentó evaluar también la posible conexión entre la edad estratificada en tres grupos (menor de ocho años, entre 9 y 15 años ó mayor de 15 años) y los parámetros clínicopatológicos valorados en este estudio, sin embargo el exceso de estratificación no nos permitió valorar esta asociación estadística. Se detectó asociación estadística de la edad, al estratificar en 8 años, con la **supervivencia** ( $p=0.016481$ ) como aparece reflejado en la fig. IV-2. La asociación estadística con la supervivencia fue todavía más fuerte si estratificábamos la edad en 15 años ( $p=0.006759$ ) (Fig. IV-3) (Tabla IV-III); con objeto de comprobar si se observaban diferencias significativas en la supervivencia con algún grupo de edad en concreto, se estratificaron las edades en tres poblaciones: menor de ocho años, entre 9 y 15 años ó mayor de 15 años. El análisis con el test de Kaplan y Meier concluyó que la relación con la supervivencia ( $p=0.007247$ ) (Fig. IV-4) era muy semejante a cuando considerábamos la edad separando mayores o menores de 15 años, pero era superior a la asociación estadística de la supervivencia con respecto a la edad cuando el punto de corte se estableció a los 8 años ( $p=0.016481$ ) (Tabla IV-IV).

En la valoración del **ILE**, el test de Kaplan-Meier demostró la relación estadística más significativa cuando se estratificaba la edad en mayor o menor de 8 años ( $p=0.009896$ ) (Fig. IV-5). La asociación descendió al estratificar la edad en los tres grupos ya comentados ( $p=0.007247$ ) (Fig. IV-6) y desapareció la asociación al distinguir mayores o menores de 15 años (Tabla IV-IV).



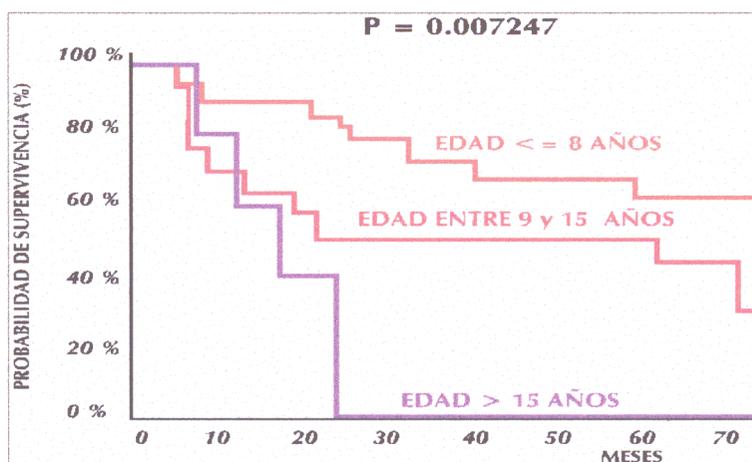
**Fig. IV-2. Supervivencia según la edad ( $\leq 8$  ó  $>$  de 8 años).**

❖ Se encuentran diferencias significativas de forma que la supervivencia es menor en niños mayores de 8 años.



**Fig. IV-3. Supervivencia según la edad ( $\leq 15$  ó  $>$  de 15 años).**

❖ Se encuentran diferencias más significativas que en el grupo anterior. La supervivencia disminuye en los niños mayores de 15 años.



**Fig. IV-4. Supervivencia según la edad (menor de 8, entre 9-15 o mayor de 15 años).**

❖ Se encuentran diferencias significativas: la supervivencia disminuye progresivamente desde los niños mayores de 8 años, a los comprendidos entre 9 y 15 años a los mayores de 15 años.

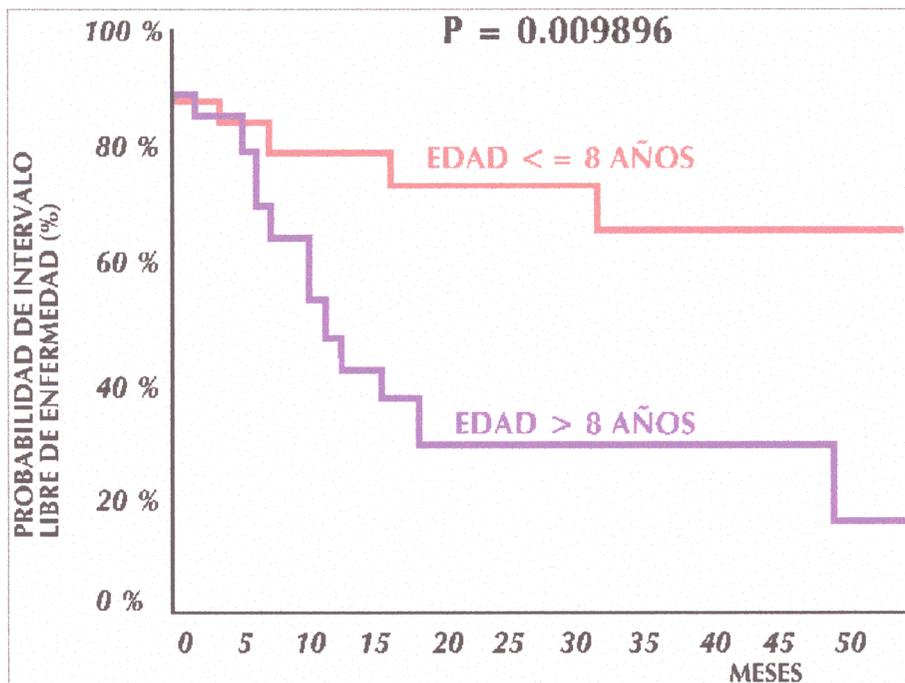


Fig. IV-5. Intervalo libre de enfermedad según la edad ( $\leq 8$  ó  $>$  de 8 años).

- ❖ Se encuentran diferencias significativas de forma que el ILE es menor en niños mayores de 8 años.

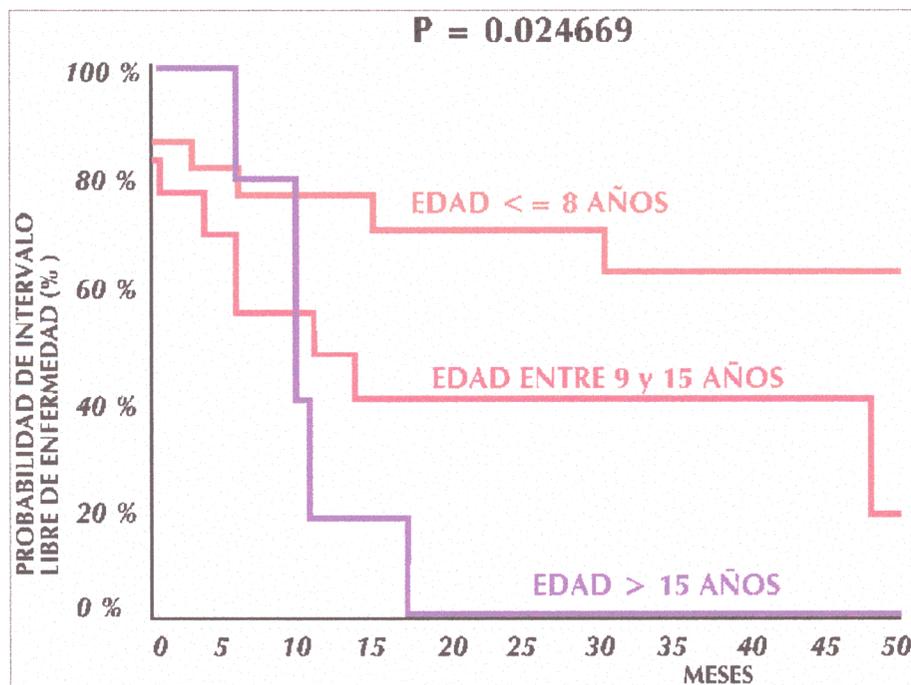


Fig. IV-6. Intervalo libre de enfermedad según la edad (menor de 8, entre 9-15 ó mayor de 15 años).

- ❖ Se encuentran diferencias significativas de forma que el ILE disminuye progresivamente desde los niños menores de 8 años, a los comprendidos entre 9 y 15 años y a los mayores de 15 años, aunque con menor significación que cuando los estratificamos en dos grupos.

	EDAD ≤ 8 años (22 casos)	EDAD >8 años (23 casos)	VALOR p
<b>SEXO:</b>			
❖ Hombres: 29	15 (68.18%)	14 (60.86%)	p=0.8354902
❖ Femenino: 16	7 (31.82%)	9 (39.14%)	
<b>LOCALIZACIÓN:</b>			
❖ Desfavorable: 28	12 (54.54%)	16 (69.56%)	p=0.5286341
❖ Favorable :17	10 (45.46%)	7 (30.44%)	
<b>ESTADIO:</b>			
❖ I-II: 22	12 (54.54%)	10 (43.47%)	p=0.6612987
❖ III-IV: 23	10 (45.46%)	13 (56.52%)	
<b>TIPO HISTOLÓGICO:</b>			
❖ RMS embrionario: 31	16 (72.72%)	15 (62.21%)	p=0.8193372
❖ RMS alveolar: 14	6 (27.27%)	8 (37.79%)	

Tabla IV-II. RESULTADOS. Relación estadística de la edad (mayor o menor de 8 años) con diversos parámetros clínicos e histológicos.

- ❖ No se apreció asociación estadística entre la edad (mayor o menor de 8 años) y el resto de los parámetros clínicos e histológicos.

	EDAD ≤ 15 años (39 casos)	EDAD >15 años (6 casos)	VALOR p
<b>SEXO:</b>			
❖ Hombres: 29	25 (64.10%)	4 (66.66%)	p=0.7364410
❖ Femenino: 16	14 (35.90%)	2 (33.34%)	
<b>LOCALIZACIÓN:</b>			
❖ Desfavorable: 28	24 (61.53%)	4 (66.66%)	p=0.8275740
❖ Favorable :17	15 (38.47%)	2 (33.34%)	
<b>ESTADIO:</b>			
❖ I-II: 22	20 (51.28%)	2 (34.34%)	p=0.7054741
❖ III-IV: 23	19 (48.72%)	4 (66.66%)	
<b>TIPO HISTOLÓGICO:</b>			
❖ RMS embrionario: 31	27 (69.23%)	4 (66.66%)	p=0.7284088
❖ RMS alveolar: 14	12 (30.77%)	2 (34.34%)	

Tabla IV-III. RESULTADOS. Relación estadística de la edad (mayor o menor de 15 años) con diversos parámetros clínicos e histológicos.

- ❖ No se apreció asociación estadística entre la edad (mayor o menor de 15) y el resto de los parámetros clínicos e histológicos.

	EDAD ≤ ó > de 8 años	EDAD ≤ ó > de 15 años	EDAD ≤ de 8, entre 9-15 ó > 15 años
SUPERVIVENCIA	p=0.016481	p=0.006759	p=0.007247
ILE	p=0.009896	p=0.065752	p=0.024669

Tabla IV.IV. RESULTADOS. Relación estadística de la edad con la supervivencia y el intervalo libre de enfermedad (ILE) en diferentes estratificaciones (Kaplan-Meier).

- ❖ Se ha observado una supervivencia significativamente menor en los niños mayores de 15 años.
- ❖ Se ha observado un ILE significativamente mayor en los niños menores de 8 años.

#### IV.1.2.- SEXO.

En nuestra serie se observó una mayor incidencia en varones, con una relación de 1.8:1 respecto a las mujeres (29 hombres/16 mujeres). No se demostró asociación estadística significativa del sexo con ninguno de los **parámetros clínicos e histológicos** valorados en este estudio. Los resultados se expresan en la tabla IV-V. No se han observado tampoco diferencias en la **supervivencia** ( $p=0.161069$ ), ni en el **ILE** ( $p=0.604585$ ) respecto al sexo con el método de Kaplan-Meier.

	SEXO		VALOR p
	MUJERES (16 casos)	HOMBRES (29 casos)	
<b>LOCALIZACIÓN:</b> ❖ Desfavorable: 28 ❖ Favorable: 17	11(68.75%) 5(31.25%)	17 (5.62%) 12 (41.38%)	p=0.7267344
<b>ESTADIO:</b> ❖ I-II:22 ❖ III-IV:23	6(37.5%) 10(62.5%)	16(55.17%) 13(44.83%)	p=0.5847758
<b>TIPO HISTOLÓGICO:</b> ❖ Embrionario:31 ❖ Alveolar:14	12(75%) 4(25%)	19(65.51%) 10(34.49%)	p=0.7467035

Tabla IV-V. RESULTADOS. Relación estadística del sexo con diversos parámetros clínicos e histológicos:

- ❖ No se apreció asociación significativa del sexo con la localización, el estadio clínico y el tipo histológico.

### IV.1.3.- LOCALIZACIÓN

La localización de los 45 casos que constituyen esta serie queda reflejada en la Tabla IV-I y Fig IV-7. La localización más frecuente fue la desfavorable (62%), y dentro de este grupo, los senos paranasales fue la localización más frecuente (9 casos-20%), seguida muy de cerca de las extremidades (8 casos-18%). La localización favorable con 17 casos (38%) estuvo distribuida de forma muy homogénea en tres grupos: aparato genitourinario, órbita y región paratesticular (5 casos-11% cada una).

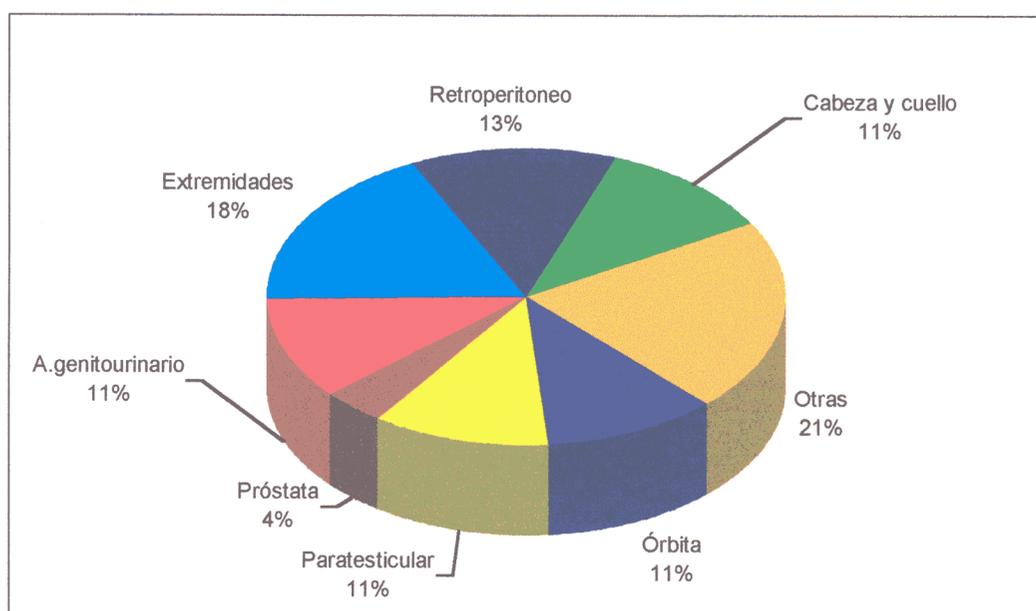
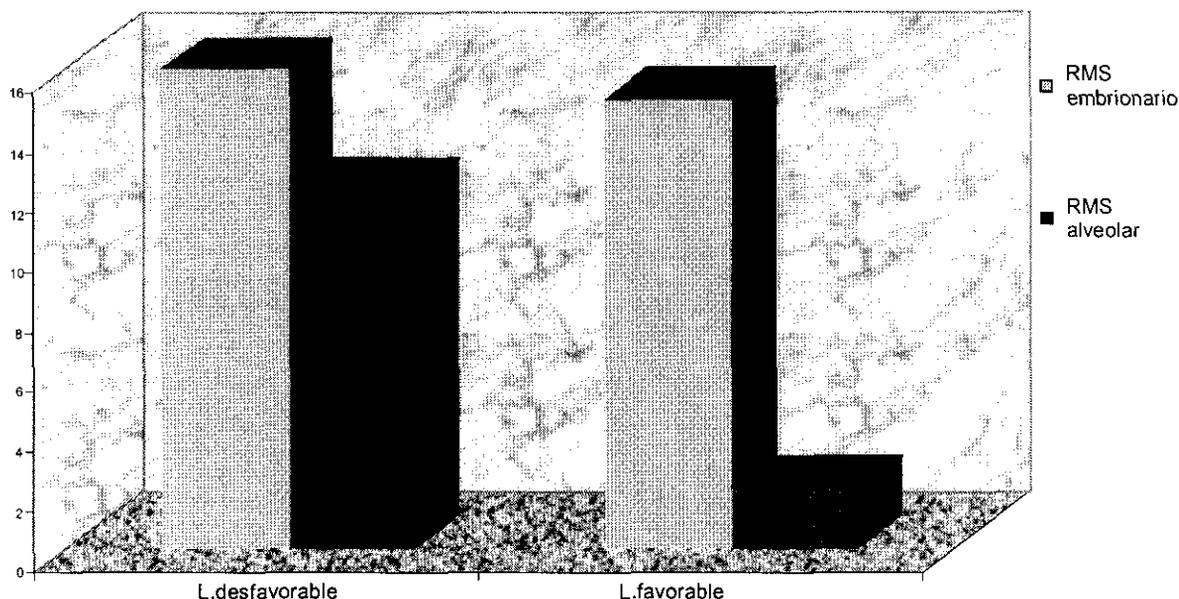


Fig. IV-7. RESULTADOS. Distribución de los RMSs según la localización.

La relación estadística entre las **características clínico-patológicas** y la localización aparece reflejada en la tabla IV-VI. Aunque la localización desfavorable fue más frecuente en el tipo histológico alveolar, las diferencias no llegaron a alcanzar niveles de significación estadística ( $p=0.0606304$ ) (Fig. IV-8).



**Fig. IV-8. RESULTADOS: Distribución del tipo histológico según la localización.**

- ❖ El tipo alveolar fue más frecuente en localizaciones desfavorables aunque las diferencias no fueron significativas.

La probabilidad de **supervivencia** (Fig.IV-9) fue menor en los casos con localizaciones desfavorables, existiendo diferencias significativas ( $p=0.004423$ ). Por último, el análisis con el test de Kaplan y Meier concluyó que el ILE era menor para los casos con localizaciones desfavorables, con diferencias también significativas aunque menores que las detectadas con la supervivencia ( $p=0.027162$ ).

El **ILE** fue menor en los casos con localizaciones desfavorables, con diferencias significativas ( $p=0.027162$ ) (Fig IV-10).

Los RMSs parameníngeos y de extremidades tuvieron el peor pronóstico de todos los casos en localizaciones desfavorables. En nuestra serie estudiamos 17 RMSs con estas localizaciones (9 parameníngeos y 8 en extremidades) y de ellos fallecieron el 71% (12 pacientes) de los enfermos a pesar de ser solamente el 23% (4 casos) de tipo alveolar. Por último, se intentó evaluar también la posible conexión entre la supervivencia (vivos y

muerdos) y las diferentes localizaciones desfavorables (tumores parameningeos y de extremidades, otras localizaciones desfavorables), detectándose relación estadística casi significativa con la prueba  $\chi^2$  ( $p=0.051465$ ).

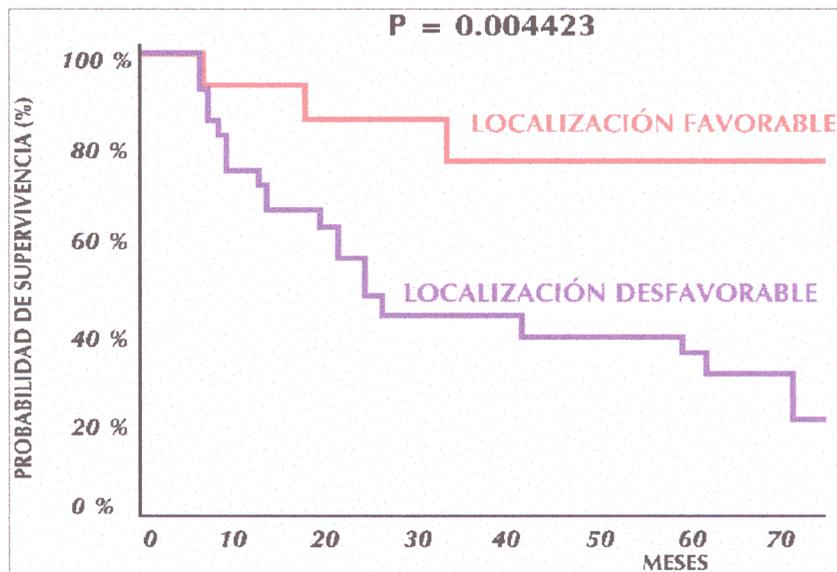


Fig IV-9. Supervivencia según la localización (localización desfavorable-localización favorable).

- ❖ Se encuentran diferencias significativas de forma que la supervivencia es mayor en las localizaciones favorables.

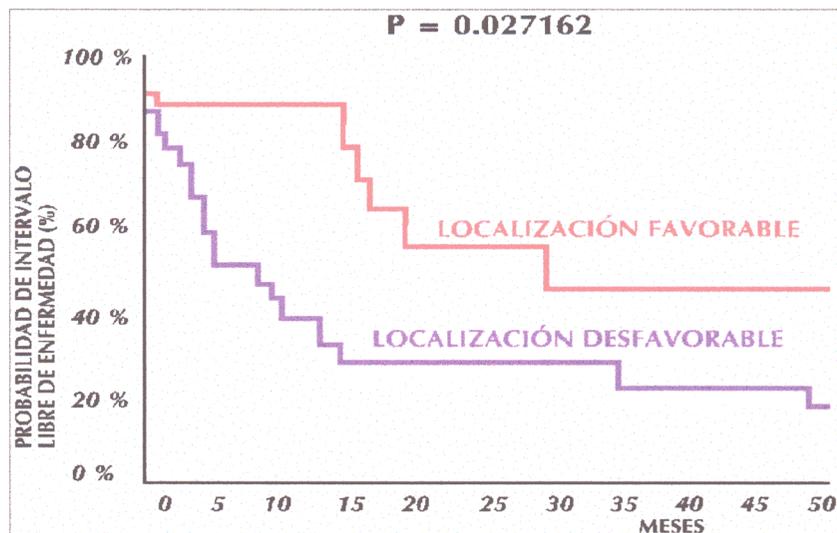


Fig IV-10. Intervalo libre de enfermedad según la localización (localización desfavorable-localización favorable).

- ❖ Se encuentran diferencias significativas de forma que el ILE es mayor en las localizaciones favorables.

	LOCALIZACIÓN		VALOR p
	DESFAVORABLE (28 casos)	FAVORABLE (17 casos)	
ESTADIO			
➤ I-II:22	11 (39.28%)	11 (64.61%)	p=0.1744913
➤ III-IV:23	17 (60.72%)	6 (35.29%)	
TIPO HISTOLÓGICO			
➤ Embrionario:31	16 (57.14%)	15 (88.23%)	p=0.0606304
➤ Alveolar:14	12 (42.86%)	2 (11.77%)	

**Tabla IV-VI. RESULTADOS. Relación estadística de la localización con diversos parámetros clínicos e histológicos.**

- ❖ *No se apreció asociación estadística entre la localización y el estadio clínico y tipo histológico. Sin embargo, se detectó predominio del tipo histológico alveolar en las localizaciones desfavorables.*

#### **IV.1.4.- ESTADIO CLÍNICO.**

El estadio clínico más frecuente resultó ser el III con 19 casos (42%), seguido del II con 13 casos (29%) y del I y IV con 9 (20%) y 4 (9%) casos respectivamente (tabla IV-I) (Fig IV-11). Para el estudio estadístico se estratificó el estadio clínico en dos grupos: el primero constituido por los estadios I y II, y el segundo por los estadios III y IV. De esta manera se separaban los tumores localizados y los no localizados. Sin embargo, no se observó relación estadística entre las **características clínico-patológicas** de los pacientes y el estadio clínico (Tabla IV-II, IV-III, IV-V y IV-VI).

También se investigó la posible asociación entre el estadio clínico estratificado en cuatro (estadio I, II, III, IV) y tres grupos (estadio I-II, III y IV) con los diversos parámetros clinicopatológicos valorados en este estudio, pero la estratificación resultaba excesiva para el número de casos.

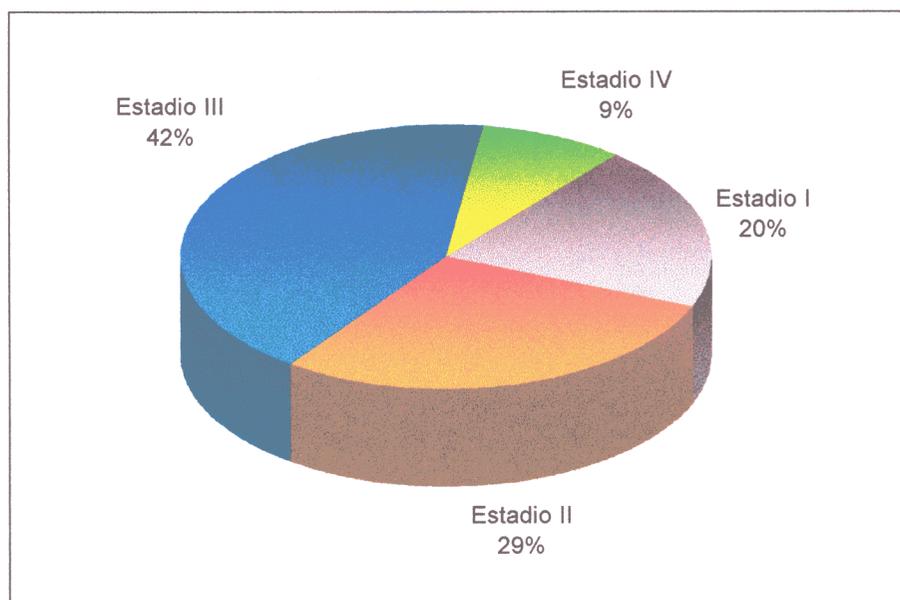


Fig. IV-11. RESULTADOS. Distribución de los RMSs por estadio clínico.

Posteriormente, estudiamos la relación estadística del estadio clínico con la **supervivencia**. Cuando el estadio clínico se consideraba en cuatro grupos (I, II, III, IV) no se demostraba asociación estadística con la supervivencia ( $p=0.363872$ ). Se obtuvieron resultados similares cuando estratificamos el estadio clínico en tres grupos, separando estadio I-II, estadio III y estadio IV ( $p=0.564958$ ) o en dos (I-II/III-IV) ( $p=0.081055$ ).

Finalmente, estudiamos la relación estadística del estadio clínico con el **ILE**. Cuando el estadio clínico se consideraba en cuatro grupos (I, II, III, IV) se demostraba asociación estadística con el ILE ( $p=0.001626$ ) (Fig. IV-12). Cuando el estadio clínico se estratificaba en tres grupos, separando I-II, estadio III y estadio IV, la asociación estadística con el ILE fue todavía más fuerte ( $p=0.000550$ ) (Fig. IV-13). Por último, se intentó evaluar también el ILE estratificando el estadio clínico en dos grupos (I-II/III-IV), pero no se demostró asociación estadística con el ILE ( $p=0.0611896$ ).

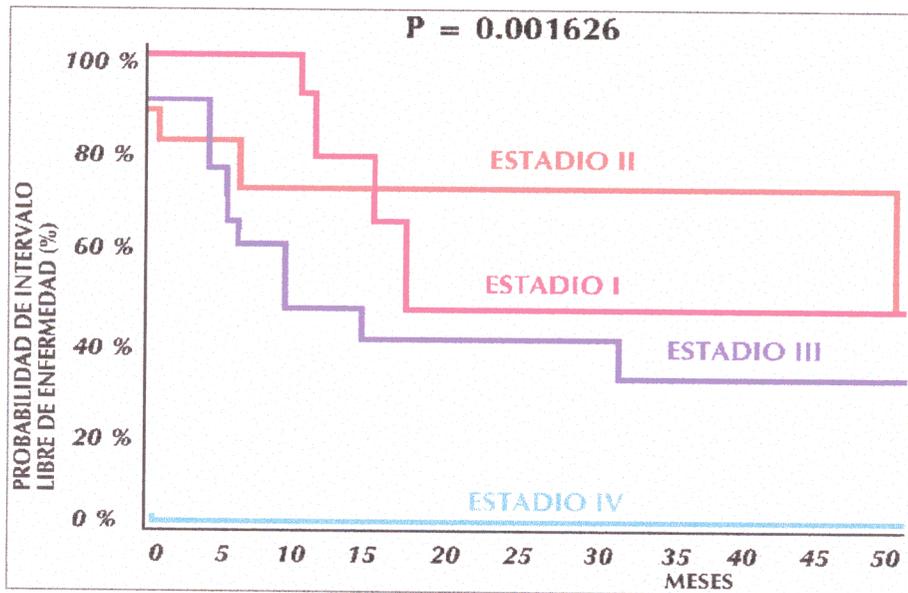


Fig IV-12. Intervalo libre de enfermedad según el estadio clínico dividido en cuatro grupos (I, II, III, IV).

❖ Se encuentran diferencias significativas de forma que el ILE es menor en los casos con estadio III y IV.

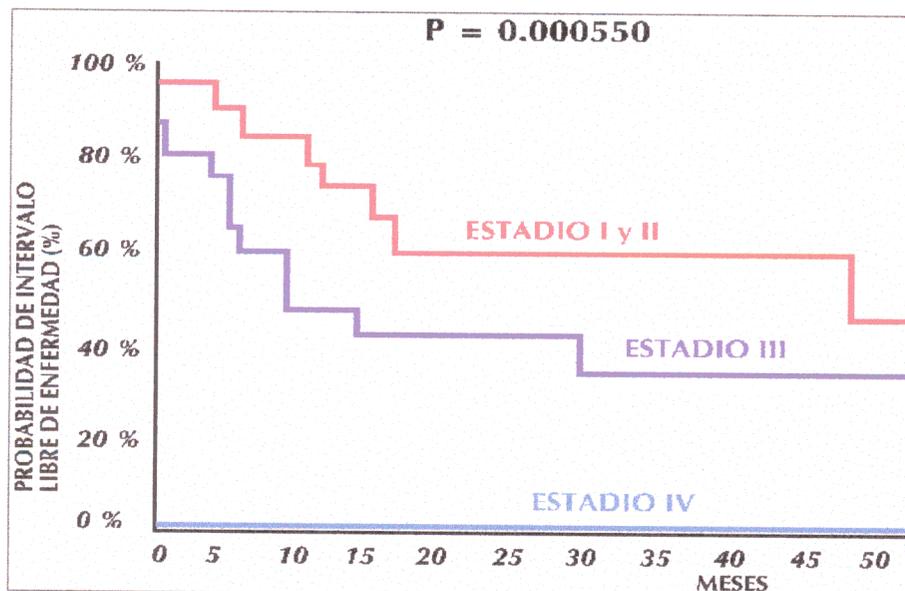


Fig.IV-13. Intervalo libre de enfermedad según el estadio clínico dividido en tres grupos (I-II, III, IV).

❖ Se encuentran diferencias significativas de forma que el ILE disminuye al aumentar el estadio clínico.

#### IV.1.5.- TIPO HISTOLÓGICO.

La histología de los 45 casos de esta serie está reflejada en la tabla IV-I y fig IV-14. El tipo

histológico más frecuente fue el RMS embrionario convencional (24 casos-53%). Dentro de este grupo se encuentra una amplia diversidad histológica, de forma que la descripción morfológica de cada RMS embrionario es prácticamente única e irrepetible.

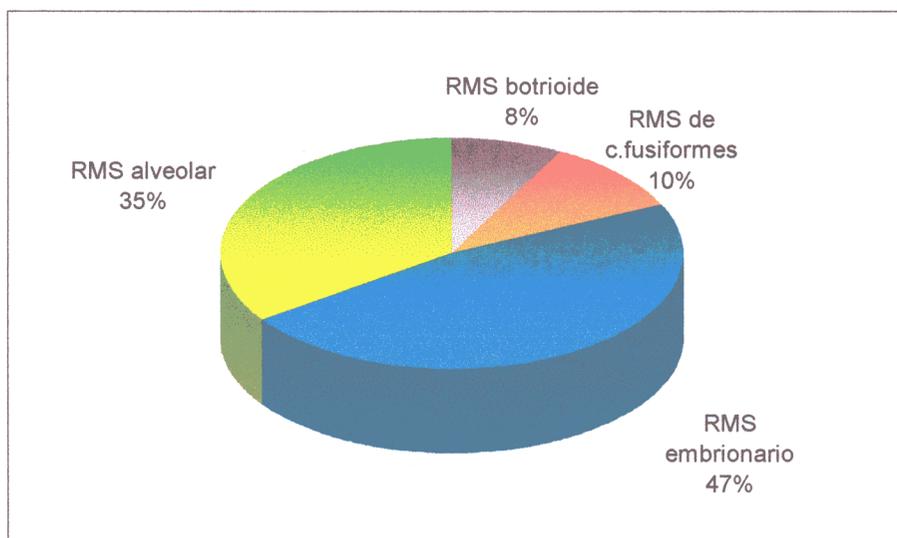


Fig IV-14. RESULTADOS. Distribución de los RMSs según el tipo histológico.

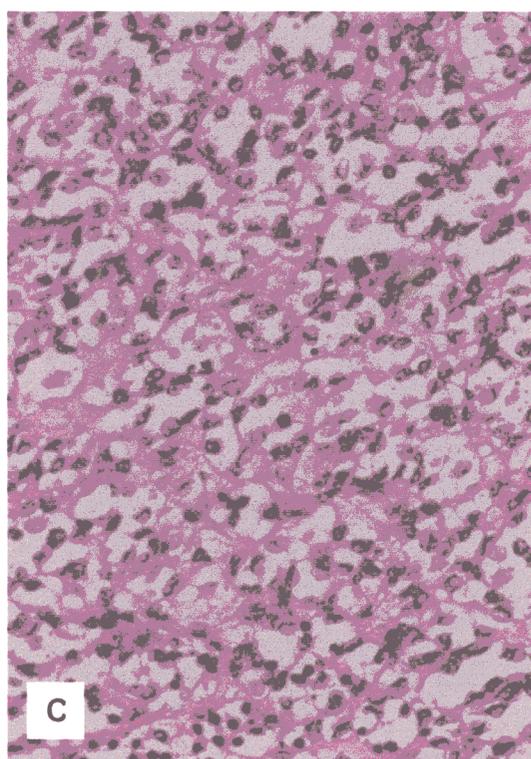
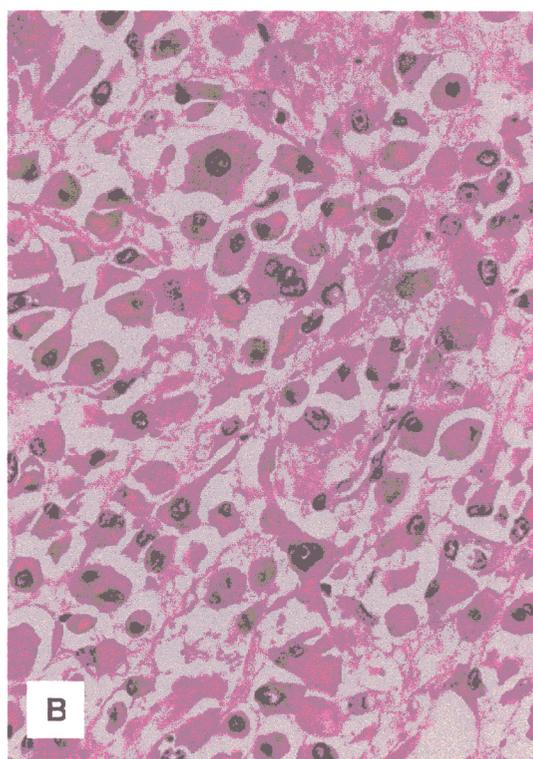
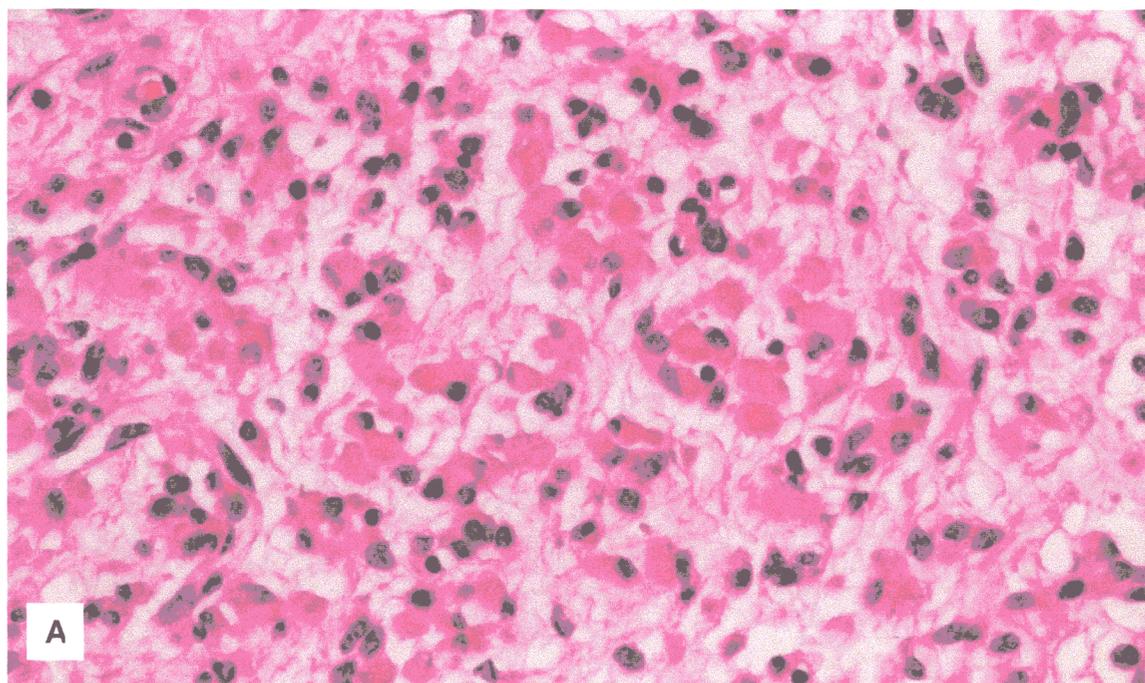
Histológicamente los RMSs embrionarios muestran un amplio espectro morfológico no sólo de tumor a tumor, sino también dentro de una misma neoplasia. El grado de diferenciación celular (lámina IV-I) es muy variable y oscila desde zonas en que hay muchas células con marcada diferenciación rabiomioblástica, constituidas por amplios citoplasmas poligonales o alargados y eosinófilos, a áreas en donde es extraordinariamente difícil demostrar esta diferenciación, destacando el parecido que puede tener este tumor con otras neoplasias de células pequeñas de la infancia. Por otra parte, los núcleos de los RMS embrionarios suelen ser pequeños y uniformes, con cromatina fina y pleomorfismo nuclear. Sin embargo el pleomorfismo puede ser muy marcado en algunos casos, planteando incluso un diagnóstico diferencial con el RMS alveolar (Lámina IV-II). Por último, el estroma mixoide es una característica del RMS embrionario pero la extensión de

las áreas mixoides es muy variable de un caso a otro. En ninguno de nuestros tumores se producía un patrón mixoide puro, sino que siempre estaba entremezclado con áreas de mayor densidad celular que en ocasionales eran las que predominaban (lámina IV-III).

El tipo histológico alveolar se dio en 14 casos (31%). Nueve de estos casos mostraban un aspecto histológico alveolar clásico. En este tumor, las células neoplásicas se disponen alrededor de ejes de tejido conectivo, remedando tumores de estirpe epitelial, con una luz central que frecuentemente está ocupada por células gigantes multinucleadas (lámina IV-IV). En los 5 casos restantes, los tumores tenían un patrón multinodular, sólido, con grandes nidos tumorales, y citológicamente eran muy semejantes a los RMSs alveolares convencionales (lámina IV-V).

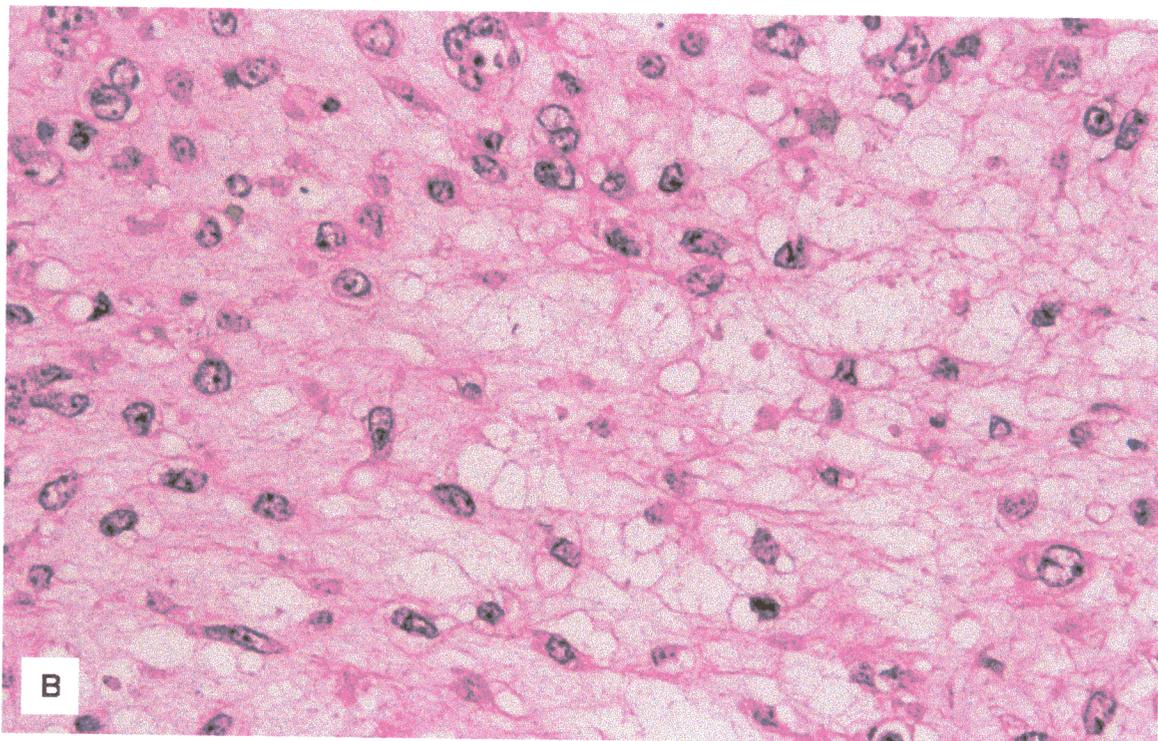
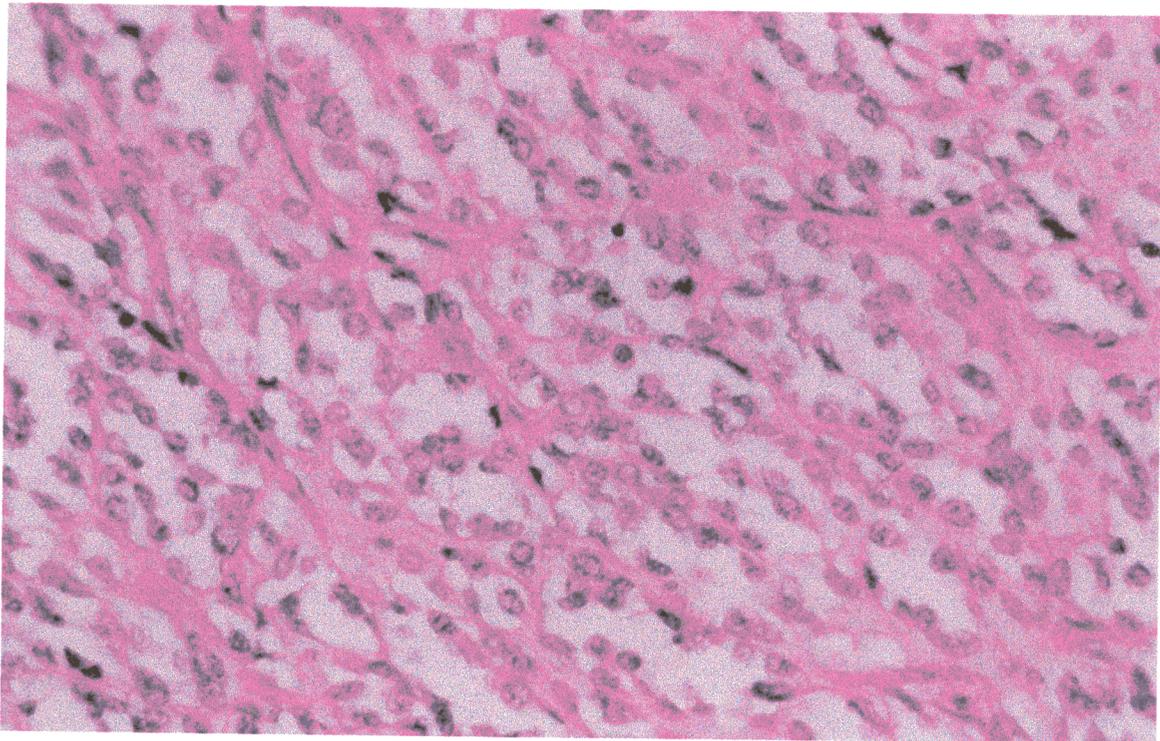
El RMS embrionario variante botrioide se dio en 3 casos (7%), en toda nuestra serie y mostraba un aspecto histológico y macroscópico característico, con la clásica apariencia polipoide y la tradicional “capa de cambio” subyante al epitelio del órgano de origen (lámina IV-VI). Por último, la variante fusiforme del RMS embrionario se observó en 4 casos y constituye el 9 % de los RMSs de nuestra serie. Este tumor es histológicamente homogéneo, con elevada densidad celular, patrón fusiforme y moderada atíпия citológica (lámina IV-VII).

No se demostró asociación estadística entre el tipo histológico y el estadio clínico ( $p=0.286268$ ) ni ningún otro de los **parámetros clínicos** ya comentados (ver tablas IV-II, IV-IV, IV-V, IV-VI). Tampoco se demostró asociación estadística del tipo histológico con la **supervivencia** ( $p=0.586661$ ) ni con el **ILE** ( $p=0.648197$ ).



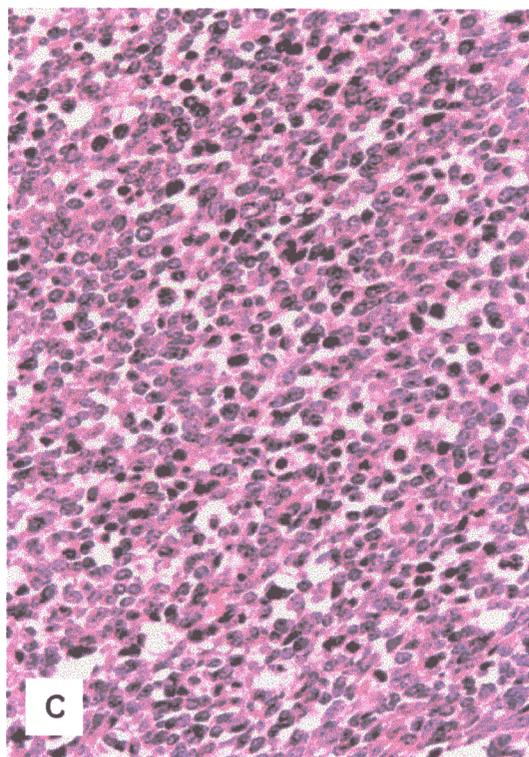
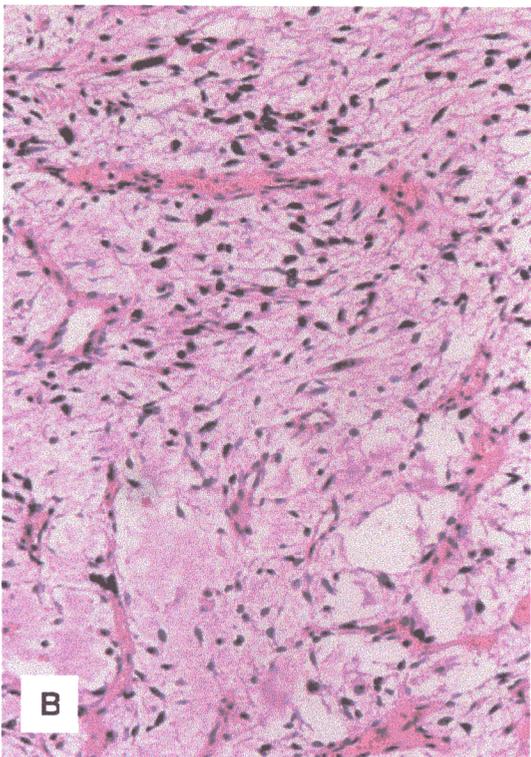
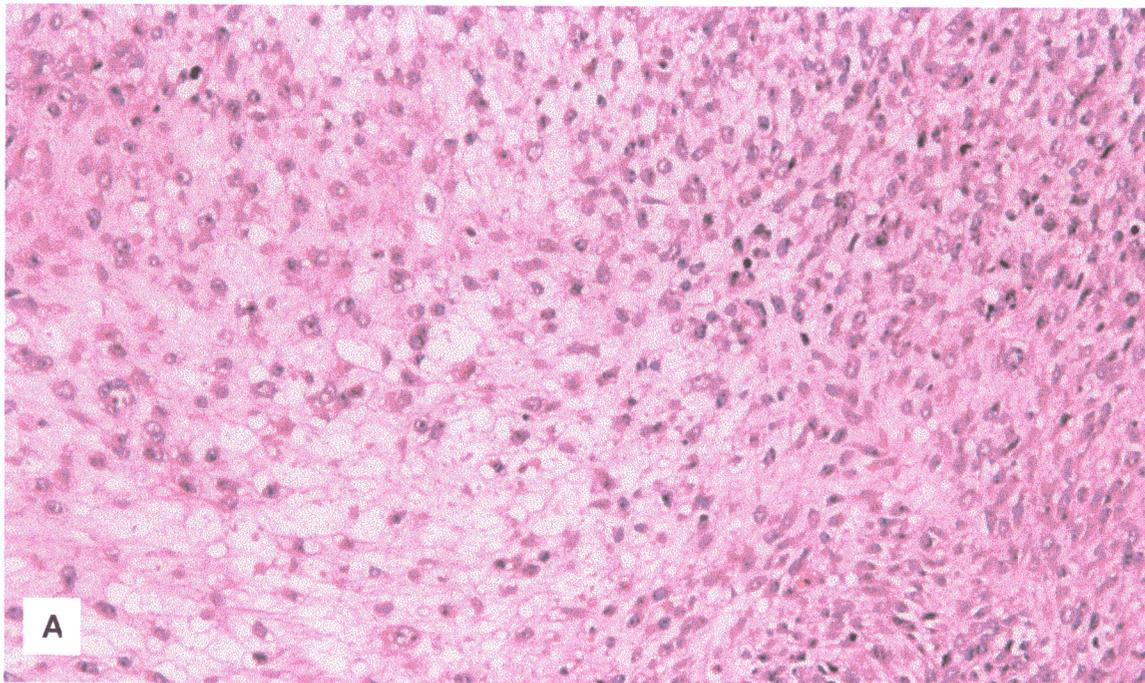
**Lámina IV-I.- RMS embrionario mostrando grados variables de diferenciación celular.**

**A.-** Focos de células con moderada diferenciación rbdomioblástica. Algunas células muestran eosinófilos con ocasionales vacuolizaciones. **B.-** Muchas de las células presentan citoplasmas amplios, poligonales o estrellados y muy eosinófilos. **C.-** Focos de células sin diferenciación rbdomioblástica. Las células son redondas, con citoplasma escaso.



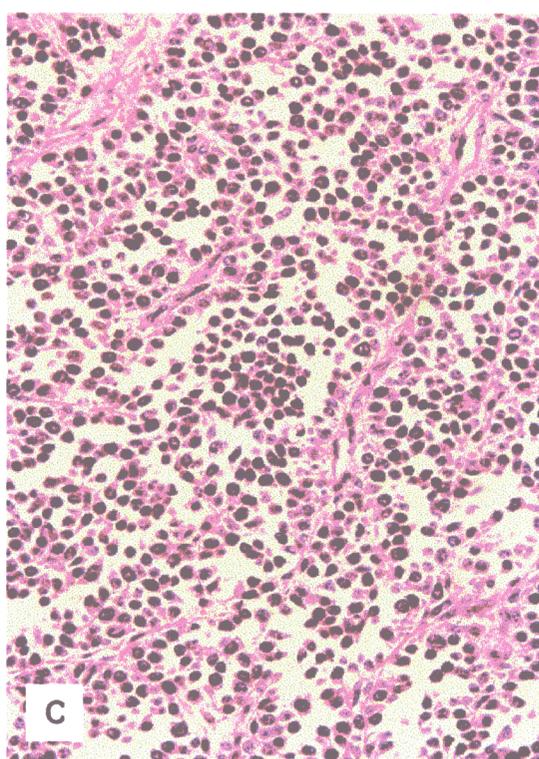
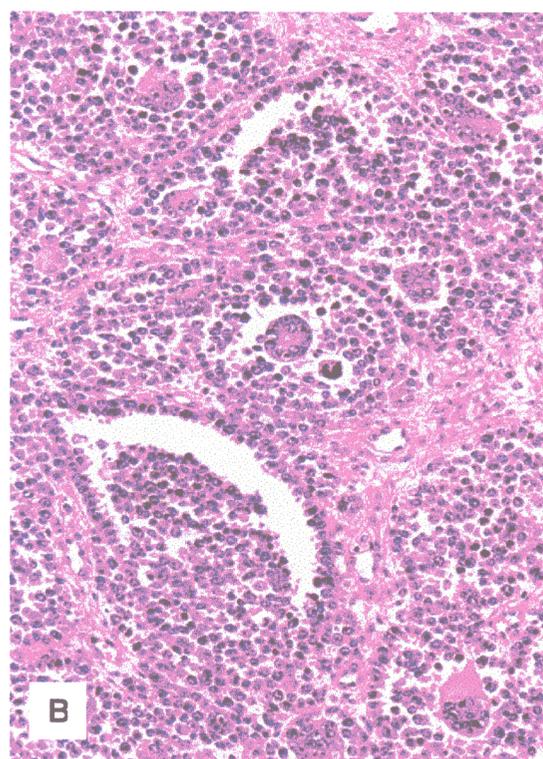
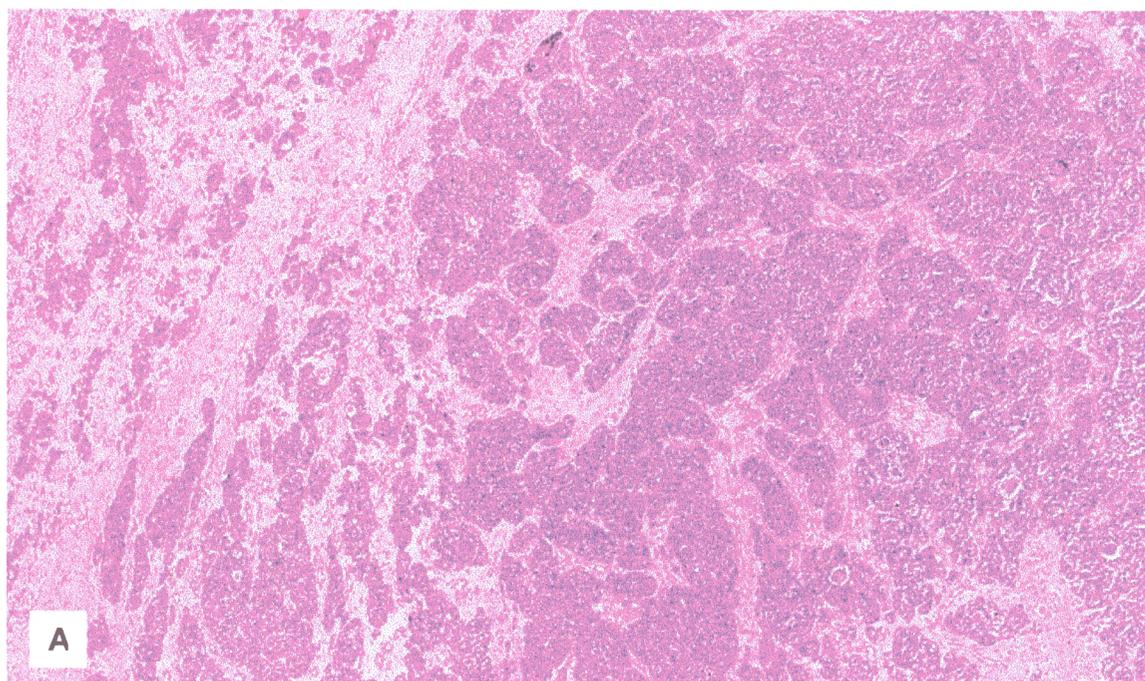
**Lámina IV-II.- RMS embrionario mostrando grados variables de atípia nuclear.**

**A.-** Detalle celular de un RMS embrionario convencional. Los núcleos son pequeños, regulares con cromatina finamente granular y pequeño nucléolo. **B.-** Detalle celular de un RMS embrionario atípico. Los núcleos son grandes con cromatina granular gruesa y prominentes nucléolos.



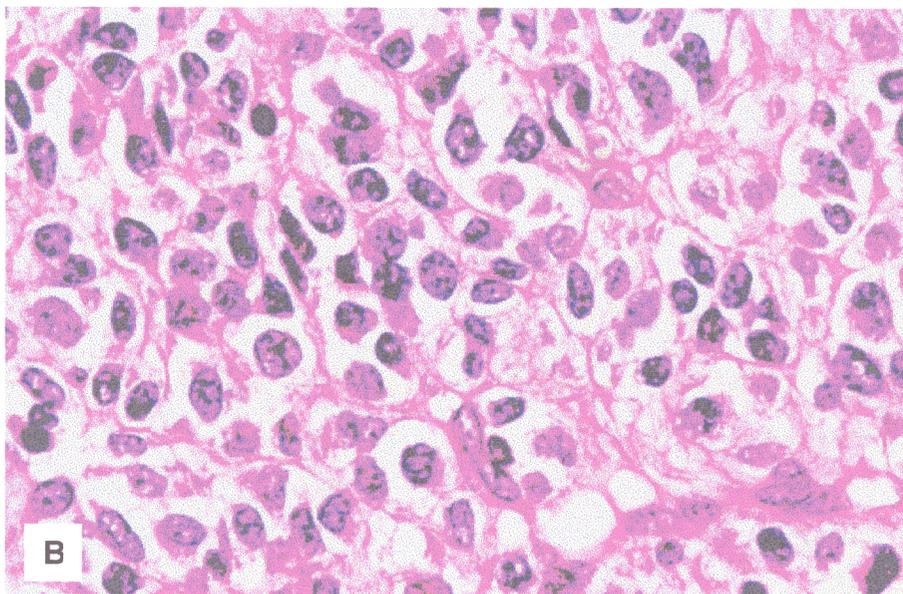
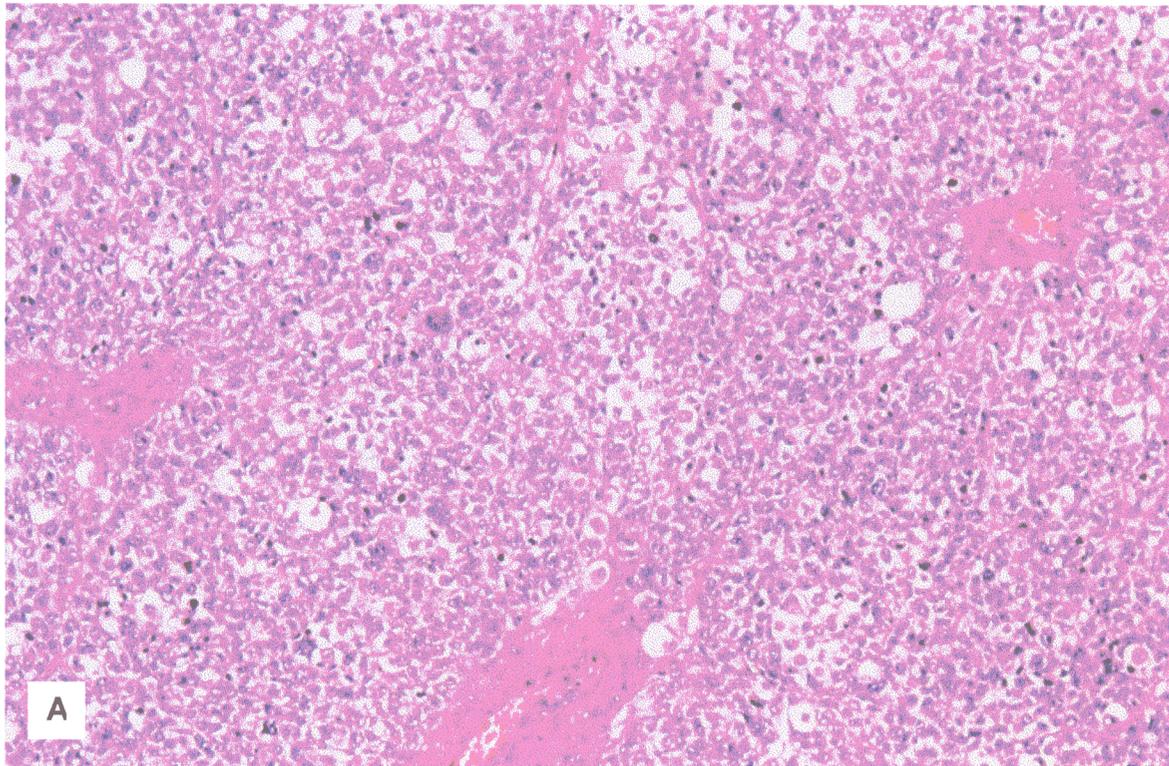
**Lámina IV-III. RMS embrionario mostrando grados variables de densidad celular.**

**A.-** Panorámica de un RMS embrionario en el que se observa alternancia de áreas mixoides con otras de mayor densidad celular. **B.-** RMS embrionario con patrón predominantemente mixoide. **C.-** RMS embrionario denso e hipercelular en el que no se aprecian áreas mixoides.



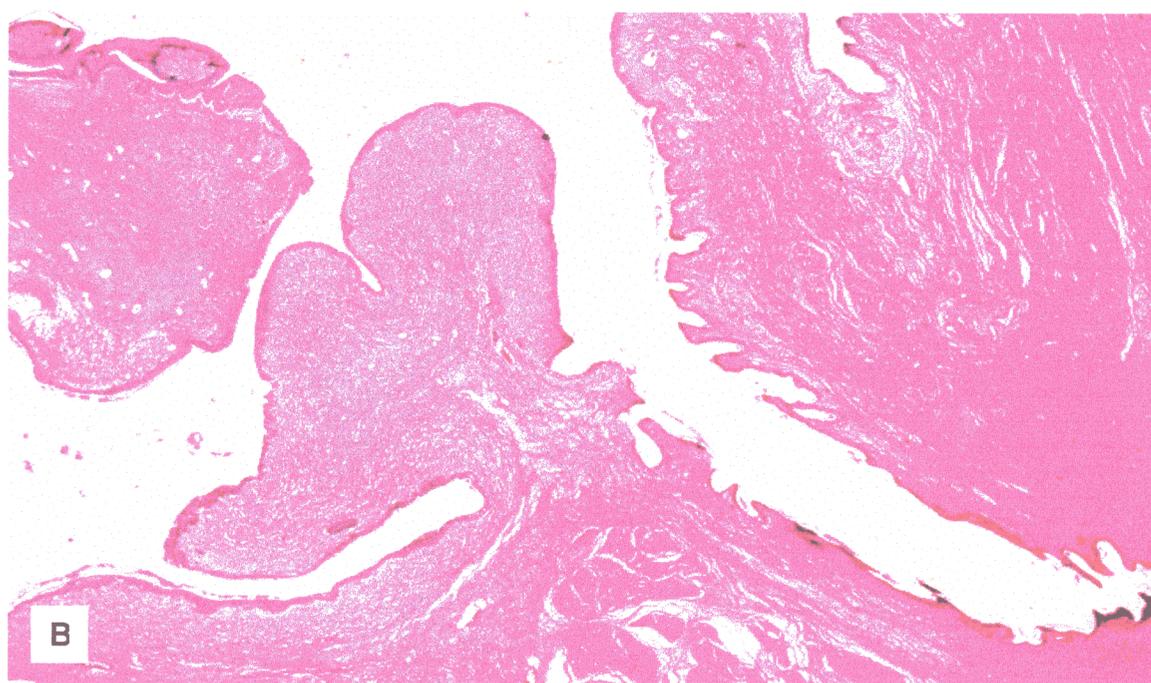
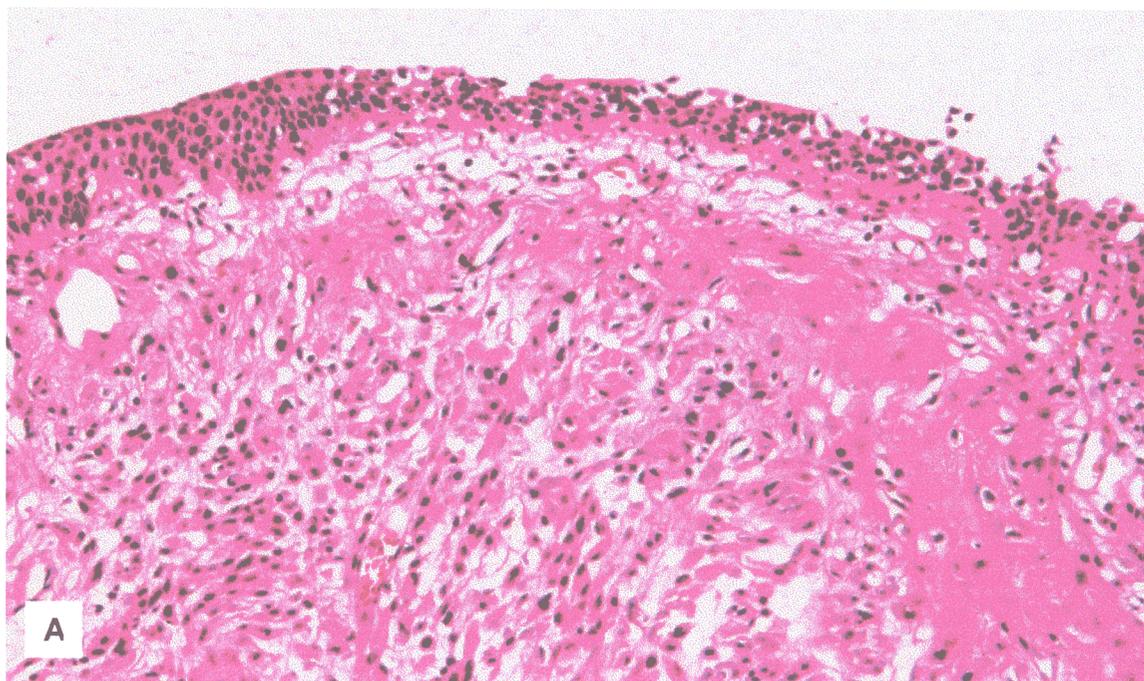
**Lámina IV-IV.- RMS alveolar clásico.**

**A.-** Panorámica de un RMS alveolar clásico. Los nidos celulares están separados por amplios tabiques fibrosos. **B.-** Detalle celular de la figura anterior. Las células tumorales revisten cavidades que recuerdan a alveolos y muestran marcada atípia. Se observan también abundantes células gigantes. **C.-** Detalle celular de un RMS alveolar convencional con marcada disgregación celular. Se observa una intensa atípia citológica



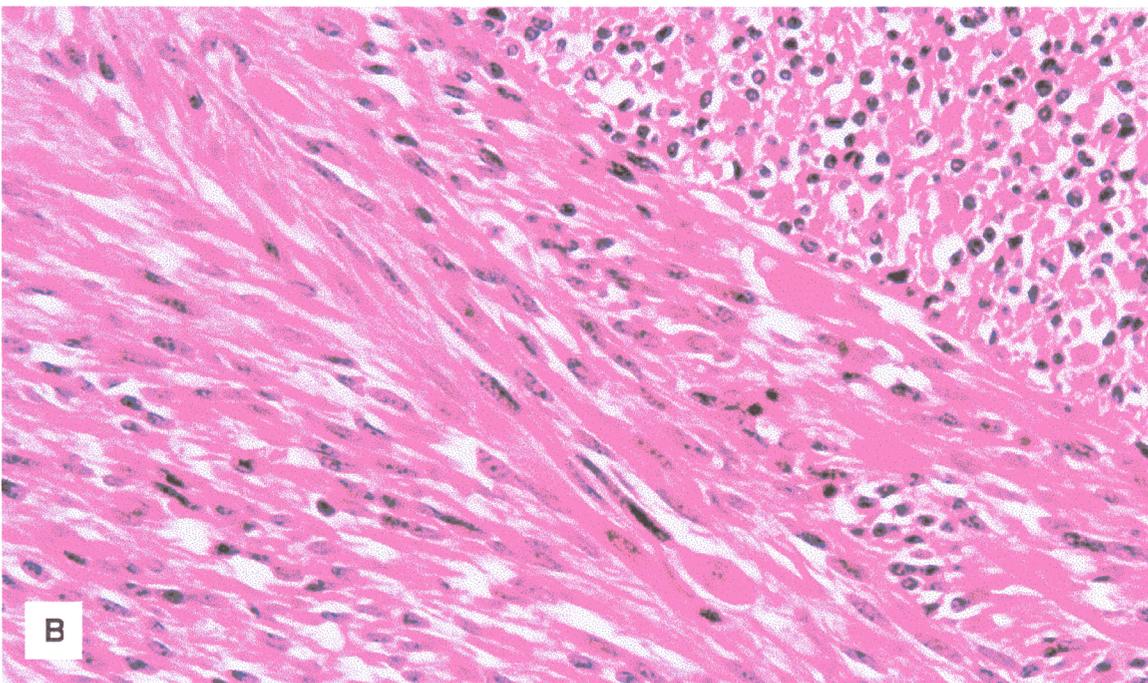
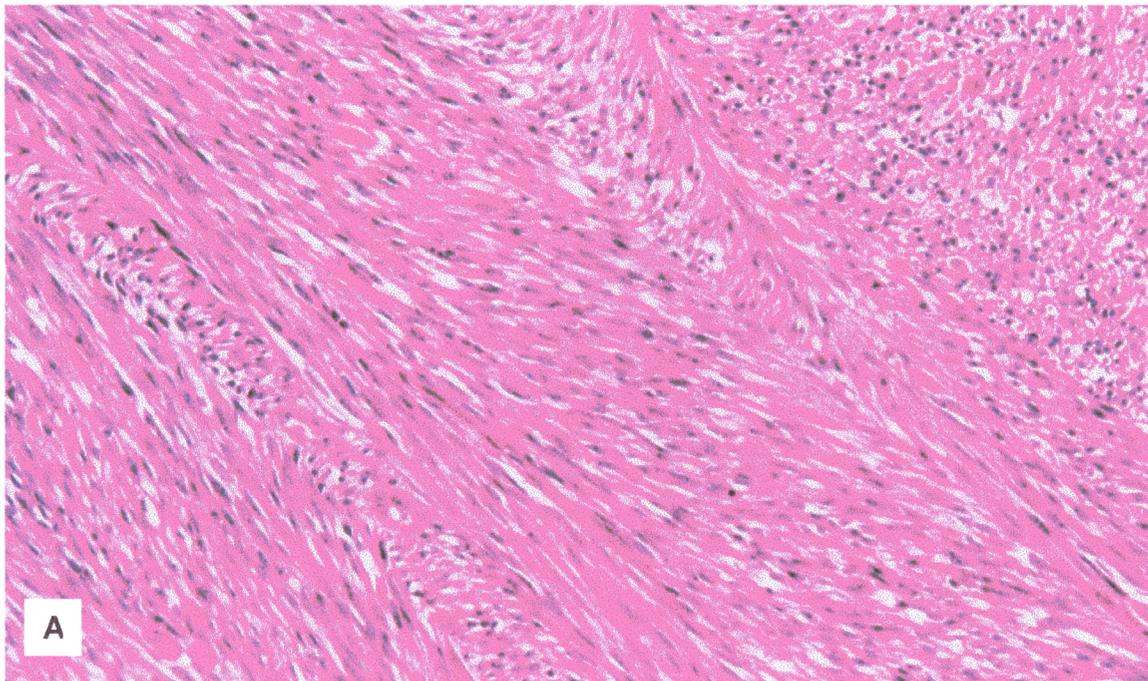
**Lámina IV-V.- RMS alveolar sólido.**

- A.- Panorámica del RMS alveolar sólido en el que no se observa la arquitectura alveolar.  
B.- Detalle celular de la figura anterior en la que se observa características citológicas similares a las del RMS alveolar clásico.



**Lámina IV-VI. - RMS embrionario variante botrioide.**

**A.-** Panorámica del RMS embrionario variante botrioide en la que se observa la clásica apariencia polipoide del tumor con marcada degeneración mixoide del estroma. **B.-** Detalle de la capa de cambio de Nicholson y de la diferenciación rabdomioblástica de las células neoplásicas.



**Lámina IV-VII.- RMS embrionario variante de células fusiformes.**

**A.-** Panorámica del RMS embrionario de células fusiformes en la que se observa el crecimiento fascicular del tumor simulando un leiomiosarcoma. **B.-** Detalle celular del tumor anterior en el que se observan las células fusiformes con citoplasma amplio y núcleo hiper cromático sin atípia franca.

#### IV. 2.- RESULTADOS DE LA PLOIDÍA.

En los 45 casos estudiados, el tipo de histograma por orden de frecuencia fue: hiperdiploide en 30 casos (67%), diploide en 6 casos (12%), tetraploide en 5 casos (11%), poliploide en 3 casos (7%) y no valorable en un caso (2%) (Fig IV-15). Se estudió la asociación de las **características clínicas e histológicas** con la ploidía estratificando los casos en hiperdiploides y resto.

Así se observó una relación estadística significativa con la edad pero no con el resto de las variables (Tabla IV-VII) (Fig.IV-16).

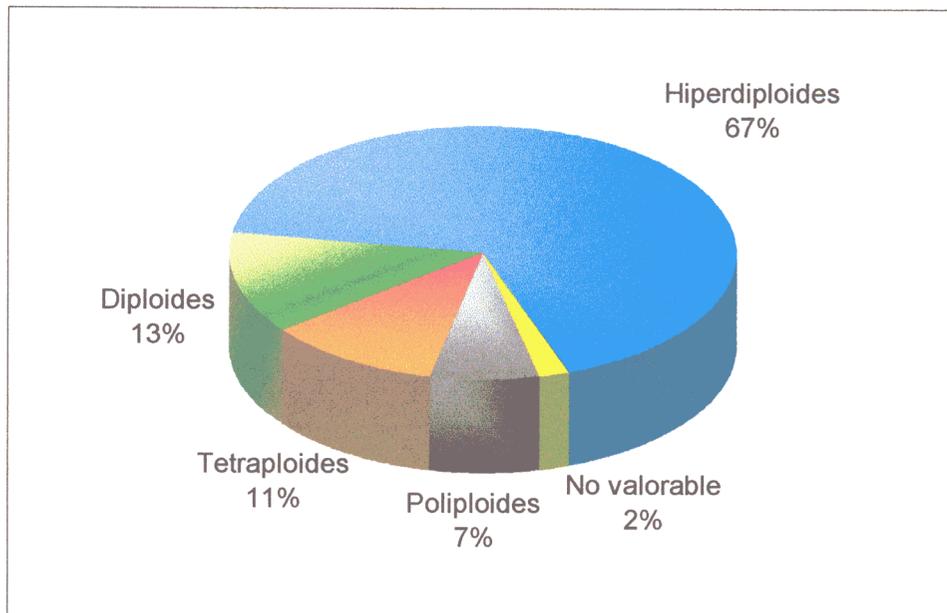


Fig. IV-15. RESULTADOS. Distribución de los RMSs según el tipo de histograma.

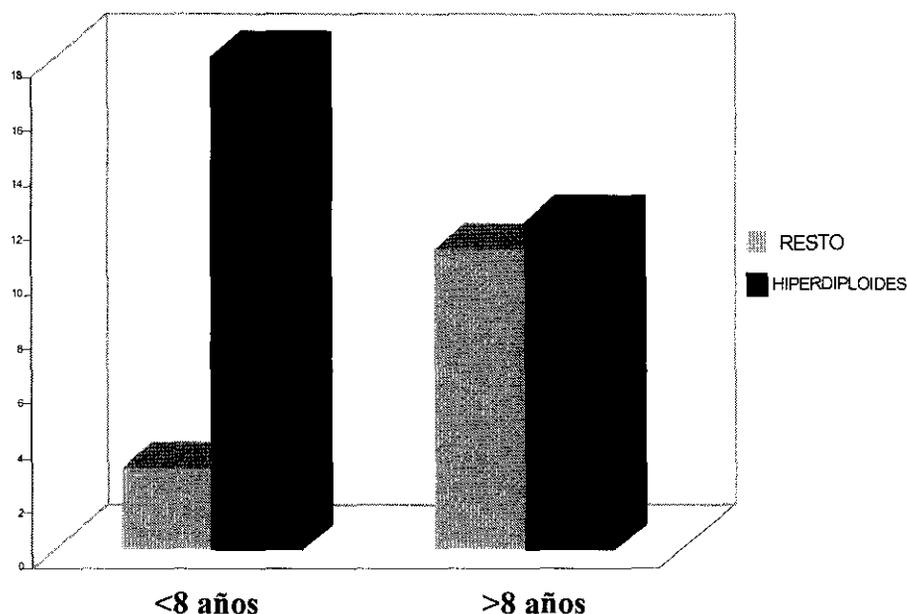


Fig. IV-16. RESULTADOS. Distribución de la edad según el tipo de histograma.

También se intentó evaluar la asociación entre la ploidía estratificada en los cuatro patrones valorados (Lámina IV-VIII) y los **parámetros clinicopatológicos** estudiados, sin embargo, el exceso de estratificación para esta serie no muy amplia impidió la valoración estadística.

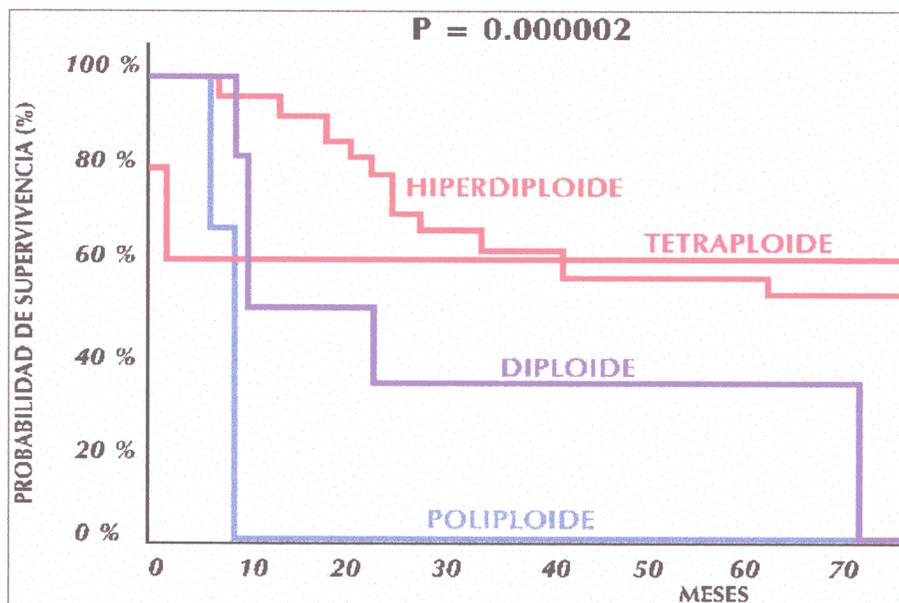
Se estudió la asociación estadística entre la ploidía y la supervivencia e ILE, por el método de Kaplan-Meier (IV-VIII). Para ello se estratificaron los RMSs según el tipo de histograma de tres formas:

- Hiperdiploides y resto (30/14).
- Diploides y resto (6/38).
- Diploides, hiperdiploides, tetraploides y poliploides (6/30/5/3).

La **supervivencia** más elevada la tuvieron los tumores tetraploides y en orden decreciente,

los hiperdiploides, poliploides y diploides ( $p=0.000002$ ) (Fig. IV-17). Cuando se compararon los tumores hiperdiploides con el resto se obtuvo también una diferencia significativa de la supervivencia a favor de los primeros ( $p=0.045147$ ) (Fig. IV-18), mientras que no se demostró dicha asociación cuando se compararon los diploides con el resto ( $p=0.092642$ ).

En el ILE sólo se obtuvieron diferencias significativas cuando estratificamos la ploidía en los cuatro grupos anteriormente comentados ( $p=0.000170$ ). El ILE más elevado lo tuvieron los tumores tetraploides, seguidos en orden decreciente por los tumores hiperdiploides, poliploides y diploides (Fig IV-19). Estos resultados se encuentran resumidos en la tabla IV-VIII.



**Fig.IV-17.- Supervivencia según la ploidía (Hiperdiploides/ diploides/ tetraploides/ poliploides). Se encuentran diferencias significativas:**

- ❖ Grupo de buen pronóstico constituido por los tumores tetraploides e hiperdiploides.
- ❖ Grupo de mal pronóstico constituido por los tumores diploides y poliploides.

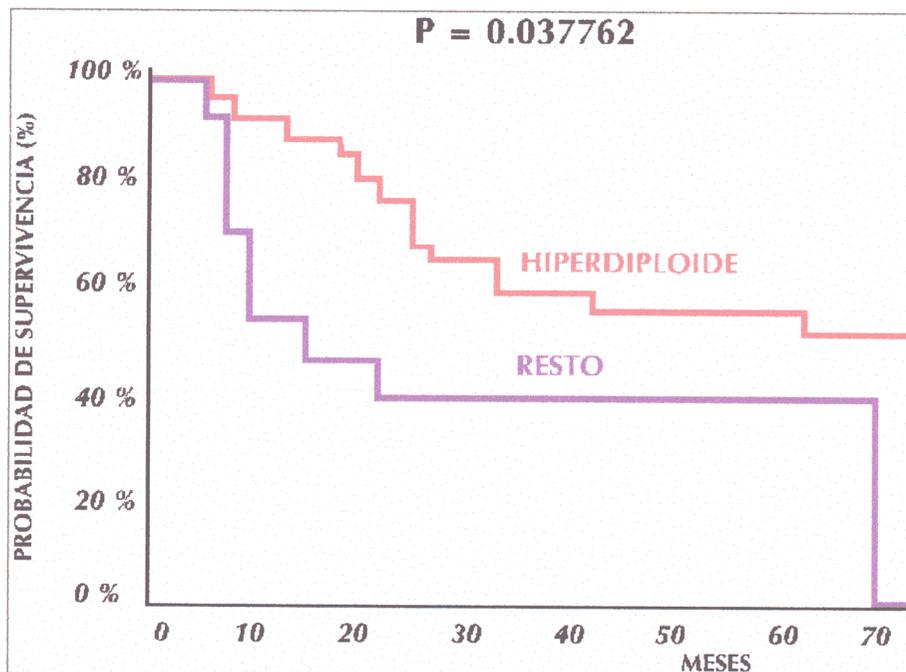


Fig. IV-18.- Supervivencia según la ploidía (Hiperdiploides y resto).

- ❖ Se encuentran diferencias significativas de forma que los tumores hiperdiploides tienen mejor pronóstico.

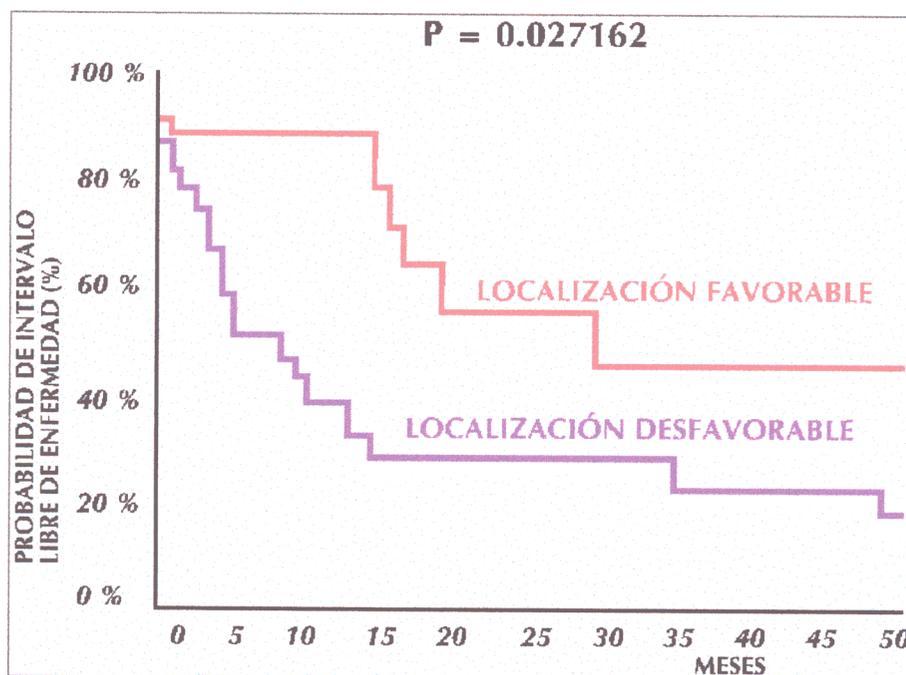


Fig. IV-19.- Intervalo libre de enfermedad según la ploidía (Hiperdiploides/ diploides/ tetraploides/ poliploides). Se encuentran diferencias significativas:

- ❖ Grupo con mayor ILE constituido por los tumores tetraploides e hiperdiploides.
- ❖ Grupo con menor ILE constituido por los tumores diploides y poliploides.

	PLOIDIA		VALOR p
	HIPERDIPLOIDES (30 casos)	RESTO (14 casos)	
<b>EDAD:</b>			
➤ ≤ de 8 años:21	<b>18(60%)</b>	3(21.42%)	<b>p=0.0370076</b>
➤ > de 8 años:23	12(40%)	<b>11(78.58%)</b>	
<b>SEXO:</b>			
➤ <b>Hombre:28</b>	<b>9(63.33%)</b>	<b>9(64.28%)</b>	p=0.7798006
➤ <b>Mujer:16</b>	11(36.37%)	5(35.72%)	
<b>LOCALIZACIÓN:</b>			
➤ Favorable:17	14(46.66%)	3(21.43%)	p=0.2014232
➤ <b>Desfavorable: 27</b>	<b>16 (53.34%)</b>	<b>11(78.57%)</b>	
<b>ESTADIO:</b>			
➤ I-II:22	<b>18(60%)</b>	4(28.57%)	p=0.1013098
➤ III-IV:22	12(40%)	<b>10(71.42%)</b>	
<b>HISTOLOGÍA:</b>			
➤ <b>Embrionario:30</b>	<b>22(73.33%)</b>	<b>8(57.15%)</b>	p=0.5256457
➤ <b>Alveolar:14</b>	8(26.67%)	6(42.85%)	

**Tabla IV-VII. RESULTADOS. Relación estadística entre la ploidía (hiperdiploides y resto) y las características clínico-patológicas.**

- ❖ No se apreció asociación estadística significativa entre la ploidía y el sexo, localización, estadio y tipo histológico. Sin embargo, si se detectó con la edad, de forma que los tumores hiperdiploides predominan en niños menores de 8 años.

	DIPLOIDE (n=6 casos)	HIPERDIPLOIDE (n=30 casos)	TETRAPLOIDE (n=5 casos)	POLIPLÓIDE (n=3 casos)
<b>EDAD</b>				
• ≤ de 8 años	1 (17%)	<b>18 (60%)</b>	1 (20%)	1 (33%)
• > de 8 años	<b>5 (83%)</b>	12 (40%)	<b>4 (80%)</b>	<b>2 (67%)</b>
<b>SEXO</b>				
• Mujer	2 (33%)	<b>19 (63%)</b>	2 (40%)	1 (33%)
• Hombre	<b>4 (67%)</b>	11 (37%)	<b>3 (60%)</b>	<b>2 (67%)</b>
<b>LOCALIZACIÓN</b>				
• Favorable	1 (17%)	14 (47%)	1 (20%)	1 (33%)
• Desfavorable	<b>5 (83%)</b>	<b>16 (53%)</b>	<b>4 (80%)</b>	<b>2 (67%)</b>
<b>ESTADIO</b>				
• I	<b>2 (33%)</b>	6 (20%)	1 (20%)	
• II	1 (17%)	<b>11 (37%)</b>	1 (20%)	
• III	<b>2 (33%)</b>	10 (33%)	<b>3 (60%)</b>	<b>3 (100%)</b>
• IV	1 (17%)	3 (10%)		
<b>T. HISTOLÓGICO</b>				
• RMS botrioide		3 (10%)		
• RMS de c. Fusiformes	1 (17%)	3 (10%)		
• RMS embrionario	2 (33%)	<b>16 (53%)</b>	2 (40%)	<b>3 (100%)</b>
• RMS alveolar	<b>3 (50%)</b>	8 (27%)	<b>3 (60%)</b>	

**Tabla IV-VIII. Características clínicas e histológicas de los RMSs según el tipo de histograma.**

- ❖ El porcentaje de tumores hiperdiploides era más elevado en los niños ≤de 8 años que en los mayores de esta edad en donde la distribución por histogramas era más heterogénea.
- ❖ El porcentaje de mujeres era más elevado en los tumores hiperdiploides que en el resto.
- ❖ En todos los tipos de histograma la localización desfavorable era la predominante.
- ❖ En todos los tipos histológicos predominó el histograma hiperdiploide pero de forma más significativa en los RMSs con histología favorable.

	Hiperdiploides- Resto	Diploides- Resto	Hiperdiploides-Diploides- Poliploides-Tetraploides
<b>SUPERVIVENCIA</b>	<b>p=0.045147</b>	p=0.092642	<b>p=0.000002</b>
<b>ILE</b>	p=0.072811	p=0.176799	<b>p=0.000170</b>

Tabla IV-IX. RESULTADOS. Relación estadística de la ploidía con la supervivencia y el ILE en diferentes estratificaciones (Kaplan-Meier).

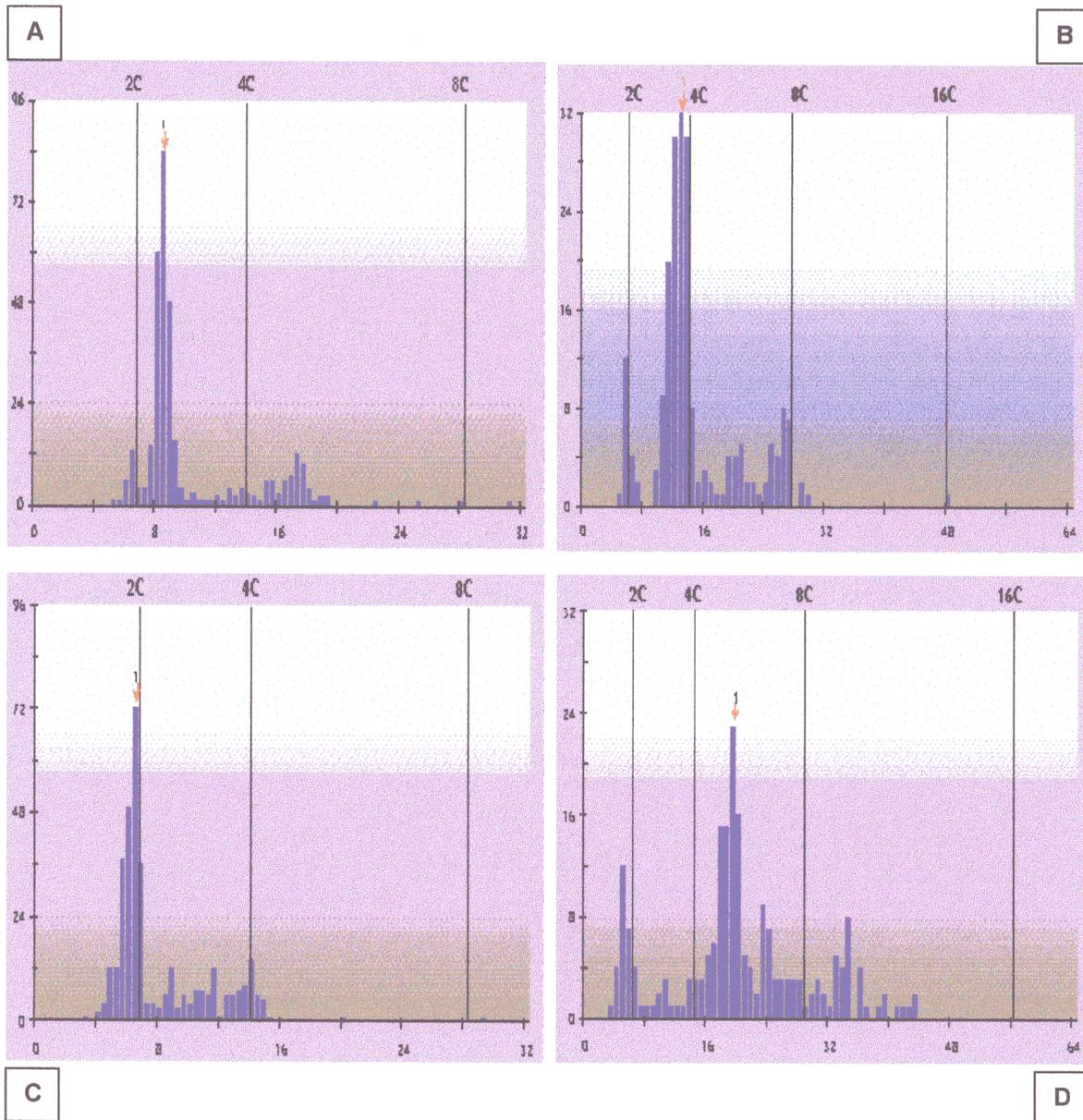


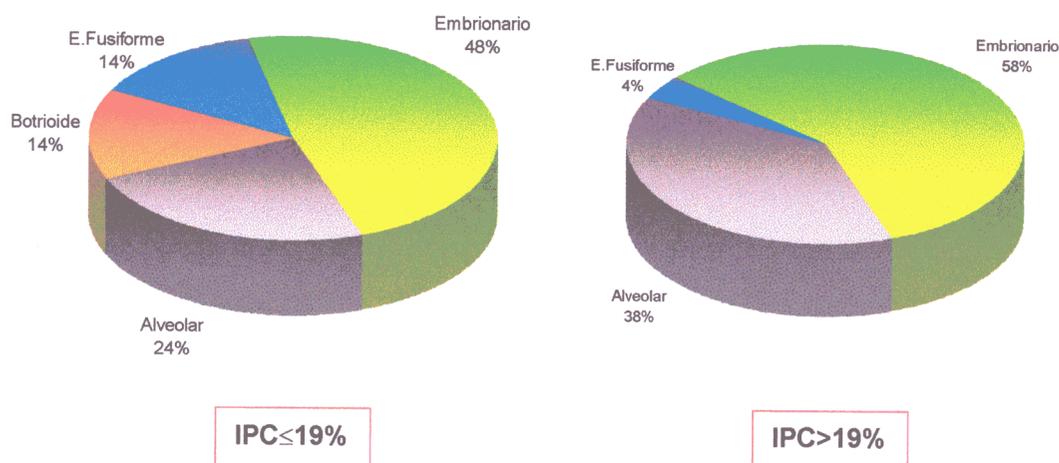
Lámina IV-VIII. Ejemplos de histogramas.:

A.- Hiperdiploide. B.- Tetraploide. C.- Diploide. D.- Poliploide.

### IV. 3.- RESULTADOS DEL ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR.

El estudio IHQ de la actividad proliferativa analizado mediante el Ac MIB-1, demostró que el IPC era bajo ( $\leq 19\%$ ) en 21 casos (46.66 %) y alto ( $> 19\%$ ) en 24 casos (53.34%). Se estudió la asociación de las **características clínico-patológicas y ploidía** de los casos con el IPC y no se encontró significación estadística en las mismas (Tabla IV-IX), pero sí una tendencia a la relación entre el tipo histológico y el IPC que no llegó a tener significación estadística (Fig. IV-22).

Sin embargo, si se detectó asociación estadística significativa del IPC con la **supervivencia** ( $p=0.006847$ ) (Fig IV-20) y el **ILE** ( $p=0.004602$ ) (Fig IV-21).



**Fig IV-22. RESULTADOS. Distribución del tipo histológico según el IPC:**

- \* **IPC  $\leq 19\%$ :** Se observa un predominio relativo de las formas histológicas con buen pronóstico: embrionario botriode (100% de los casos) y embrionario de células fusiformes (75% de los casos).
- \* **IPC  $> 19\%$ :** Se observa un predominio absoluto de las formas histológicas con pronóstico intermedio (58.33% de todos los RMSs embrionarios) y pronóstico adverso (64.28% de todos los RMSs alveolares).

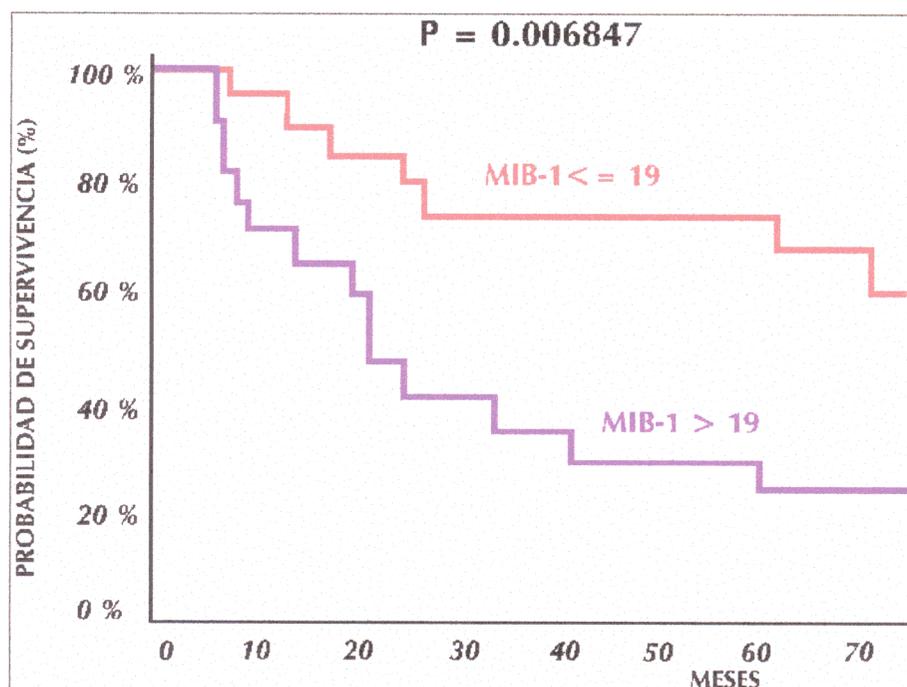


Fig. IV-20. Supervivencia según el IPC ( $\leq$  ó  $>$  19%).

\* Se encuentran diferencias significativas, la supervivencia disminuye en los tumores con mayor IPC.

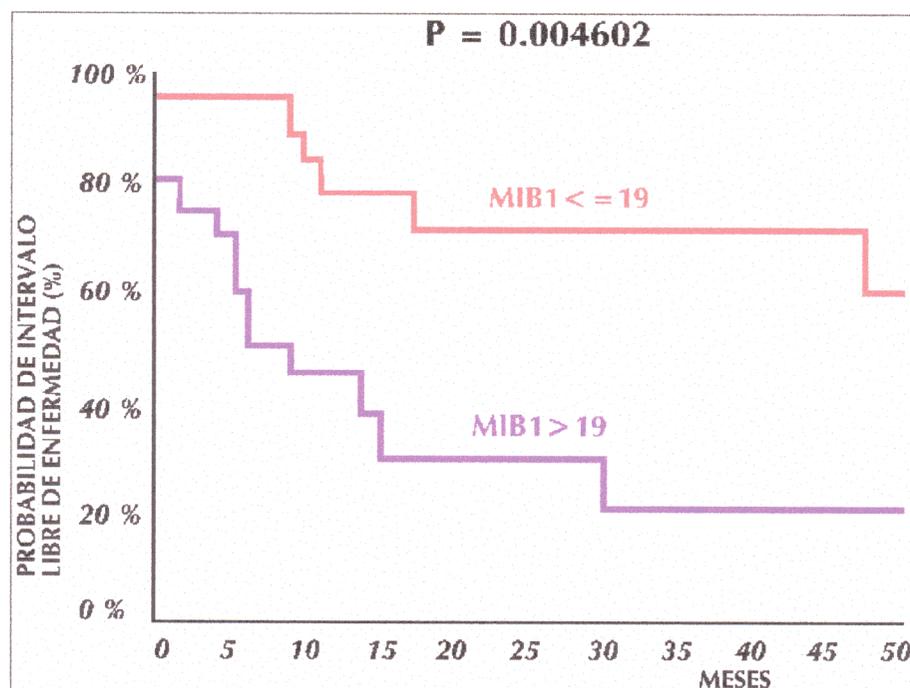


Fig. IV-21. Intervalo libre de enfermedad según el IPC ( $\leq$  ó  $>$  19%).

\* Se encuentran diferencias significativas, el ILE disminuye en los tumores con mayor IPC.

	IPC ≤ 19% (21 casos)	IPC > 19% (24 casos)	VALOR p
<b>EDAD:</b>			
➤ ≤ 8 años:22	11 (52.38%)	11 (45.83%)	p=0.8764590
➤ > 8 años:23	10 (47.62%)	13 (54.16%)	
<b>SEXO:</b>			
➤ Hombre:29	15 (71.42%)	14 (58.33%)	p=0.5537096
➤ Mujer:16	6 (28.58%)	10 (41.66%)	
<b>LOCALIZACIÓN:</b>			
➤ Favorable:16	11 (52.38%)	6 (25%)	p=0.1093463
➤ Desfavorable:28	10 (47.62%)	18 (75%)	
<b>ESTADIO:</b>			
➤ I-II:22	13(61.91%)	9(37.5%)	p=0.8764590
➤ III-IV:23	8 (38.09%)	15(62.5%)	
<b>TIPO HISTOLÓGICO</b>			
➤ Embrionario:31	16 (76.17%)	15(62.46%)	p=0.5121564
➤ Alveolar:14	5 (23.83%)	9 (37.54%)	
<b>PLOIDIA:</b>			
➤ Hiperdiploide:30	15 (75%)	15 (62.5%)	p=0.7324582
➤ Resto:14	5 (25%)	9 (37.5%)	

Tabla IV-X. RESULTADOS. Relación estadística del IPC (mayor o menor de 19%) con diversos parámetros clínicos, histológicos y ploidía.

- \* El porcentaje de tumores con IPC ≤ 19% fue mayor en los niños ≤ de 8 años.
- \* En los RMSs con localizaciones desfavorables era mayor el porcentaje de tumores con IPC>19%.
- \* Todos los tumores en estadio IV tuvieron un IPC>19%.
- \* En los RMSs con patrón histológico favorable (botrioide y de células fusiformes) y desfavorable (alveolar) predominó el IPC≤19% y >19% respectivamente.

#### IV. 4.- ESTUDIO ESTADÍSTICO MULTIVARIABLE.

Tras el análisis de asociación "cruda" (prueba  $\chi^2$ ) entre los parámetros clínicos, histológicos, citométricos e IHQ, es necesario analizar las variables conjuntamente para valorar su asociación, y cuantificar la posible confusión que pueden ejercer algunas sobre otras. Para ello, se planteó el modelo multivariable de regresión de Cox (modelo de riesgo proporcional), con las variables: **edad, localización, ploidía e IPC** para la supervivencia y **edad, localización, estadio, ploidía e IPC** para el ILE.

Tras el análisis multivariante de riesgos proporcionales, 2 factores (**ploidía y localización**)

presentaron influencia pronóstica **independiente** con la **supervivencia** (Tabla IV-X) y 3 factores en el **ILE (ploidía, edad y estadio)** (Tabla IV-XI).

El que el valor p correspondiente a la ploidía sea significativo (p=0.00171 para la supervivencia y p=0.01342 para el ILE) mientras que los IC de cada una de las categorías por separado incluya el valor 1, es debido a que el valor p está estimado conjuntamente.

Una posible interpretación es que globalmente la ploidía tiene un efecto

Significativo, mientras que no tenemos potencia para ver el efecto de cada una de las categorías por separado.

FACTOR	RIESGO RELATIVO	INTERVALO DE CONFIANZA (95%)	SIGNIFICACIÓN
LOCALIZACIÓN	4.24	1.23-14.63	p=0.02094
HIPERDIPLOIDE	0.28	0.11-0.72	p=0.00171
TETRAPLOIDE	0.31	0.06-1.49	

**Tabla IV-X.- Regresión de Cox comparando las variables con la supervivencia.**  
**Modelo :  $\chi^2=15.177781$ , p=0.00183.**

FACTOR	RIESGO RELATIVO	INTERVALO DE CONFIANZA (95%)	SIGNIFICACIÓN
EDAD	4.10	1.61-10.41	p=0.00314
ESTADIO	1.70	1.03-2.79	p=0.03450
HIPERDIPLOIDE	0.72	0.29-1.81	p=0.01342
TETRAPLOIDE	0.84	0.21-3.36	

**Tabla IV-XI.- Regresión de Cox comparando las variables con el ILE.**  
**Modelo  $\chi^2=13.33130$ ; p=0.00144.**

## **V.- DISCUSIÓN**

## **V.- DISCUSIÓN.**

### **V.1.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.**

#### **V.1.1.- EDAD.**

La edad es un factor pronóstico de máxima importancia en dos tumores infantiles, el neuroblastoma y la LLA. Desde hace tiempo se sabe que los neuroblastomas en niños menores de 1 año tienen un pronóstico favorable (Breslow, 1971; Kinnier-Wilson, 1974); al contrario de lo que ocurre en la LLA en donde esta misma edad sugiere un pronóstico desfavorable (Reaman, 1985; Hammond, 1986).

En otros tumores predominantemente infantiles como el RMS, los resultados han sido menos concluyentes; sin embargo, todos los estudios confirman que los RMSs de la infancia presentan unos rasgos clínico-patológicos y un comportamiento biológico distintos a los de los adultos. En estos últimos, la enfermedad, característicamente, muestra factores pronósticos desfavorables (La Quaglia, 1994) como son la presentación en estadios clínicos avanzados, las localizaciones desfavorables y el predominio de subtipos histológicos más agresivos en el momento del diagnóstico. En los RMSs del adulto, la enfermedad cursa con mayor agresividad y la respuesta frente a la terapia multimodal es poco satisfactoria (Lloyd, 1983; De Jong, 1987; Miettinen, 1988; Prestidge, 1989; Nakleh, 1991; La Quaglia, 1994). Por este motivo en nuestro estudio hemos seleccionamos una población homogénea de RMSs, con todos los enfermos por debajo de los 25 años de edad. La distribución por edades de nuestra serie es totalmente superponible a la de otros trabajos (Tsokos, 1992; La Quaglia, 1994; Enzinger, 1995) en los que típicamente adopta un patrón bimodal con un primer y segundo pico alrededor de los dos y 14 años respectivamente (Fig.IV-1).

Tan solo en una publicación previa, con una serie amplia, de RMSs se investiga la asociación de la edad con todos los demás factores clínicos analizados en nuestra serie (La Quaglia, 1994). En este trabajo se demuestra una relación significativa de la edad con la localización y el estadio T del tumor, a diferencia de lo que ocurre en nuestro estudio. Esta disparidad posiblemente se explique por las diferencias en el sistema de estadios clínicos empleado, y en la estratificación aplicada a la edad en las dos series. En la nuestra, hemos utilizado el sistema de estadios clínicos establecido por el IRS (tabla I-XI y I-XIII) (Maurer, 1975; Lawrence, 1987) que es una modificación del sistema TNM; en tanto que en la serie citada (La Quaglia, 1994) se emplea el sistema TNM. Además, nuestra serie esta constituida exclusivamente por RMSs infantiles y consideramos la edad de forma cualitativa en dos categorías que son menor o mayor de 8 años; mientras que La Quaglia (La Quaglia, 1994) estudia una serie de RMSs heterogénea, constituida por adultos y niños, y considera la edad como una variable cuantitativa continua.

En nuestro estudio no hemos observado relación significativa entre la edad del paciente en el momento del diagnóstico y el tipo histológico (Tabla IV-II), lo que no concuerda con algunos trabajos previos (Caillaud, 1989; Tsokos, 1992; La Quaglia, 1994; Wijnaendts, 1994; Harms, 1995; Coffin (A), 1997), en los que el tipo histológico alveolar se asocia a una edad media superior a la del tipo embrionario. En nuestra serie la edad media del RMS alveolar (9.6 años) es sólo ligeramente superior a la del embrionario (8.4 años).

Uno de los resultados más interesantes del presente estudio es la asociación significativa entre el tipo de histograma de la ploidía y la edad, de forma que el análisis estadístico puso de manifiesto que los RMSs hiperdiploides se asociaban de forma significativa con la edad inferior a 8 años. El hecho de que además los RMSs hiperdiploides se asocien a un mejor

comportamiento clínico, podría sugerir que los RMSs en niños menores de 8 años tienen un origen biológico diferente o mecanismos diferentes de progresión tumoral. Sin embargo, con los datos actuales no podemos asegurar si los RMSs en niños menores de ocho años tienen una menor agresividad por ser tumores hiperdiploides o, por el contrario, si la mayor supervivencia es un reflejo de una mejor tolerancia y respuesta a la quimioterapia en estos enfermos. En un trabajo reciente que valora ambos parámetros no se ha encontrado que la ploidía se asocie a la edad (De Zen, 1997) y no tenemos constancia de que ningún otro estudio haya evaluado esta asociación.

Nuestros resultados demuestran que la edad en el momento del diagnóstico es un factor pronóstico de gran importancia. Si ya la asociación de la edad con la supervivencia resultó ser estadísticamente muy significativa cuando la estratificamos en dos grupos (mayores y menores de ocho años) (Fig. IV-2), lo fue más aún cuando la estratificamos en tres (menores de ocho años, entre nueve y 15 años y mayores de 15 años) (Fig. IV-4). Hay que resaltar el hecho de que todos los niños mayores de 15 años fallecían antes de transcurridos 30 meses desde el primer diagnóstico. Además este grupo de pacientes de más de 15 años de edad, presentaba una gran heterogeneidad en el resto de los factores pronósticos y, lo que es aún más sorprendente, estos restantes parámetros clínicos no eran tan desfavorables como cabría esperar. A la vista de estos resultados cabe sugerir que la edad superior a los 15 años puede ser un factor pronóstico adverso con valor independiente, lo que no hemos podido demostrar estadísticamente en nuestro estudio multivariable al no disponer de una muestra lo suficientemente amplia.

Según nuestros resultados, parece claro que en los RMSs infantiles la estratificación de la edad con fines pronósticos es más adecuada en los tres grupos definidos anteriormente ya

que esto nos permite identificar a un grupo de niños con pronóstico extremadamente malo, constituido por los mayores de 15 años.

La mayor parte de los estudios previos no han encontrado diferencias significativas en el pronóstico según la edad (Ragab 1986; Maurer 1988; Maurer 1993; Mameghan 1993; Wijnaendts, 1993; Wijnaendts 1994; Niggli, 1994; Crist, 1995; De Zen, 1997). Por el contrario, en otros estudios recientes si aparece la edad como factor pronóstico en el RMS (Crist, 1990; Kilpatrick, 1994; La Quaglia, 1994; Andrassy, 1996).

En nuestro estudio, así como en el de Kilpatrick (Kilpatrick, 1994), se ha demostrado que los RMSs en niños menores de 8 y 10 años respectivamente, tienen mejor pronóstico. En otro de estos estudios (Crist, 1990), se estratifica la edad en tres grupos y el pronóstico más favorable es para el grupo de edad intermedia. Pensamos que las diferencias con nuestros resultados pueden ser debidas a la diversidad de criterios para estratificar la edad y a la heterogeneidad de las series; nosotros determinamos los puntos de corte con mayor significado estadístico que fueron 8 y 15 años; mientras que en la serie antes citada, los puntos de corte fueron 6 y 10 años (Crist, 1990).

Por último, nuestro resultados son difícilmente comparables con las otras dos series en que la edad tiene valor pronóstico, al considerar éstas la edad como variable continua o por valorar únicamente RMSs de extremidades (La Quaglia, 1994; Andrassy, 1996).

La influencia de la edad en el ILE está insuficientemente estudiada en el RMS, pero es muy probable, como se ha demostrado en otras series (Rodary, 1988; Reboult-Marty, 1991; La Quaglia, 1994) y en la nuestra, que exista una influencia significativa de la edad en dicho ILE (Fig. IV-5). En nuestros resultados el ILE se incrementa al disminuir la edad, al igual que ocurre con la supervivencia, lo que sugiere que la aparición de recidivas tiene

una influencia decisiva en la supervivencia como consecuencia del fracaso terapéutico.

Finalmente en nuestro estudio multivariable, se ha demostrado una influencia significativa de la edad, empleada como variable categórica mayor o menor de 8 años, en el ILE. No podemos comparar nuestros resultados con los de otras series puesto que hasta ahora no ha habido ningún estudio multivariable que investigué si la edad es un factor pronóstico independiente respecto al ILE. Únicamente hay un estudio estadístico multivariable realizado por La Quaglia (La Quaglia, 1994) en el que se detecta una asociación estadística independiente entre la edad y la supervivencia.

### **V.1.2.- SEXO.**

La distribución por sexo de los RMSs estudiados en nuestra serie coincide con la publicada en la literatura (Newton, 1988; Maurer, 1988; Molenaar, 1988; Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Reboult-Marty, 1991; Shapiro, 1991; Maurer, 1993; Enzinger, 1995; De Zen, 1997) y evidencia que el RMS es una neoplasia más frecuente en varones (razón H/M=1.8).

Nuestro análisis no detectó asociación estadística entre el sexo y el resto de parámetros clínicos (tabla IV-III y IV-V). Estos resultados no podemos compararlos con los de otras series puesto que hasta ahora no se ha llevado a cabo ningún otro estudio que valore esta asociación.

No obstante, según algunos autores (Newton, 1988; Molenaar, 1988; Caillaud, 1989; Enzinger, 1995) existe un predominio del RMS embrionario en el sexo masculino, pero esta asociación no ha sido demostrada estadísticamente. Cuando comparamos la distribución del tipo histológico según el sexo en nuestra serie apreciamos que: a) el tipo histológico predominante en los dos sexos es el embrionario; b) el porcentaje de varones y

hembras con RMS embrionario es del 66% y 75% respectivamente; c) el porcentaje de varones y hembras con RMS alveolar es de 34% y 25% respectivamente y d) no encontramos asociación estadística entre el sexo y el tipo histológico, como en la mayoría de las series publicadas en la literatura.

Por último, el análisis de la relación entre el sexo y el pronóstico en el RMS, no ha proporcionado resultados estadísticamente significativos en nuestra serie al igual que ocurre en la mayoría de las publicaciones. Existe sólo un estudio de la SIOP (Rodary, 1988), constituido por 281 RMSs infantiles no metastásicos en el que se demuestra que el sexo es un factor pronóstico independiente y más adverso para las niñas.

### **V.1.3.- LOCALIZACIÓN.**

En el presente estudio se clasificaron los RMSs en función de su lugar de origen en dos grupos: localización favorable y localización desfavorable (tabla I-XI), siguiendo un sistema de clasificación ampliamente aceptado (Sutow, 1970; Raney, 1981; Gehan, 1981; Tsokos, 1992); sin embargo, los sistemas de clasificación empleados por otros autores (Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Wijnaendts, 1994; La Quaglia, 1994; De Zen, 1997) son heterogéneos.

La distribución de nuestros RMSs en función de la localización, es superponible a la de otras series (Wijnaendts 1994, De Zen 1997, Tsokos 1992), con un acusado predominio de los tumores localizados en cabeza y cuello (45%), seguidos de la localización en extremidades (17.77%) y aparato genitourinario (15.55%). Tan sólo observamos en nuestra serie un porcentaje ligeramente mayor de RMSs en las extremidades y un menor número de RMSs genitourinarios, con respecto a otros trabajos (Rodary, 1988; La Quaglia, 1994).

Con respecto a la relación entre la localización y el resto de parámetros clínicos, nuestros resultados no reflejan ninguna asociación estadísticamente significativa. En lo que conocemos ningún estudio ha analizado la asociación de la localización con el resto de parámetros clínicos.

La asociación de la localización con el tipo histológico no es estadísticamente significativa (Tabla IV-V, IV-VI y fig. IV-8), aunque sí existe una tendencia a dicha relación, de forma que hemos observado un mayor porcentaje de RMSs embrionarios en localizaciones favorables (88%) y hemos comprobado que, en las localizaciones desfavorables, el tipo histológico predominante es también el embrionario pero en una menor proporción (57 %). Sin embargo, existen tres publicaciones previas, con series amplias y estudios estadísticos multivariados, que detectan asociación estadística entre la localización y el tipo histológico (Caillaud, 1989; Andrassy, 1996; De Zen, 1997).

En cuanto al valor pronóstico de la localización, se halla bien reconocido en la literatura (Sutow, 1970; Neifeld, 1979; Gehan, 1981; Lawrence, 1987; Maurer, 1988; Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Crist, 1990; Rodary, 1991; Tsokos, 1992; Wijnaendts, 1994; Newton, 1995; Nakanishi, 1997) y en algunos trabajos aparece como el marcador pronóstico más importante (Rodary, 1988). En nuestra serie encontramos también una asociación estadística muy significativa con la supervivencia (fig IV-9) y el ILE (fig IV-10). Estos resultados son semejantes a los obtenidos por otros autores, aun cuando los datos procedieran de diferentes esquemas de clasificación según la localización.

Es de reseñar que el nexo entre localización favorable/RMS embrionario/buen pronóstico aparece confirmado en nuestra serie y en la práctica totalidad de los estudios publicados (tabla IV-VI y fig IV-9). Sin embargo, esta asociación no es tan clara en los RMSs con

localizaciones desfavorables, especialmente los RMSs parameníngeos (Rodary, 1988; Caillaud, 1989; Wijnaendts, 1994) y de extremidades (Gehan, 1981; Andrassy, 1996) en donde la localización determina el pronóstico independientemente del tipo histológico. Estos resultados, que señalan un peor pronóstico para los tumores parameníngeos y de extremidades, se confirmaron por nosotros, lo que podría justificar que el tipo histológico no sea un factor pronóstico en nuestra serie y sea la localización desfavorable del tumor lo que determine el mal pronóstico de nuestros RMSs.

De cualquier forma, parece claro que en los RMSs la localización aporta información pronóstica, como queda demostrado en el estudio estadístico multivariable de nuestra serie, en el que la localización aparece como un factor pronóstico independiente en la supervivencia pero no en el ILE. Pensamos que el valor pronóstico de la localización en el ILE queda enmascarado por la edad, como posible factor de confusión.

#### **V.1.4.- ESTADIO.**

El estadio clínico, que es un marcador pronóstico muy importante en el RMS según otras series (Donaldson, 1984; Lawrence, 1987; Rodary, 1988; Reboult-Marty, 1991; Gansey, 1991; Wijnaendts, 1994; Crist, 1995; Newton, 1995), no mostró en la nuestra relación significativa con la supervivencia, aunque sí con el ILE (Fig IV-12 y IV-13).

Según algunos de los estudios citados, el comportamiento biológico de los RMSs infantiles varía según la localización y el tipo histológico del tumor, aún cuando presenten un mismo estadio clínico (Lawrence, 1987; Rodary, 1988; Maurer, 1993), de forma que tumores con estadio clínico “favorable” pueden presentar una mala respuesta al tratamiento y a la larga una evolución fatal o a la inversa (Pappo (B), 1995).

Aunque hay algunos trabajos en los que el estadio clínico no se asocia significativamente con el pronóstico (De Zen, 1997), en la mayoría de los estudios publicados, aparece como variable pronóstica independiente (Donaldson, 1984; Lawrence, 1987; Rodary, 1988; Reboult-Marty, 1991; Gansey, 1991; Wijnaendts, 1994; Crist, 1995; Newton, 1995). En este sentido nuestra serie es equiparable a otra, de tamaño similar (De Zen, 1997), en la que el estadio clínico tampoco tiene valor pronóstico. La presente serie no es tan amplia como la de los grandes comités internacionales, que han detectado dicha asociación y el número de tumores en estadio I y IV representa solamente el 10% del total de los casos (9 (20%) y 4 (9%) casos respectivamente). Además, en nuestra serie se produce una fuerte asociación del estadio I con el tipo histológico alveolar (100% de los casos), lo que podría justificar el pronóstico más adverso de dicho estadio I, así como la falta de significación pronóstica independiente del estadio clínico en la supervivencia. Ahora bien, pensamos que estos resultados podrían corregirse aumentando el tamaño de la serie o bien prolongando el seguimiento de los pacientes, como se demuestra a continuación.

*Al analizar el ILE hemos pretendido suplir parcialmente la falta de seguimiento clínico adecuado en nuestros casos más recientes. En efecto, puesto que en el RMS las recidivas locales se producen de forma precoz y reflejan la mala respuesta al tratamiento, nuestros resultados indican una elevada relación estadística entre el ILE y el estadio clínico, que además mantuvo una significación independiente en el estudio estadístico multivariable. Un solo estudio (Rodary, 1988) ha demostrado al igual que el nuestro, la influencia del estadio clínico en el ILE de los RMSs.*

### **V.1.5.- TIPO HISTOLÓGICO.**

La distribución por tipo histológico de los RMSs de nuestra serie, con un moderado predominio del RMS embrionario (31 casos-69%), es totalmente superponible a lo descrito en la literatura (Newton, 1988; Wijnaendts, 1993; Newton, 1995; De Zen, 1997). Estos resultados nos permiten deducir, que no se han producido defectos en la aplicación del sistema de clasificación histológica.

Como ya se ha comentado, hay estudios que indican una estrecha relación del tipo histológico con la edad (Caillaud, 1989; Tsokos, 1992; La Quaglia, 1994; Wijnaendts, 1994; Coffin (A), 1997; Harms, 1995) y la localización (Caillaud, 1989; Andrassy, 1996; De Zen, 1997). Sin embargo, el análisis de nuestros resultados no reveló una asociación estadísticamente significativa entre el tipo histológico y los otros parámetros clínicos valorados en este estudio, pero si se detectó una tendencia a la asociación con la localización que no llegó a ser estadísticamente significativa.

Aunque hay estudios que indican una estrecha relación entre tipo histológico y pronóstico (Enzinger, 1969; Sutow, 1970; Harms, 1995; Newton, 1988; Tsokos, 1992; Mameghan, 1993; La Quaglia, 1994; Wijnaendts, 1994; Newton, 1995); en otros muchos trabajos (Jaffe, 1973; Marsden, 1976; Gehan, 1981; Bale, 1983; Suder, 1986; Rodary, 1988; De Zen, 1997), entre ellos el nuestro, no se demuestra esta asociación con la supervivencia ni con el ILE. Pensamos que esta disparidad puede ser debida a la gran heterogeneidad regional del tumor, a la diversidad de clasificaciones histológicas empleadas y, sobre todo, a la falta de criterios morfológicos estrictos para separar los diferentes tipos histológicos (Horn, 1958; Palmer, 1981; Newton, 1988; Caillaud, 1989; Tsokos, 1992; Newton, 1995).

La principal utilidad del nuevo sistema de clasificación, propuesto por el IRS (Newton,

1995) y que ha sido el empleado en este estudio, es la categorización de los RMSs según su valor pronóstico, pero una importante limitación de este y otros sistemas de clasificación es, como ya hemos comentado anteriormente, la ausencia de una definición correcta, detallada y precisa de todos los tipos histológicos. Por otra parte, todavía esta por comprobar si al aplicar esta nueva clasificación los patólogos no expertos, existe una adecuada concordancia y una efectiva relación con el pronóstico.

De cualquier forma, parece claro que el estudio del tipo histológico con fines pronósticos sigue siendo complejo a pesar del creciente interés por parte de diferentes comités coordinadores internacionales por unificar criterios y crear una clasificación histológica universal (Gerson, 1978; Flamant, 1984, Flamant, 1985; Rodary, 1988; Maurer, 1988; Newton, 1988; Caillaud, 1989; Crist, 1990; Maurer, 1993). En este trabajo hemos utilizado los criterios de la nueva clasificación internacional (Newton, 1995) aunque con algunas aportaciones que pensamos pueden contribuir a tipificar correctamente a los RMSs y que no están suficientemente descritas en la literatura. La clasificación y criterios empleados en nuestro estudio fueron:

➤ **RMS con buen pronóstico .**

- **RMS EMBRIONARIO BOTRIOIDE:** En nuestra opinión el RMS embrionario botrioide es una entidad bien establecida y fácilmente separable, desde el punto de vista histológico y macroscópico, del resto de los RMSs. El aspecto histológico en los tres casos de nuestra serie fue similar a lo descrito previamente por otros autores (Horn, 1958; Tsokos, 1992; Asmar, 1994; Newton, 1995). Todos los casos fueron tumores polipoides y poco celulares, que estaban localizados en la submucosa y

mostraban una densa lámina de células tumorales debajo del epitelio del órgano de origen (dos en vejiga y uno en nasofaringe). Esta lámina conocida como capa de cambio de Nicholson (Nicholson, 1950) en ocasiones era focal. El estroma fue laxo, edematoso y con frecuente degeneración mixoide (lámina IV-VI). Citológicamente los RMSs botrioides de nuestra serie estaban constituidos por células fusiformes u ovoideas, poco atípicas, con diferenciación rabiomioblástica pero sin estriaciones llamativas. La edad media en nuestra serie fue de 3.1 años y los estadios clínicos fueron variados (Tabla V-III). Todos nuestros casos están vivos y sin evidencia de enfermedad a pesar de que uno de ellos, localizado en el cavum, se diagnosticó en estadio III. Finalmente pensamos que la separación del RMS embrionario botrioides está justificada, pues su localización, histología y pronóstico confirman la conveniencia de conocer adecuadamente este tipo de neoplasia.

- **RMS EMBRIONARIO DE CÉLULAS FUSIFORMES:** Las peculiaridades del RMS embrionario de células fusiformes son histológicas y de comportamiento. El aspecto histológico de los cuatro casos de nuestra serie fue similar al descrito recientemente en la literatura (Cavazzana, 1992; Leuscher, 1993; Newton, 1995). Histológicamente los tumores de nuestra serie fueron densos, con un crecimiento difuso, y estaban constituido por células ligeramente pleomórficas y fusiformes. El aspecto citológico y el patrón de crecimiento recordaba al del leiomiocarcinoma (Cavazzana, 1992; Leuscher, 1993) (lámina IV-VII). Estas células tenían marcada diferenciación rabiomioblástica con citoplasmas amplios, fuertemente eosinófilos y estriaciones transversales frecuentes. Los núcleos presentaban nucléolo ocasional,

cromatina granular y una atipia nuclear y mitosis variables. El estroma fue escaso y rico en colágeno en todos los casos. La edad media fue de 7.3 años y los estadios clínicos (Tabla V-III) y la localización fue variable (dos casos en vejiga y otros dos en región paratesticular). Todos nuestros casos están vivos, aunque dos de ellos de reciente evolución no están libres de enfermedad. El mejor comportamiento biológico de este subtipo de RMS embrionario justifica su separación como entidad en la nueva clasificación histológica internacional (Newton, 1995).

➤ **RMS con pronóstico intermedio.**

- **RMS EMBRIONARIO CONVENCIONAL:** Histológicamente es un tumor muy polimorfo, con crecimiento difuso e infiltrativo, constituido por células con atipia y grado de diferenciación variable. La morfología de las células es muy variable, en ocasiones predominan las formas alargadas o estrelladas con diferente grados de diferenciación rabdomioblástica (lámina IV-I). Otras veces predominan las células redondas, pequeñas, sin apenas diferenciación rabdomioblástica. Es característico el polimorfismo celular, de modo que se mezclan los diferentes tipos de células en diferentes áreas del tumor. Un hecho prácticamente constante, aunque a menudo focal, es la degeneración mixoide del estroma (lámina IV-III). La presencia de degeneración mixoide en el estroma, el patrón de crecimiento difuso, no nodular, así como la condensación celular multifocal han sido los principales criterios que hemos empleado para clasificar al RMS como embrionario y diferenciarlo del RMS alveolar sólido (Tabla V-I). En cuanto a las características nucleares, la cromatina es más fina y el núcleo más pequeño que en el RMS alveolar, de forma que la atipia nuclear nunca es tan importante como en este último (lámina IV-II). La edad media



de los 24 casos de nuestra serie fue de 14.8 años y la localización y estadio clínico (Tabla V-I) fueron muy variables, aunque con un claro predominio del estadio III (54%). La supervivencia fue del 46% y 17% a los dos y cinco años respectivamente.

➤ **RMS con pronóstico adverso.**

- **RMS ALVEOLAR:** La variante clásica del RMS alveolar es fácil de identificar y está perfectamente descrita en la literatura (Horn, 1958; Caillaud, 1989; Tsokos, 1992; Newton, 1995). Está constituido por células redondas, de tamaño variable, con citoplasma escaso y eosinófilo. Los núcleos son muy pleomórficos, hipercromáticos con cromatina tosca, ausencia de nucléolo y una alta relación núcleo/citoplasma. Estas células se disponen alrededor de ejes de tejido conectivo y remedan a tumores de estirpe epitelial, los nidos tumorales a veces están centrados por células gigantes multinucleadas (lámina IV-IV).

La variante sólida del RMS alveolar es más difícil de identificar. Se caracteriza por tener los mismos rasgos citológicos en ausencia de patrón alveolar. En nuestra opinión, además de las características citológicas, los gruesos haces de tejido conectivo que dan al tumor un carácter nodular, la ausencia de estroma mixoide y las ocasionales células gigantes multinucleadas (lámina IV-V) son datos suficientes para basar el diagnóstico de RMS alveolar (Tabla V-I). La edad media de los 14 casos de nuestra serie fue de 9.64 años y la localización y estadio clínico (Tabla V-I) fueron variables. La supervivencia fue del 64% y 12% a los dos y cinco años respectivamente.

En nuestra opinión, la variante atípica del RMS embrionario descrita en la clasificación del

INC (Tsokos, 1992) y el RMS alveolar sólido son entidades diferentes, pero difícilmente separables desde el punto de vista histológico, especialmente cuando se estudian biopsias con material escaso. Durante mucho tiempo, hasta ser descrita la variante sólida del RMS alveolar, ambos tipos habían permanecidos confundidos (Tsokos, 1992). Esta posibilidad de confusión entre el RMS embrionario atípico y el RMS alveolar sólido, en nuestra opinión, no ha sido convenientemente resaltada en la literatura, y lo que es aún más importante, no se han descrito detalladamente las características histológicas de ambas entidades.

El valor pronóstico del tipo histológico en los RMSs sigue siendo objeto de controversia, lo que procede en gran parte de una falta de uniformidad de criterios de clasificación, así como de la gran importancia que tienen otros factores pronósticos adicionales. En nuestro estudio, no hemos encontrado relación estadística entre tipo histológico y pronóstico lo cual podría estar justificado por que en nuestra serie, el RMS embrionario, que constituye la mayor parte de los casos, mostraba factores pronósticos adversos como son la presentación en estadios clínicos avanzados (62.5%) y una edad media alta (14.8 años).

Nuestra impresión es que el tipo histológico es posiblemente un factor pronóstico en el RMS, que debe ser descrito con mayor precisión en la literatura. Según se desprende de nuestro estudio, los tipos histológicos favorables (RMS botrioide y RMS de células fusiformes) y adversos (RMS alveolar) podrían tener valor pronóstico; mientras que el tipo embrionario es un grupo más heterogéneo en el que el pronóstico debe venir determinado por otros factores. Lamentablemente estos resultados no se han podido confirmar en el estudio estadístico debido al pequeño tamaño de la muestra en algunas de estas variantes histológicas.

	CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS	
	RMS EMBRIONARIO ATÍPICO	RMS ALVEOLAR SÓLIDO
<b>PATRÓN</b>	Difuso	Multinodular
<b>ESTROMA</b>	Mixoide	Ausente (tejido conectivo denso entre grupos celulares grandes)
<b>CÉLULAS GIGANTES</b>	No	Si (frecuentes)
<b>DENSIDAD CELULAR</b>	Condensación celular multifocal	Densidad celular uniforme
<b>ATIPIA NÚCLEAR</b>	+ / ++	+++

Tabla V-III. Diagnóstico diferencial entre RMS embrionario atípico y RMS alveolar sólido.

## V-2.- CONTENIDO CELULAR DE ADN.

La ploidía es un factor de máxima importancia en el pronóstico de dos tumores infantiles, el neuroblastoma y la LLA; sin embargo, en otros tumores infantiles como el sarcoma de Ewing, el meduloblastoma y el RMS los resultados no han sido tan concluyentes.

En la mayoría de los tumores infantiles, la respuesta a la quimioterapia es un dato crucial en el pronóstico. La utilidad de la determinación de la ploidía en el neuroblastoma y la LLA radica precisamente en que determina los casos que serán más sensibles a la quimioterapia, que son precisamente los aneuploides (Look, 1984; Oppedal, 1988; Bourhis, 1991; Brodeur, 1992; Huddart, 1993).

El RMS no es una excepción. Cuando se empleaba únicamente la cirugía, la tasa de supervivencia se situaba alrededor del 33 % mientras que se elevó al 70% con el empleo de quimioterapia adyuvante (Lawrence, 1964; Sutow, 1970; Neifeld, 1979; Flamant, 1984; Donaldson, 1985; Crist, 1995; Pappo (A), 1995). Estos datos constituyen la base teórica por la que se ha investigado el valor pronóstico de la ploidía en este tumor.

En el RMS infantil los primeros estudios de cuantificación de ADN se realizaron en series muy reducidas, y parecían indicar una escasa utilidad pronóstica de esta técnica, ya que obtenían un porcentaje muy elevado de aneuploidía (Boyle, 1988; Molenaar, 1988). Estos y otros estudios previos, que investigaron el valor pronóstico de la ploidía en los RMSs, comprendían series cortas o heterogéneas, considerando a la vez otros sarcomas infantiles o incluyendo RMSs del adulto (Boyle, 1988; Molenaar, 1988; Kowal-Vern, 1990; Leuschner, 1991; Dias, 1992; El Naggar, 1993; Kilpatrick, 1994), por lo que sus resultados no son consistentes. En dos trabajos consecutivos con RMSs infantiles en estadio III (Shapiro, 1991; Pappo, 1993) y IV (Shapiro, 1991) se observó una estrecha relación entre contenido de ADN, tipo histológico y pronóstico. Los RMSs de tipo embrionario se asociaban de forma casi exclusiva a un contenido de ADN hiperdiploide (índices de ADN comprendidos entre 1.10 y 1.80) que conllevaba un pronóstico favorable. Por el contrario, un contenido de ADN casi tetraploide (índices de ADN entre 1,80 y 2,60) estaba fuertemente asociado a un patrón histológico alveolar y a una evolución desfavorable. Según estos estudios, la ploidía se configuraba como el factor que mejor predecía la respuesta al tratamiento y abría el camino hacia nuevos protocolos terapéuticos (Shapiro, 1991; Pappo, 1993).

Existen sólo tres publicaciones previas, con series amplias y estudios estadísticos multivariados, que investiguen el valor pronóstico de la ploidía frente a los demás factores clinicopatológicos en los RMSs infantiles (Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997). En los tres estudios se confirma, que el contenido de ADN tiene una influencia independiente sobre la supervivencia de los RMSs. En las tres series (Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997) se demuestra que los tumores hiperdiploides tienen mejor

pronóstico que los diploides y tetraploides. En nuestro estudio, así como en el de Wijnaendts (Wijnaendts, 1993), se ha separado además un grupo de casos que presentan múltiples poblaciones aneuploides que, comparativamente, tienen peor pronóstico. En los restantes estudios, o no encuentran este tipo de histograma poliploide (Niggli, 1994; De Zen, 1997), o los clasifican de acuerdo al índice de ADN del pico situado más a la izquierda, que a veces es diploide o hiperdiploide (Shapiro, 1991; Pappo, 1993).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio confirman el pronóstico favorable de los RMSs hiperdiploides y coinciden en términos generales con lo encontrado en las tres series anteriores (Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997). Sin embargo, la supervivencia de los tumores hiperdiploides en nuestra serie fue inferior (55% a los 5 años) a la observada en estos trabajos donde la supervivencia fluctuó entre el 90% y el 68% a los cinco años (Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997). Además, contrariamente a lo que se observa en dos de estas series (Niggli, 1994; De Zen, 1997) en los que los tumores con histogramas tetraploides se asociaban al peor pronóstico, nuestros resultados fueron equiparables a los de Wijnaendts (Wijnaendts, 1993) en donde los casos con histograma tetraploide tenían un pronóstico relativamente favorable, con una supervivencia en torno al 50% a los 5 años. Por lo que respecta a los RMSs diploides y poliploides, que constituyen el 13% y el 7% de nuestra serie respectivamente, su pronóstico adverso no difiere significativamente de la serie de Wijnaendts (Wijnaendts, 1993). En este sentido, nuestro estudio indica que se pueden separar fácilmente dos grupos de pacientes en extremos opuestos: aquellos que tienen una supervivencia superior al 50% a los 5 años, que corresponderían a los tumores con histogramas hiperdiploides y tetraploides y los que tienen una supervivencia del 0% a los 5 años que estaría constituido por los tumores

diploides y poliploides.

Parece claro que en los RMSs el estudio de la ploidía con fines pronósticos no puede limitarse a separar los casos aneuploides de los diploides, como se pretendía en las primeras publicaciones sobre el tema, sino que los tumores deben clasificarse en una de las cuatro categorías definidas según el tipo de histograma (diploides, hiperdiploides, tetraploides o poliploides). En nuestros resultados hemos comprobado como la significación pronóstica de la ploidía cuando se la separa en estos cuatro grupos (fig IV-17) y supera llamativamente a la que se obtiene cuando se compara la supervivencia de los hiperdiploides frente al resto (fig IV-18). Esto sugiere que puede haber al menos cuatro categorías biológicas diferentes de RMSs (hiperdiploide, tetraploide, diploide y poliploide) con diferente pronóstico, como también se detecta en otro trabajo anterior (Wijnaendts, 1993).

La significación pronóstica del histograma tetraploide está por aclarar. Dos autores (Niggli, 1994; De Zen, 1997) han descrito una asociación entre tetraploidía y pronóstico adverso, mientras nuestros resultados y los de otro estudio (Wijnanendts, 1993) encuentran un pronóstico intermedio o bueno en estos casos. Si se analizan detenidamente los cinco casos con histograma tetraploide de nuestra serie, observamos que tuvieron un pronóstico relativamente bueno, a pesar de que el resto de los parámetros clínico-patológicos analizados eran predominantemente desfavorables en esos pacientes (tabla V-IX), esto sugiere que la tetraploidía puede ser por sí sola un factor con influencia favorable en el pronóstico de los RMSs.

El hecho de que algunos autores hayan observado un cambio en el tipo de histograma de la metástasis o recidiva, respecto del RMS primario, puede ser reflejo de la mayor capacidad

metastatizante de uno de los clones tumorales, así como de la gran heterogeneidad biológica de este sarcoma (Molenaar, 1988). Nuestros resultados no mostraron diferencias en el tipo de histograma, cuando analizamos la recidiva de cuatro RMSs, a pesar de la marcada citodiferenciación detectada en una de esas recidivas.

En nuestro trabajo hemos demostrado también una influencia significativa de la ploidía en el ILE, factor que no se había estudiado previamente. El ILE resultó máximo en los casos tetraploides e hiperdiploides y mínimo en los poliploides. El ILE en los RMSs es un parámetro que define fielmente la evolución clínica puesto que los casos fatales se caracterizan por presentar recidivas tempranas o ILE inexistentes, como consecuencia del fracaso terapéutico.

Aunque en el momento actual la CMF es la técnica más utilizada y la más estandarizada para la determinación de la ploidía, hay cada día más trabajos que ponen de manifiesto la validez de la CME (Lanigan, 1993; Böcking, 1995). Está ampliamente demostrado en la literatura (Merkel, 1990; Bauer, 1990; Lanigan, 1993; Clemo, 1993) que, para el análisis de la ploidía, la CME, es equiparable o superior incluso a la CMF en sensibilidad a la aneuploidía (Kilpatrick, 1994), siempre y cuando se realice sobre núcleos completos extraídos del bloque de parafina y no sobre secciones histológicas (Leader, 1994). Mediante CMF, la presencia de abundantes células inflamatorias o no neoplásicas produce un efecto de dilución e impide la detección de posibles poblaciones aneuploides peridiploides, así como pequeños clones celulares aneuploides; en cambio, con la CME, las células inflamatorias se excluyen visualmente y el observador puede seleccionar, por lo general, los núcleos con mayor grado de atipia.

De esta forma, aunque la mayor parte de los estudios previos sobre ploidía en los RMSs

han utilizado la CMF como técnica de cuantificación del ADN, creemos que no existe ningún motivo que impida comparar nuestros resultados obtenidos con CME y dichos resultados previos. El presente estudio constituye la serie más amplia que determina la utilidad de la CME en los RMSs y sus resultados han sido similares a los obtenidos por otros autores con CMF (Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997), demostrando además la asociación estadística más significativa publicada hasta el momento.

Por último, un problema más complicado se plantea por las variaciones del contenido de ADN que pueden ocurrir dentro de un mismo tumor, como resultado de la heterogeneidad regional. Este hecho se llega a producir hasta en un 20-30% de algunos tumores (Kallioniemi, 1988) y su incidencia en el RMS está pendiente de estudio.

Hemos comparado las diferentes variables clínicas e histológicas analizadas en los RMSs de este estudio con la ploidía, representada por el tipo de histograma (tabla IV-VIII). Al analizar la edad se demostró que el porcentaje de tumores hiperdiploides en niños menores de 8 años era más elevado (85%) que en los mayores de esta edad (52%). En ellos la distribución por histogramas era más heterogénea. Además, el análisis de estos datos muestra una asociación estadística significativa (tabla IV-VII). Estos resultados, sugieren un origen biológico diferente y un comportamiento clínico menos agresivo para los RMSs que aparecen en niños menores de 8 años. En este sentido, en un trabajo reciente no se ha encontrado que la ploidía se asocie a la edad (De Zen, 1997) y no tenemos constancia de que ningún otro estudio haya valorado esta asociación.

Hemos comprobado también como los RMSs hiperdiploides no se asociaban significativamente con el sexo, la localización, el estadio clínico y el IPC. Estos resultados difieren de los aportados por algunos autores que demostraron relación estadística entre la

ploidía y la localización (Wijnaendts, 1993; De Zen, 1997) y el IPC (Niggli, 1994; De Zen, 1997), de manera que los tumores hiperdiploides se localizaban preferentemente en el tracto urogenital y tenían baja actividad proliferativa ( $\leq 19\%$ ). Por el contrario coinciden con los resultados obtenidos por otros autores en la distribución de la ploidía con respecto al sexo (De Zen, 1997), el estadio (Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997) y el IPC (Wijnaendts, 1993). Estas discrepancias pueden reflejar por una parte la heterogeneidad de las series y por otra la necesidad de estudios multivariantes que detecten factores pronósticos independientes en el RMS.

Con respecto a la relación entre la ploidía y el tipo histológico, nuestros resultados no reflejan la estrecha asociación detectada por Shapiro (Shapiro, 1991). Este autor encuentra que 15 de sus 24 RMSs embrionarios son hiperdiploides (62%), mientras que 10 de los 13 alveolares presentan un contenido tetraploide (76%). En nuestra serie 22 de los 30 casos embrionarios son hiperdiploides (69%) y 3 de los 14 alveolares son tetraploides (21%) (tabla V-IX). A excepción de una serie relativamente corta y heterogénea (Kilpatrick, 1994) que obtiene unos porcentajes similares a los de Shapiro, en los restantes estudios sobre este tema (Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997) los porcentajes se aproximan más a los obtenidos por nosotros. Mientras que el porcentaje de tumores hiperdiploides entre los RMSs embrionarios se confirma entre el 60% y 70% (Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997), el porcentaje de tumores tetraploides entre los RMSs alveolares oscila entre un 47% y un 8% (Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997).

Hemos comprobado también cómo los subtipos histológicos con mejor pronóstico (RMS embrionario, botrioides y de células fusiformes) se asociaban muy estrechamente con un contenido hiperdiploide (tabla IV-VIII), ya que todos los casos de RMSs botrioides de

nuestra serie y el 75% de los RMSs de células fusiformes fueron hiperdiploides y sólo un RMS de células fusiformes fue diploide (25%). En un trabajo reciente (Wijnaendts, 1993), los resultados para los RMSs de células fusiformes son idénticos a los nuestros y similares a los RMSs con histología botrioides, aunque dos de estos tumores fueron diploides. El hecho de que se encuentren histogramas diploides en RMSs botrioides (Wijnaendts, 1993; De Zen, 1997) debe ser valorado con especial cautela, sobre todo si la técnica empleada para la cuantificación es la CMF, ya que la presencia de abundantes células estromales o epiteliales normales y la escasez de células neoplásicas, que se observa de manera características en estos tumores puede enmascarar la presencia de posibles poblaciones aneuploides, numéricamente muy inferiores.

Las discrepancias pueden reflejar diferencias en la clasificación histológica empleada y en los criterios para analizar los histogramas. Ya hemos observado, que los casos con múltiples poblaciones tumorales detectadas en la citometría fueron arbitrariamente clasificados por Shapiro (Shapiro, 1991), de acuerdo al índice de ADN de la población situada más a la izquierda, lo cual elimina automáticamente la categoría poliploide.

En nuestra serie, todos los RMSs poliploides fueron embrionarios. Este resultado sólo lo hemos podido comparar con la serie de Wijnaendts (Wijnaendts, 1993) puesto que hasta ahora no se ha llevado a cabo ningún otro estudio que considere separadamente el grupo poliploide. En la serie antes citada (Wijnaendts, 1993), a diferencia de lo que ocurre en la nuestra, la poliploidía aparece distribuida entre los RMSs alveolares (3 casos) y los embrionarios (4 casos).

Los datos comentados sugieren que el contenido de ADN es un factor pronóstico independiente de gran ayuda para establecer el pronóstico en el RMS. La CME o CMF no

son técnicas complejas, aunque requieren un equipamiento que no está al alcance de todos los laboratorios. Sin embargo, nuestros resultados justifican la determinación de la ploidía en centros de referencia, especialmente en casos difíciles de clasificar histológicamente como favorables o desfavorables.

### **V.3.- ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR.**

Como se ha citado anteriormente, la histología, base fundamental del diagnóstico, no permite predecir por sí sola el comportamiento biológico del RMS. Por este motivo, además del grado de extensión, localización y edad del paciente, se deben de utilizar otros parámetros, como índices de orientación en la conducta biológica de estos tumores. La actividad proliferativa influye de forma ya comprobada en la evolución de algunos sarcomas (Ueda, 1989; Zerh, 1990; Swason, 1990; Benjamin, 1991; Oda, 1993; Michie, 1994; Oshiro, 1995); sin embargo, su valor pronóstico en los RMSs se ha estudiado relativamente poco, en series cortas, heterogéneas y con resultados no consistentes (Ueda, 1989; Benjamin, 1991; Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997, Noguchi, 1997).

Existen tres estudios en los que se analiza el valor pronóstico de la actividad proliferativa (fase-S) en los RMSs mediante curvas de supervivencia y estudio estadístico multivariable (Wijnaendts, 1993; Niggli, 1994; De Zen, 1997). En los tres se demuestra que la fase-S es un factor pronóstico significativo, que resulta además independiente en dos de ellos (Niggli, 1994; De Zen, 1997). En estas tres series los RMSs con fase S inferior al 14% o 15% tenían mejor supervivencia. Los resultados que se han obtenido en nuestro trabajo son comparables a los obtenidos en estas tres series, puesto que el Ac MIB-1 se expresa en todas las fases del ciclo celular, excepto en la fase G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub> tempranas (Gerdes, 1991;

Linden, 1992) y no solamente en la fase S, lo que justificaría las cifras ligeramente más elevadas de actividad proliferativa registradas en nuestro trabajo. No obstante, creemos que los resultados obtenidos con CMF deben valorarse con cautela, ya que la actividad proliferativa mediante cuantificación de la fase S en CMF tienen aún mayores problemas que la determinación del índice de ADN.

En lo que conocemos, un solo estudio (Noguchi, 1997) ha analizado la influencia de la actividad proliferativa en la supervivencia de los RMSs determinando el IPC con el marcador MIB-1. En este estudio, al igual que en el nuestro, el IPC medio estuvo próximo al 25% cifra comparable a la observada en el linfoma maligno de grado intermedio (Pich, 1994), en el leiomiocarcinoma uterino (Amada, 1995) y en el fibrohistiocitoma maligno (Oshiro, 1995).

Los resultados de este trabajo (Noguchi, 1997) difieren de los nuestros pues no demuestran relación estadística entre el IPC y la supervivencia. Debemos resaltar que en este estudio no se explica como determinar el punto de corte, que en nuestro caso fue elegido como el valor con mayor significación estadística con la supervivencia. La metodología también es diferente, puesto que emplea el recuento visual, mientras que nosotros determinamos el índice de proliferación con la ayuda de un analizador de imágenes, lo que indudablemente mejora la exactitud de la medición (Barbareschi, 1994; Pinder, 1995). Por último estos autores (Noguchi, 1997) no investigaron la posible relación del IPC con el ILE que en nuestra serie era aún superior que con la supervivencia. En la actualidad se admite que el Ac MIB-1 presenta ventajas bien demostradas sobre los marcadores de proliferación empleados anteriormente como el PC-10 que marcaba el Ag nuclear de proliferación celular PCNA. Por una parte es menos sensible a las condiciones de fijación y

tecnificación del tejido que afectaban de forma importante la inmunotinción del PCNA (Rose, 1994; Keshgegian, 1995) y además, el MIB-1 es un marcador que ha mostrado una tinción mucho más uniforme, lo que permite que su cuantificación sea más fácil y fiable (Filipe, 1993).

Es interesante destacar que aunque el recuento de mitosis no se ha considerado de interés pronóstico en el RMS ni en otros sarcomas, como el Sarcoma de Ewing (Ueda, 1989), los estudios con técnicas más refinadas sí demuestran una influencia de la actividad proliferativa en el pronóstico de los RMSs. A la vista de estos resultados, podemos suponer que estas células tienen una fase M de corta duración en comparación con el resto de las fases del ciclo celular detectadas con el Ac MIB-1, lo que justificaría el elevado IPC en comparación con el bajo recuento mitótico detectado clásicamente en estos tumores (Zerh, 1990).

En nuestro estudio, hemos demostrado también una influencia significativa de la actividad proliferativa en el ILE. El ILE resultó superior en los tumores con baja actividad proliferativa ( $\leq 19\%$ ). Estos resultados no los hemos podido comparar con los de otras series puesto que hasta ahora no se ha llevado a cabo ningún otro estudio que compare ambos parámetros.

Finalmente, algunos autores han demostrado que la actividad proliferativa se correlaciona con la ploidía (De Zen, 1997) y el tipo histológico (Niggli, 1994; De Zen, 1997), de manera que sería mayor en los RMSs alveolares diploides o tetraploides que en los embrionarios hiperdiploides. Sin embargo, nuestros resultados no reflejan la fuerte asociación detectada por estos autores, pero coincide con los datos aportados en otra publicación anterior (Wijnaendts, 1993). Estas disparidades podrían estar justificadas por

los diversos sistemas de clasificación histológica y de categorías biológicas empleadas en los diferentes estudios. No obstante, en nuestra serie observamos que las formas histológicas con buen pronóstico (RMS embrionario de células fusiformes y RMS embrionario botrioide) mostraban predominantemente  $IPC \leq 19\%$  y a la inversa.

Las características clínicas, histológicas y ploidía de nuestros dos grupos de RMSs, divididos en función del IPC, aparecen recogidas conjuntamente en la tabla IV-X. El análisis estadístico puso de manifiesto la falta de asociación de la actividad proliferativa con el resto de los parámetros valorados. Hasta ahora sólo un trabajo realizado por De Zen (De Zen, 1997) ha llevado a cabo un estudio de estas características. En él, a diferencia de lo que ocurre en nuestra serie, se detecta una asociación del IPC con la localización y el tipo histológico (De Zen, 1997).

En nuestra el 67% de los tumores diploides mostraban un IPC alto. Este resultado contradice la opinión expresada por Shapiro (Shapiro, 1991), según la cual el mal pronóstico de los RMSs diploides estaría relacionado con una baja proporción de células en proliferación, que son las más sensibles a la quimioterapia.

Pensamos que el porcentaje de células marcadas con el Ac MIB-1 es un factor pronóstico importante, que determina la agresividad y progresión tumoral de forma que, a mayor actividad proliferativa, le corresponde un peor pronóstico. Además, la expresión del Ac MIB-1 se comporta en nuestro estudio como un factor relacionado con el tipo histológico y con el estadio clínico. Característicamente los tumores con histología favorable y en estadios clínicos poco avanzados suelen presentar  $IPC \leq 19\%$ . No obstante, esta asociación no la hemos podido demostrar estadísticamente.

Los datos aquí presentados indican que, además del efecto la ploidía ejerce en la respuesta

al tratamiento hay otros factores pronósticos como el IPC, que se relacionan con la progresión tumoral del RMS. Estas observaciones permiten explicar las peores expectativas y calidad de vida en los enfermos con tumores poliploides o diploides que tienen  $IPC > 19\%$ . Podemos afirmar que el IPC determinado con el Ac MIB-1 es un método altamente sensible para determinar la asociación de la actividad proliferativa con la supervivencia (fig IV-20) y el ILE (fig IV-21). La estrecha relación estadística entre el IPC y el pronóstico que demostramos en el estudio univariable no se confirmó en el estudio multivariable lo que sugiere que la actividad proliferativa ejerce una influencia en la supervivencia e ILE asociada a otros factores y no de forma independiente.

## **VI.- CONCLUSIONES**

## **VI.- CONCLUSIONES.**

1.- La nueva clasificación internacional de los rhabdomiomas requiere una descripción más detallada y precisa de los diversos tipos histológicos, especialmente para aquellas variantes difícilmente separables morfológicamente (rhabdomioma embrionario atípico y alveolar sólido). Para el diagnóstico diferencial de las mencionadas variantes aportamos tres nuevos rasgos histológicos distintivos, no descritos hasta ahora:

- A) El carácter nodular, dividido por tractos fibrosos en el rhabdomioma alveolar sólido frente al patrón difuso del rhabdomioma embrionario atípico.
- B) La presencia de focos mixoides en el rhabdomioma embrionario atípico y su ausencia en el rhabdomioma alveolar sólido.
- C) La condensación celular multifocal en el rhabdomioma embrionario atípico frente a la densidad celular homogénea del RMS alveolar sólido.

2.- El rhabdomioma embrionario es un grupo heterogéneo tanto desde el punto de vista morfológico como en cuanto a su comportamiento biológico, en el que el pronóstico está determinado por otros factores adicionales más que por el tipo histológico.

3.- En el estudio univariable, la edad, localización, ploidía e índice de proliferación celular son los cuatro factores que demuestran relación estadística tanto con la supervivencia como con el intervalo libre de enfermedad en nuestra serie. El estadio clínico demuestra asociación estadística únicamente con el intervalo libre de enfermedad.

4.- En el estudio multivariable, solamente la ploidía se mantiene como factor pronóstico independiente en relación tanto a la supervivencia como al intervalo libre de enfermedad. La localización permanece como factor pronóstico independiente respecto a la supervivencia pero no respecto al intervalo libre de enfermedad. La edad y el estadio clínico mantienen un efecto independiente sobre el intervalo libre de enfermedad pero no sobre la supervivencia.

5.- La ploidía debe considerarse un nuevo e importante factor pronóstico en el rabdomiosarcoma que añade información suplementaria a las variables pronósticas que se manejan habitualmente.

6.- La actividad proliferativa cuantificada mediante el índice de proliferación celular, no añade información pronóstica adicional a los factores pronósticos clásicos, aunque demuestra una relación estadística significativa con la supervivencia y el intervalo libre de enfermedad.

## **VII.- BIBLIOGRAFÍA**

**VII.- BIBLIOGRAFIA.**

- *Abraira V, Zaplana J. PRESTA. Un paquete de procesamiento estadísticos. Proceedings de la Conferencia Iberoamericana de Bioingeniería. Gijón, España 1984.*
- *Abraira V, Perez de Bergas A. Métodos multivariantes en bioestadística. Editorial centro de estudios Ramón Areces 1996:333-336.*
- *Agamanolis DP, Dasu S, Krill CE. Tumors of skeletal muscle. Hum Pathol 1986; 17:778-795.*
- *Alvegard TA, Berg NO, Baldetorp B, Ferno M, Killander D, Ranstam J, Rydholm A, Akerman M. Cellular DNA content and prognosis of high-grade soft tissue sarcoma. The Scandinavian Sarcoma Group experience. J Clin Oncol 1990; 8:538-547.*
- *Amada S, Nakano H, Tsuneyoshi M. Leiomyosarcoma versus bizarre leiomyomas of the uterus: A comparative study based on the MIB-1 and proliferating cell nuclear antigen indices, p53 expression, DNA flow cytometry, and muscle specific actins. Int J Gynecol Pathol 1995; 14:134-142.*
- *Andrassy RJ, Corpron CA, Hays D, Raney RB, Wiener ES, Lawrence W, Lobe TE, Bagwell C, Maurer HM. Extremity sarcomas: an analysis of prognostic factors from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study III. J Pediatr Surg 1996; 31:191-196.*
- *Angervall L, Enzinger FM. Extraskelletal neoplasm resembling Ewing's sarcoma. Cancer 1975; 36:240-251.*
- *Asmar L, Gehan EA, Newton WA, Webber BL, Marsden HB, van Unnik AJM, Hamoudi AB, Shimada H, Tsokos M, Hars D, Ninfo V, Schmidt D, Cavazzana A, Gonzalez-Crussi F, Parham DM, Reiman HM, Beltangady M, Sachs N, Triche T, Maurer H. Agreement among and within groups of pathologists in the classification of rhabdomyosarcoma and related childhood sarcomas: reported of an international study of four pathology classifications. Cancer 1994; 74:2579-2588.*
- *Bale PM, Parsons RE, Stevens M. Diagnosis and behavior of juvenile rhabdomyosarcomas. Hum Pathol 1983; 14:496-611.*
- *Barbareschi M, Gilardo S, Mauri FA, Forti S, Eccher C, Mauri FA, Togni R, Palma PD, Doglioni C. Quantitative growth fraction evaluation with MIB1 and Ki-67 antibodies in breast carcinoma. Am J Clin Pathol 1994; 102:171-175,*
- *Bauer TW, Tubbs RR, Edinger MD, Suit PF, Gephardt GN, Levin HS. A prospective comparison of DNA quantitation by image and flow cytometry. Am J Pathol 1990; 136:115-123.*

- **Bauer KD, Bagwell B, Giaretti RW, Melamed M, Zarbo RJ, Witzing TE, Rabinovitch PS.** Consensus review at the clinical utility of DNA flow cytometry in colorectal cancer. *Cytometry* 1993; 14:486-491.
- **Benjamin DR.** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and pediatric tumors: assessment of proliferative activity. *Pediatr Pathol* 1991; 11:507-519.
- **Böcking A, Giroud F, Reith A.** Consensus report of the european society for analytical cellular pathology task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1995;17: 1-7.
- **Bosari S, Lee AKC, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML.** Flow cytometric and image analysis of colorectal adenocarcinomas. A comparative study with clinical correlations. *Am J Clin Pathol* 1993; 99:187-194.
- **Bourhis J, De Vathaire F, Wilson GD, Hartmann O, Terrier Lacombe MJ, Boccon Gibod L, McNally NJ, Lemerle J, Riou G, Bernard J.** Combined analysis of DNA ploidy index and N-myc genomic content in neuroblastoma. *Cancer Res* 1991; 15:33-36.
- **Boyle ET, Reiman HM, Kramer SA, Kelalis PP, Rainwater LM, Lieber MM.** Embryonal rhabdomyosarcoma of bladder and prostate: nuclear DNA patterns studied by flow cytometry. *J Urol* 1988; 140:1119-1121.
- **Bravo R, Celis JE.** A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* 1980; 84:795-802.
- **Breslow N, McCann B.** Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma. *Cancer Res* 1971; 31:2098-2103.
- **Brodeur GM, Azar C, Brother M, Hiemstra J, Kaufman B, Marshall B, Moley J, Nakagawara A, Saylor R, Scarrvada N.** Neuroblastoma affect of genetic factors on prognosis and treatment. *Cancer* 1992; 70:1685-1694.
- **Brown DC, Gatter KC.** Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990; 17:489-503.
- **Burger PC, Shibata T, Kleihues P.** The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology. *Am J Surg Pathol* 1986; 10:611-617.
- **Caillaud JM, Gérard-Marchant R, Marsden HB, van Unnik AJM, Roday C, Rey A, Flamant F.** Histopathological Classification of Childhood Rhabdomyosarcoma: A report From the International Society of Pediatric Oncology Pathology Panel. *Med Pediatr Oncol* 1989; 17:391-400.

- **Carli M, Pinkerton R, Frascella E.** *Intensive chemotherapy for metastatic sarcoma in children. SIOP European Intergroup Study MMT89. Proc Am Soc Clin Oncol* 1993; 12:410.
- **Carmichael MJ, Veltri RW, Partin AW, Miller MC, Walsh PC, Epstein JI.** *Deoxyribonucleic acid ploidy analysis as a predictor or recurrence following radical prostatectomy for stage T2 disease. The journal of Urology* 1995; 153:1014-1019.
- **Carrillo R, Candia A, Rodriguez-Peralto JL.** *Prognostic significance of DNA ploidy and proliferative index (MIB-1 index) in gastrointestinal stromal tumors. Hum Pathol* 1997; 28:160-165.
- **Cattoretti G, Berti E, Schiró R, D'Amato L, Valeggio C, Rilke F.** *Improved avidin biotin peroxidase complex (ABC) staining. Histochem J* 1988; 20:75-80.
- **Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlutar C, Galle J, Gerdes J.** *Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. J Pathol* 1992; 168:357-363.
- **CavazzanaAO, Schmidt D, Ninfo V, Harms D, Tollot M, Carli M, Treuner J, Betto R, Salviati G.** *Spindle cell rhabdomyosarcoma: a prognostically favorable variant of rhabdomyosarcoma. Am J Surg Pathol* 1992; 16:229-235.
- **Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL.** *Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. N Engl J Med* 1989; 320:627-633.
- **Claud III D, Weinstein RS, Howeedy A, Straus AK, Coon JS.** *Comparison of image analysis of imprints with flow cytometry for DNA analysis of solid tumours. Mod Pathol* 1989; 2:463-467.
- **Clemo FAS, Crabtree WN, Walker E, DeNicola DB.** *Comparison of image analysis and flow cytometry measurements of DNA content of canine transitional cell carcinomas. Acta Quant Cytol Histol* 1993; 15:418-426.
- **(A) Coffin CM.** *The New International Rhabdomyosarcoma Classification, its progenitors and considerations beyond Morphology. Advances in Anatomic Pathology* 1997; 4:1-16.
- **(B) Coffin CM, Rulon J, Smith L, BruggersC, White FV.** *Pathologic features of rhabdomyosarcoma before and after treatment: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis. Mod Pathol* 1997; 10:1175-1187.
- **Cohen SM, Ellwein LB.** *Cell proliferation in carcinogenesis. Science* 1990; 249:1007-1011.

- **Crist WM, Garnsey L, Beltangady MS, Gehan E, Ruymen F, Webber B, Hays DM, Wharam M, Maurer H.** Prognosis in children with rhabdomyosarcoma: A report of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Studies I and II. *J Clin Oncol* 1990; 8:443-452.
- **Crist W, Gehan EA, Ragab AH, Dickman PS, Donaldson SS, Fryer C, Hammond D, Hays DM, Herrmann J, Heyn R, Jones PM, Lawrence W, Newton W, Ortega J, Raney RB, Ruymann FB, Tefft M, Webber B, Wiener E, Wharam M, Vietti T, Maurer HM.** The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study III. *J Clin Oncol* 1995; 13:610-630.
- **D'Amore ESG, Tollot M, Stracca-Pansa V, Menegon A, Meli S, Carli M, Ninfo V.** Therapy associated differentiation in rhabdomyosarcomas. *Mod Pathol* 1994; 7:69-72.
- **Darzynkiewicz Z, Tragamos F, Kapuscinski J, Staiano-Coico L, Melamed MR.** Accessibility of DNA in situ to various fluorochromes: Relationship to chromatin changes during erythroid differentiation of friend leukemia cells. *Cytometry* 1984; 5:355-363.
- **Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, Ambros PF, Sheer D, Turc-Carel C, Triche TJ.** The Ewing family of tumors: a subgroup of small round cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N England J Med* 1994; 331: 294-299.
- **De Jong ASH, Van Kessel-Van ArK M, Albus-Lutter ChE.** Pleomorphic rhabdomyosarcoma in adults: immunohistochemistry as a tool for its diagnosis. *Hum Pathol* 1987; 18:298-303.
- **De Zen L, Sommaggio A, d'Amore ESG, Masiero L, Cordero di Montezemolo L, Linari A, Madon E, Dominici C, Bosco S, Bisogno G, Carli M, Ninfo V, Basso G.** Clinical relevance of DNA ploidy and proliferative activity in childhood rhabdomyosarcoma: a retrospective analysis of patients enrolled onto the Italian Cooperative rhabdomyosarcoma Study RMS88. *J Clin Oncol* 1997; 15:1198-1205.
- **Dias P, Kumar P, Marsden HB, Gattamaneni HR, Kumar S.** Prognostic relevance of DNA ploidy in rhabdomyosarcomas and other sarcomas of childhood. *Anticancer Res* 1992; 12:1173-1178.
- **Dierick AM, Langlois M, Van Oostveldt P, Roels H.** The prognostic significance of the DNA content in Ewing's sarcoma: a retrospective cytophotometric a flow cytometric study. *Histopathology* 1993; 23: 333-339.
- **Dressler LG, Seamer LC, Owens MA, Clark GM, McGuire WL.** DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer* 1988; 61:420-427.
- **Donaldson SS, Beli JA.** A rational clinical staging system for childhood rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 1984; 2:135-139.

- **Donaldson SS.** *The value of adjuvant chemotherapy in the management of sarcomas in childre.* *Cancer* 1985; 55:2184-2197.
- **Ellison DJ, Nathwani BN, Hetter GE, Turner RR, Burke JS, Miller TP, Mann RB, Barcos M, Kjeldsberg CR, Winberg CD.** *Mitotic counts in follicular lymphomas.* *Hum Pathol* 1987; 18: 502-505.
- **El-Naggar A, Batsakis JG, Ordoñez NG.** *Rhabdomyosarcoma of the adult head and neck: a clinicopathological and DNA ploidy study.* *J Laryn Otol* 1993; 107:716-720.
- **Enzinger FM, Lattes R, Torloni H.** *Histological typing of soft tissue tumors.* Geneva:World Health Organization, 1969.
- **Enzinger FM, Weiss SW.** *Soft tissue tumors.3 rd ed.* St Louis: Mosby-Year Book 1995:539-577.
- **Farinacci CL, Fairchild JP, Sulak MH, Gilpatrick CW.** *Sarcomas botryioides (form of embryonal rhabdomyosarcoma) of common bile duct; report of two cases.* *Cancer* 1956; 9:408-417.
- **Filipe MI, Mendes R, Lane DP, Morris RW.** *Assessment of proliferating cell nuclear antigen expression in precursor stages of gastric carcinoma using the PC10 antibody to PCNA.* *Histopathology.* 1993; 22:349-354.
- **Flamant F, Hill C.** *The improvement in survival associated with combined chemoterapy in childhood rhabdomyosarcoma: A historical comparison of 345 patients in the same center.* *Cancer* 1984; 53:2417-2421.
- **Flamant F, Rodary C, Voute PA, Otten J.** *Primary chemotherapy in the treatment of rhabdomyosarcoma in children: Trial of the International Society of Pediatric Oncology (SIOP). Preliminary results.* *Radiother Oncol* 1985; 3:227-236.
- **Flamant F, Rodary C, Rey A, Otten J, Voute PA, Sommelet D y cols.** *Assesing the benefit of primary chemoterapy in the treatment of rhabdomyosarcoma in children: report from the International Society of Pediatric Oncology: RMS 84 study (abstract).* *Proc Am Soc Clin Oncvol* 1991; 10:309.
- **Friedlander ML, Hedley DW, Taylor C.** *Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer.* *Cancer Res* 1984; 44:397-400
- **Gaiger AM, Soule EH, Newton WA.** *Pathology of rhabdomyosarcoma: experience of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study, 1972-1978.* *Natl Cancer Inst Monogr* 1981; 56:19-27.
- **Gansey LA, Gehan EA.** *Prognostic factors in rhabdomyosarcoma.* In: Maurer HM, Ruymann FB, Pochedley CC. *Rhabdomyosarcoma and related tumors in children and*

adolescents. Boca Raton (FL): CRC Press; 1991:139-154.

- **Gansler T, Chatten J, Varello M, Bunin GR, Atkinson B.** Flow cytometric DNA analysis of neuroblastoma. Correlation with histology and clinical outcome. *Cancer* 1986; 58:2453-2458.
- **Gehan EA, Glover FN, Maurer HM, Sutow WW, Hats DM, Lawrence WJr, Newton WA Jr, Soule EH.** Prognostic factors in rhabdomyosarcoma. En: "Proceedings of a Symposium on sarcomas of soft tissue and bone childhood". Bethesda, MD: Natl Cancer Inst Monogr 1981;56: 83-92.
- **Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Schwab U, Stein H.** Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki 67. *J Immunol* 1984, 133:1710-1715.
- **Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohleberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD.** Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138:867-873.
- **Gerson JM, Jaffe N, Donaldson M, Tefft M.** Meningeal seeding from rhabdomyosarcoma of the head and neck with base of the skull invasion: recognition of the clinical and suggestion for management. *Med Pediatr Oncol* 1978; 5:137-144.
- **González-Crussi F, Allack-Scahffer S.** Rhabdomyosarcoma of infancy and childhood: problems of morphologic classification. *Am J Surg Pathol* 1979; 3:157-171.
- **Grace J, Stankovic R, Gupta L.** Detection of aneuploidy and polyploidy in non-Hodgkin's lymphoma by computer video image analysis. *Anal-Quant-Cytol-Histol* 1993; 15:265-273.
- **Hammond D, Sather H, Nesbit M, Miller D, Coccia P, Bleyer A, Lukens J, Siegel S.** Analysis of prognosis factors in acute lymphoblastic leukemia. *Med Ped Oncol* 1986; 14:124-134.
- **Harmer MH (ed).** TNM classification of pediatrics tumour. Geneva: UICC (Union Internationale Contre le Cancer), 1982:23-28.
- **Harms D.** Soft tissue sarcomas in the Kiel Pediatric Tumor Registry. In: Harms D, Schmidt D, eds. *Current topics in pathology* vol 89. Berlin: Springer-Verlag, 1995:31-45.
- **Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Ruggy CA, Musgrove EA.** Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 31:1333-1335.

- **Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA.** DNA flow cytometry of paraffin-embedded tissue (letters). *Cytometry* 1984; 5:660.
- **Hedley DW, Rugg CA, Gelber RD.** Association of DNA index and S-phase fraction with prognostic of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res* 1987; 47:4729-4735.
- **Horn RC, Yakovac WC, Kaye R, Koop CE.** Rhabdomyosarcoma (sarcoma botryoides) of common bile duct; report of case. *Cancer* 1955; 8:468-477.
- **Horn RC, Enterline HT.** Rhabdomyosarcoma: A clinicopathological study and classification of 39 cases. *Cancer* 1958; 11:181-199.
- **Huddart SN, Muir KR, Parkes SE, Mann JR, Stevens MC, Raafat F, Smith K.** Retrospective study of prognostic value of DNA and proliferative activity in neuroblastoma. *J Clin Pathol* 1993; 46:1101-1104.
- **Jackson JF, Boyett J, Pullen J, Brock B, Patterson R, Land V, Borowitz M, Head O, Crist W.** Favorable prognosis associated with hyperdiploidy in children with acute lymphocytic leukemia correlates with extra chromosome 6. *Cancer* 1990; 66:1183-1189.
- **Jaffe N, Filler RM, Farber S, Traggis DG, Vawter GF, Tefft M, Murray JE.** Rhabdomyosarcoma in children : improved outlook with a multidisciplinary approach. *Am J Surg* 1973; 125:482-487.
- **Joensuu H, Kallioniemi OP.** Different opinions on classification of DNA histograms produced from paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 1989; 10:711-717.
- **Joensuu H.** DNA flow cytometry in the prediction of survival and response to radiotherapy in head and neck cancer. *Acta Oncologica* 1990; 29:513-516.
- **Kallioniemi OP.** Comparison of fresh and paraffin-embedded tissue as starting material for DNA flow cytometry and evaluation of intratumor heterogeneity. *Cytometry* 1988; 9:164-169.
- **Keshgegian AA, Chaan A.** Proliferation markers in resect carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. *Am J Clin Pathol* 1995; 104:42-49.
- **Key G, Becker MHG, Baron B, Duchrow M, Schluter C, Flad HD, Gerdes J.** New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB-1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* 1993; 68:629-636.

- **Kilpatrick SE, Teot LA, Geisinger KR, Martin PL, Shumate DK, Zbieranski N, Russell GB, Fletcher C.** Relationship of DNA ploidy to hian stologyand prognosis in rhabdomyosarcoma: comparison of flow cytometry and image analysis. *Cancer* 1994; 74:3227-3233.
- **Kimura H, Yonemura Y, Epstein AL.** Flow cytometric quantitation of the proliferation associated nuclear antigen p105 and DNA content in advanced gastric cancer. *Cancer* 1991; 68:2175-2180.
- **Kingston JE, McElwain TJ, Malpas JS.** Childhood rhabdomyosarcoma: Experience of the children's solid tumour group. *Br J Cancer* 1983; 48:195-207.
- **Kinnier-Wilson LM, Draper GJ.** Neuroblastoma, its natural history and prognosis: a study of 487 cases. *Br Med J* 1974; 3:301-307.
- **Kodet R, Newton WA, Hamoudi AB, Asmar L, Jacobs DL, Maurer HM.** Childhood rhabdomyosarcoma with anaplastic (pleomorphic) features. A report of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Am J Surg Pathol* 1993; 17:443-453.
- **Kodet R, Newton AW, Hamoudi AB, Asmar L, Wharam MD, Maurer HM.** Orbital Rhabdomyosarcoma and related tumors in childhood: relationship of morphology to prognosis-am Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Med Pediatr Oncol* 1997; 29:51-60.
- **Koss LG, Czerniak B, Herz F, Wersto R.** Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: A critical appraisal. *Hum Pathol* 1989; 20:528-546.
- **Kowal-Vern A, Gonzalez Crussi F, Turner J, Trujillo YP, Chou P, Herman C, Castelli M, Walloch J.** Flow and image cytometric DNA analysis in rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 1990; 50:6023-6027.
- **Kramer S, Meadows AT, Jarret TP, Evans AE.** Incidence of childhood cancer: experience of a decade in a population-based registry. *J Natl Cancer Inst* 1983; 70:49-55.
- **Kreipe H, Wacker HH, Heidebrecht HJ, Haas K, Hauberg M, Tiemann M, Parwaresch R.** Determination of the growth fraction in non-Hodgkin's lymphomas by monoclonal antibody Ki-S5 directed against a formalin-resistant epitope of the Ki-67 antigen. *Am J Pathol* 1993; 142:1689-1694.
- **Kumar S, Marsden HB, Cowan RA, Barnes JM.** Prognostic relavance of DNA content in childhood renal tumors. *Br J Cancer* 1989; 59:291-295.
- **Lanigan D, McLean PA, Curran B, Leader M.** Comparison of flow and static image cytometry in the determination of ploidy. *J Clin Pathol* 1993; 46:135-139.

- **Lawrence W, Jegge G, Foote FW.** Embryonal rhabdomyosarcoma: a clinicopathologic study. *Cancer* 1964; 17:361-376.
- **Lawrence W, Gehan EA, Hays DM, Beltangady M, Maurer HM.** Prognostic significance of staging factors of the UICC staging system in childhood rhabdomyosarcoma: A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS-II). *J Clin Oncol* 1987; 5:46-54.
- **La Quaglia MP, Heller G, Ghavimi F, Casper ES, Vlamis V, Hajdu S, Brennan MF.** The effect of age at diagnosis on outcome in rhabdomyosarcoma. *Cancer* 1994; 73:109-117.
- **Leader MB, Kay EW, Barry CJ, Dolan J.** Assessment of DNA ploidy: a review of methods and significance. *Current Diagnostic Pathology* 1994; 1:105-113.
- **Lerma F, Lee SJ, Turques D, Oleva E, Gich I, Prat J.** Ploidy of 36 stromal tumors of the gastrointestinal tract. A comparative study with flow cytometry and image analysis. *Anal Quant Cytol Histol* 1994; 16:435-448.
- **Leuschner I, Schmidt D, Möller R, Harms D.** DNA ploidy and nucleolar organizer regions in rhabdomyosarcoma. *SIOP XXIII Meeting (abstract). Med Pediatr Oncol* 1991; 19:350.
- **Leuschner I, Newton WA, Schmidt D, Sachs N, Asmar L, Hamoudi A, Harms D, Maurer HM.** Spindle cell rhabdomyosarcoma. A prognostically favorable variant of rhabdomyosarcoma. *Am J Surg Pathol* 1993; 16:229-235.
- **Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ.** Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am J Clin Pathol* 1992; 97:S4-S13.
- **Lloyd RV, Hajdu SI, Knapper WH.** Embryonal rhabdomyosarcoma in adults. *Cancer* 1983; 51:557-565.
- **Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA.** Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med* 1984; 311:231-235.
- **Look AT, Roberson PK, Williams DL, Rivera G, Bowman WP, Pui C, Ochs J, Abromowitch M, Kalwinsky, Dahl GV, George S, Murphy SB.** Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1985; 65:1079-1086.
- **Mameghan H, Fisher R, Tobias V, Kern IB, O'Gorman-Hughes D, Vowels M, Mameghan J.** Local failure in childhood rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma: prognostic factors and implications for curative therapy. *Med Pediatr Oncol* 1993; 21:88-95.

- **Marsden HB, Steward JK.** *Connective tissue tumours, in Recent Results in Cancer Research: Tumours in children. Heidelberg, Springer-Verlag, 1976:282-326.*
- **Maurer HM.** *The Intergroup Rhabdomyosarcoma- (NIH)- Objectives and clinical staging classification. J Pediatr. Surg 1975; 10:977-978.*
- **Maurer HM, Moon T, Donaldson M, Fernández C, Gehan EA, Hammond D, Hays DM, Lawrence W, Newton W, Ragab A, Raney B, Soule EH, Sutow WW, Tefft M.** *The Intergroup rhabdomyosarcoma study. A preliminary report. Cancer 1977; 40:2015-2026.*
- **Maurer HM.** *The intergroup rhabdomyosarcoma study. Natl Cancer Inst Monogr 1981; 56:61-68.*
- **Maurer HM, Beltangady M, Gehan EA, Crist W, Hammond D, Ortega J, Ragab AH, Raney RB, Ruymann FB, Soule E, Tefft m, Webber B, Wharam y Viett TJ.** *The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study I: a final report. Cancer 1988;61:209-220.*
- **Maurer HM, Gehan E, Crist W .** *Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS)-III: A preliminary report of overall outcome. Proc Ann Meet Am Soc Clin Oncol 1989; 8:296.*
- **Maurer HM, Ruymann FB, Pochedly C.** *Rhabdomyosarcoma and related tumors in children and adolescents, Boca Raton: CRC Press, 1991:19-50.*
- **Maurer HM, Gehan EA, Beltangady M, Crist W, Dickman PS, Donaldson S, Fryer C, Hammond D, Hays DM, Herrmann J, Heyn R, Jones PM, Lawrence W, Newton W, Ortega J, Ragab AH, Raney RB, Ruymann FB, Soule E, Tefft M, Webber B, Wiener E, Wharam M, Vietti TJ.** *The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study II. Cancer 1993; 71:1904-1922.*
- **McCormick D, Hall PA.** *The complexities of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. Histopathology 1992; 21:591-594.*
- **(A) McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA.** *Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embeded sections with the monoclonal antibody MIB1. Histopathology 1993; 22:355-360.*
- **(B) McCormick D, Yu C, Hobbs C, Hall PA.** *The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. Histopathology 1993; 22:543-547.*
- **McKee NH.** *Operative complications and the management of intraoperative flow failure. Microsurgery 1993; 14:158-161.*
- **Merkel DE, Maguire WL.** *Ploidy, proliferative activity and prognosis. Cancer 1990; 65:1194-1205.*

- **Michie BA, Back C, Reid RP, Barrett A, Hamblen DL.** Image analysis derived ploidy and proliferation indices in soft tissue sarcomas. Comparison with clinical outcome. *J Clin Pathol* 1994; 47:443-447.
- **Miettinen M.** Rhabdomyosarcoma in patients older than 40 years of age. *Cancer* 1988;62:2060-2065.
- **Molenaar WM, Oosterhuis JW, Kamps WA.** Cytologic "differentiation" in childhood rhabdomyosarcomas following polychemotherapy. *Hum Pathol* 1984; 15:973-979.
- **Molenaar WM, Dam-meiring A, Kamps WA, Cornelisse CJ.** DNA-Aneuploidy in rhabdomyosarcomas as compared with other sarcomas of childhood and adolescence. *Hum Pathol* 1988; 5:573-579.
- **Morris GF, Mathews MB.** Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J Biol Chem* 1989; 264:13856-13864.
- **Mostofi FK, Morse WH.** Polypoid rhabdomyosarcoma (sarcoma botryoides) of bladder in children. *J Urol* 1952; 67:681-687.
- **Muraji T, Okamoto E, Fujimoto J, Suita S, Nakagawara A.** Combined determination of N-myc oncogene amplification and DNA ploidy in neuroblastoma. Complementary prognostic indicators. *Cancer* 1993; 72:2763-2768.
- **Murphy WM, Chandler RW, Trafford RM.** Flow cytometry of separaffinised nuclei compared to histological grading for the pathological evaluation of transitional cell carcinoma. *J Urol* 1986; 135:694-698.
- **Nakanishi H, Tomita Y, Ohsawa M, Naka N, Araki N, Ochi T, Aozasa.** Tumor size as a prognostic indicator of histologic grade of soft tissue sarcoma. *J Surg Oncol* 1997; 65:183-187.
- **Nakleh RE, Swanson PE, Dhener LP.** Juvenile (embryonal and alveola) rhabdomyosarcoma of the head and neck in adults. *Cancer* 1991, 67:1019-1024.
- **Neifeld JP, Maurer HM, Godwin D, Berg JW, Salzberg AM.** Prognostic variables in pediatric rhabdomyosarcoma before and after multimodal therapy. *J Pediatr Surg* 1979; 14:699-703.
- **Newton WA, Soule EH, Hamoudi AB, Reiman HM, Shimada H, Beltangady M, Maurer H.** Histopathology of childhood sarcomas: Intergroup Rhabdomyosarcoma Studies I and II\_ clinicopathologic correlation. *J Clin Oncol* 1988; 6:67-75.
- **Newton WA, Gehan EA, Webber BL, Marsden HB, van Unnik AJM, Hamoudi AB, Tsokos MG, Shimada H, Harms D, Schmidt D, Ninfo V, Cavazzana AO, Gonzalez-Crussi F, Parham DM, Reiman HM, Asmar L, Beltangady M, Sachs NE, Triche TJ,**

- Maurer HM.** Classification of rhabdomyosarcoma and related sarcomas: pathologic aspects and proposal for a new classification-an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Cancer* 1995; 76:1073-1085
- **Nicholson GW de P.** *Studies on tumor formation.* London: Butterworth, 1950.
  - **Niggli FK, Powell JE, Parkas SE, Ward K, Raafat F, Mann JR, Stevens MCG.** DNA ploidy and proliferative activity (S-phase) in childhood soft-tissue sarcomas: their value as prognostic indicators. *Br J Cancer* 1994; 69:1106-1110.
  - **Noguchi S, Tamiya S, Nagoshi M, Suita S, Fukuda T, Tsuneyoshi M.** Nuclear morphometry and the MIB-1 index in rhabdomyosarcoma. *Mod Pathol* 1997; 9:253-260.
  - **Nurse P.** Ordering S phase and Mphase in the cell cycle. *Cell* 1994; 79:547-550.
  - **Ober WB, Edgcomb JH.** Sarcoma botryoides in female urogenital tract. *Cancer* 1954; 7:75-91.
  - **Oda Y, Hashimoto H, Takeshita S, Tsuneyoshi M.** The prognosis values of immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen in synovial sarcoma. *Cancer* 1993; 72:478-485.
  - **Oppedal BR, Glomstein A, Zetterberg A.** Feulgen DNA values in Wilm's tumour in relation to prognosis. *Path Res Pract* 1988; 183:756-760.
  - **Oshiro Y, Fukuda T, Tsuneyoshi M.** Atypical fibroxanthoma versus benign and malignant fibrous histiocytoma.: A comparative study of these proliferative activity using MIB-1 DNA flow cytometry, and p53 immunostaining. *Cancer* 1995; 75:1128-1134.
  - **Palmer NG, Sachs N, Foulkes M.** Histopathology and prognosis in rhabdomyosarcoma (Abstract). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1981; 1:113-114.
  - **Palmer NG, Sachs N, Foulkes M.** Histopathology and prognosis in rhabdomyosarcoma (IRS-I) (Abstract). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1982; 1:170.
  - **Pappo AS, Crist WM, Kuttesch J, Rowe S, Ashmum RA, Maurer HM, Newton WA, Asmar L, Luo X, Shapiro DN.** Tumor cell DNA content predicts outcome in children and adolescents with clinical group III embryonal rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 1993; 11:1901-1905.
  - **(A) Pappo AS.** Rhabdomyosarcoma and other soft tissue sarcomas of childhood. *Current Opinion in Oncology* 1995; 7:361-366.
  - **(B) Pappo AS, Shapiro DN, Crist WM, Maurer HM.** Biology and therapy of pediatric rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 1995; 13:2123-2139.
-

- **Pappo AS.** Rhabdomyosarcoma and other soft tissue sarcomas in children. *Current Opinion in Oncology* 1996; 8:311-316.
- **Parham D, Webber B, Holt H, Williams W, Maurer H.** Immunohistochemical Study of Childhood rhabdomyosarcoma and related neoplasms. Results of an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study project. *Cancer* 1991; 67:3072-3080.
- **Pedrick TJ, Donaldson SS, Cox RS.** Rhabdomyosarcoma: the Stanford experience using a TNM staging system. *J Clin Oncol* 1986; 4:370-378.
- **Pinder SE, Wencyk P, Sibbering DM, Bell JA, Elston CW, Nicholson R, Robertson JFR, Blamey RW, Ellis IO.** Assessment of the new proliferation marker MIB1 in breast carcinoma using image analysis: associations with other prognostic factors and survival. *Br J Cancer* 1995; 71: 146-149.
- **Prestidge BR, Donaldson SS.** Treatment results among adults with childhood tumors: a 20-year experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17:507-514.
- **Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Herdenson BE.** Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res* 1990; 50:7415-7421.
- **Pich A, Ponti R, Valente G y cols.** MIB-1, Ki-67, and PCNA scores and DNA flow cytometry in intermediate-grade malignant lymphomas. *J Clin Pathol* 1994; 47:18-.
- **Ragab AH, Heyn R, Tefft M, Hays DM, Newton WA, Beltangady M.** Infants younger than 1-year of age with rhabdomyosarcoma. *Cancer* 1986; 58:2606-2610
- **Raney RB, Donaldson MH, Sutow WW, Linberg RD, Maurer HM, Teft M.** Special considerations related to primary site in rhabdomyosarcoma: experience of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study, 1972-1976. *Natl Cancer Inst Monogr* 1981; 56:69-74.
- **Raney RB, Hays DM, Tefft M, Newton WA, Wharam M, Vassilopoulou-Sellin R, Maurer HM.** Rhabdomyosarcoma and the undifferentiated sarcomas, in Pizzo PA, Poplack DG (eds). *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Philadelphia, PA, lippincott 1993;769-794.
- **Ransom JL, Pratt CB, Shanks E.** Childhood rhabdomyosarcomas of the extremity: results of combined modality therapy. *Cancer* 1977; 40:2810-2816.
- **Reaman G, Zeltzer P, Bleyer WA, Amendola B, Level C, Sather H, Hammond D.** Acute lymphoblastic leukemia in infants less than one year of age: a acumulative experience from of the Childrens Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1985; 3:513-521.
- **Reboul-Marty J, Quintana E, Mosseri V, Flamant F, Asselain B, Roday C, Zurcker M.** Prognostic factors of alveolar rhabdomyosarcoma in childhood. *Cancer* 1991; 68:493-498.

- **Riopelle JL, Thériault JP.** *Sur une forme méconnue de sarcome des parties molles: le rhabdomyosarcome alvéolaire.* *Ann Anat Pathol* 1956; 1:88-111.
- **Rodary C, Rey A, Rezvani A, Flamant F.** *Prognostic factors in RMS in childhood: Study carried out with 253 children registered by the International Society of Pediatric Oncology.* *Bull Cancer* 1988; 75:213-223.
- **Rodary C, Rey A, Olive D.** *Prognosis factor in 281 children with nonmetastatic rhabdomyosarcoma (RMS) at diagnosis.* *Med Pediatr Oncol* 1991; 16:71-77.
- **Rose DSC, Maddox PH, Brown DC.** *Which proliferation marker for routine immunohistology? A comparison of five antibodies.* *J Clin Pathol* 1994; 47:1010-1014.
- **Rost FWD.** *Cuantitative histochemistry.* En *Pearse AGE Ed. Histochemistry. Theoretical and applied.* Edinburgh: Churchill-Livingstone, 1980;379-417.
- **Sapi Z, Hendricks JB, Pharis PG, Wilkinson EJ.** *Tissue section image analysis of breast neoplasms.* *Am J Clin Pathol* 1993; 99:714-720.
- **Schmidt D, Reimann O, Treuner J, Harms D.** *Cellular differentiation and prognosis in embryonal rhabdomyosarcoma. A report from the Cooperative Soft Tissue Sarcomas Study 1981.* *Virchows Arch (A)* 1986; 409:183-194.
- **Schofield DE, Yunis EJ, Geyer JR.** *DNA content and other prognostic features in childhood medulloblastoma.* *Cancer* 1992; 69:1307-1314.
- **Shapiro HM.** *Technical developments in flow cytometry.* *Hum Pathol* 1986;17:649-651.
- **Shapiro DN, Parham DM, Douglass EC, AshSmum R, Webber BL, Newton WA, Hancock ML, Maurer HM, Look AT.** *Relationship of tumour-cell ploidy to histologic subtype and treatment outcome in children and adolescents with unresectable rhabdomyosarcoma.* *J Clin Oncol* 1991; 9:159-166.
- **Sherr CJ.** *G1 phase progression: cycling on cue.* *Cell* 1994; 79:551-555.
- **Shi RR, Key ME, Kaira K.** *Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin embedded tissues an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections.* *J Histochem Cytochem* 1991; 39:741-748.
- **Stobbe GD, Dargeon HW.** *Embrional rhabdomyosarcoma of head and neck in children and adolescents.* *Cancer* 1950; 3:826-836.
- **Stout AP.** *Rhabdomyosarcoma of the skeletal muscles.* *Ann Surg* 1946; 123:447-472.
- **Stenkvist B, Johansson-Browén C.** *Image analysis cytology for determination in breast and prostate cancer.* *Acta Oncológica* 1991; 30:911-916.

- **Suder J, Stienen U, Kaatsch P, Harms D, Schimdt D, Spaar HJ, Treuner J.** Analysis of prognostic factors in rhabdomyosarcoma. Preliminary univariate and multivariate results of the Cooperative Soft Tissue Sarcoma Study (CWS-81). *Klin-Peditric* 1986; 198:218-223.
- **Susini T, Rapi S, Savino L, Boddi V, Berti P, Massi G.** Prognostic value of flow cytometric deoxyribonucleic acid index in endometrial carcinoma: Comparison with other clinical-pathologic parameters. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170:527-534.
- **Sutow WW, Sullivan MP, Ried HL, Taylor HG, Griffith KM.** Prognosis in childhood rhabdomyosarcoma. *Cancer* 1970; 25:1384-1390.
- **Swason SA, Brooks JJ.** Proliferationmarkers Ki-67 and p105 in soft tissue lesions. Correlation with DNA flow cytometric characteristics. *Am J Pathol* 1990; 137:1491-1500.
- **Taylor SR, Blatt J, Constantino JP.** Flow cytometric DNA analysis of neuroblastoma and ganglioneuroma. A 10-year retrospective study. *Cancer* 1988; 8:1869-1876.
- **Tsokos M, Webber BL, Parham DM, Wesley RA, Miser A, Miser JS, Etcubanas E, Kinsella T, Grayson J, Glatstein E, Pizzo PA, Triche TJ.** Rhabdomyosarcoma. A new classification scheme related prognosis. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116:847-855.
- **Ueda T, Aozasa K, Tsujimoto M, Ohsawa M, Uchida A, Aoki Y, Ono K, Matsumoto K.** Prognostic significance of Ki-67 reactivity in soft tissue sarcomas. *Cancer* 1989; 63:1607-1611.
- **Vesalainen S, Nordling S, Lipponen P, Talja M, Syrjänen K.** Progression and survival in prostatic adenocarcinoma: a comparison of clinical stage, Gleason grade, S-phase fraction and DNA ploidy. *Br J Cancer* 1994, 70:309-314.
- **Weiss SW.** *Histological typing of soft tissue tumors.* 2<sup>nd</sup> ed. Geneva, Switzerland: Springer-Verlag; 1995:29-30.
- **Wharam MD, Foulkes MA, Lawrence W.** Soft tissue sarcoma of the head and neck in childhood: nono-orbital and non-parameningeal sites: areport of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study, 1972-1976. *Natl Cancer Inst Monogr* 1986; 56:69-75.
- **Wijnaendts LCD, van der Linden JC, van Diest PJ, van Unnik AJ, Delemarre JF, Voute PA, Meijer CJ.** Prognostic importance of DNA flow cytometric variables in rhabdomyosarcoma. *J Clin Pathol* 1993;46: 948-952.
- **Wijnaendts LCD, van der Linden JC, van Unnik AJM, Delemarre JFM, Voute PA, Meijer JLM.** Histopathological classification of childhood rhabdomyosarcomas: relationship with clinical parameters and prognosis. *Hum Pathol* 1994; 25:900-907.

- **Woods AL, Hall PA, Shepherd NA, Hanby AM, Wasseem NH, Lane DP, Levison DA.** *The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction (flow cytometric analysis) and prognosis. Histopathology 1991;19: 21-27.*
- **Woosley JT.** *Measuring cell proliferation. Arch Pathol Lab Med 1991;115:555-557.*
- **Young JL, Miller RW.** *Incidence of malignant tumors in US children. J Pediatr 1975; 86:254-258.*
- **Yu CG-W, Fletcher CDM, Newman PL.** *A comparison of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining, nucleolar organizer region (AgNOR) staining, and histological grading in gastrointestinal stromal tumours. J Pathol 1992; 166:147-152.*
- **Zehr RJ, Bauer TW, Marks KE, Welterreden A.** *Ki-67 and grading of malignant fibrous histiocytoma. Cancer 1990; 66:1984-1990.*
- **Zerbini C, Gelber RD, Weinberg D, Sallan SE, Barnes P, Kupsky W, Scott M, Tarbell J.** *Prognostic factors in medulloblastoma, including DNA ploidy. J Clin Oncol 1993; 11:616-622.*
- **Zimmerman PV, Hawson GAT, Bint MH, Parsons PG.** *Ploidy as prognostic determinant in surgically treated lung cancer. Lancet 1987; 5:530-533.*

