



ABRIR III.- MATERIAL Y MÉTODOS

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	%
SEXO:		
➤ Hombres:	29	(64%)
➤ Mujeres:	16	(36%)
LOCALIZACIÓN:		
➤ 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%)
ESTADIO:		
➤ I:	9	(20%)
➤ II:	13	(29%)
➤ III:	19	(42%)
➤ IV:	4	(9%)
TIPO HISTOLÓGICO:		
➤ RMS botriode:	3	(7%)
➤ RMS de células fusiformes:	4	(9%)
➤ RMS embrionario:	24	(53%)
➤ RMS alveolar:	14	(31%)
PLOIDÍA:		
➤ Hiperdiploides:	30	(67%)
➤ Diploides:	6	(13%)
➤ Poliploides:	3	(7%)
➤ Tetraploides:	5	(11%)
➤ No valorable:	1	(2%)
MIB-1:		
➤ ≤ 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).

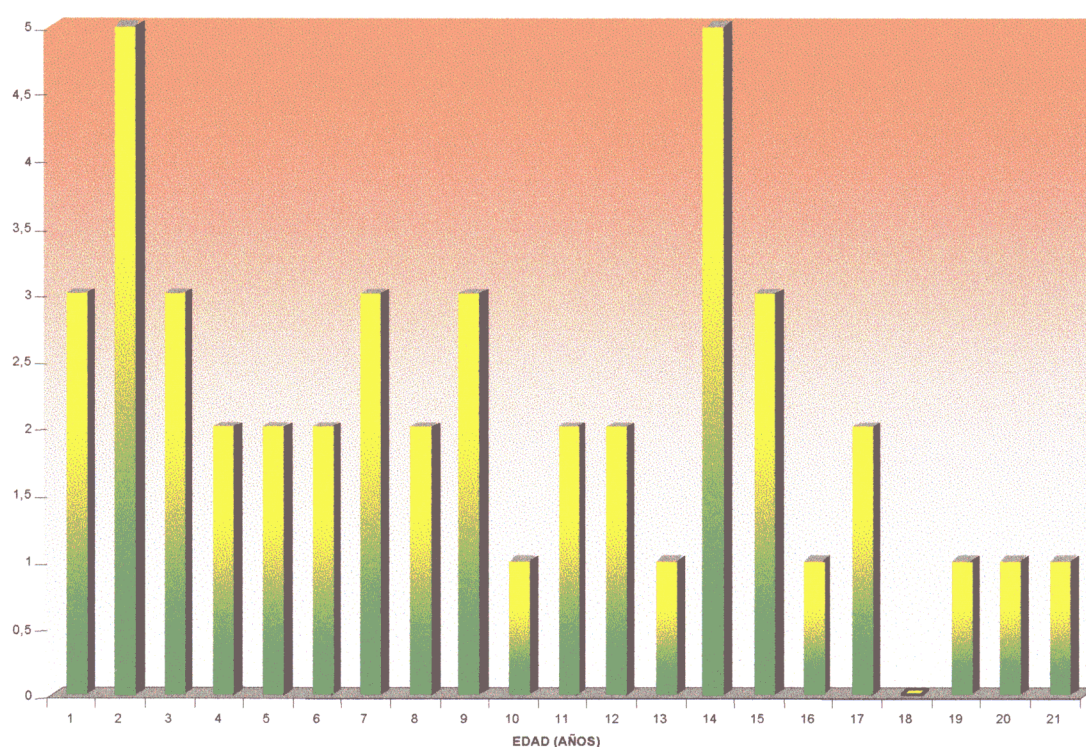


Fig IV-1. RESULTADOS. Distribución de los RMSs según la edad.

La relación estadística de las **características clínico-patológicas** de los pacientes con la edad de presentación (≤ 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).

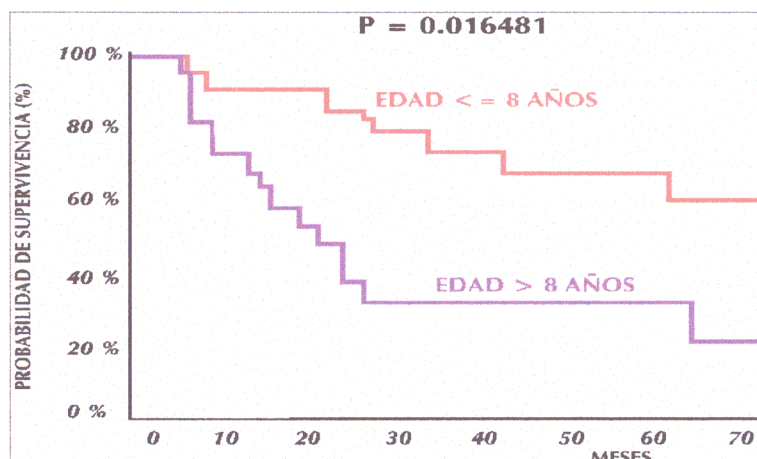


Fig. IV-2. Supervivencia según la edad (≤ 8 ó > de 8 años).

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

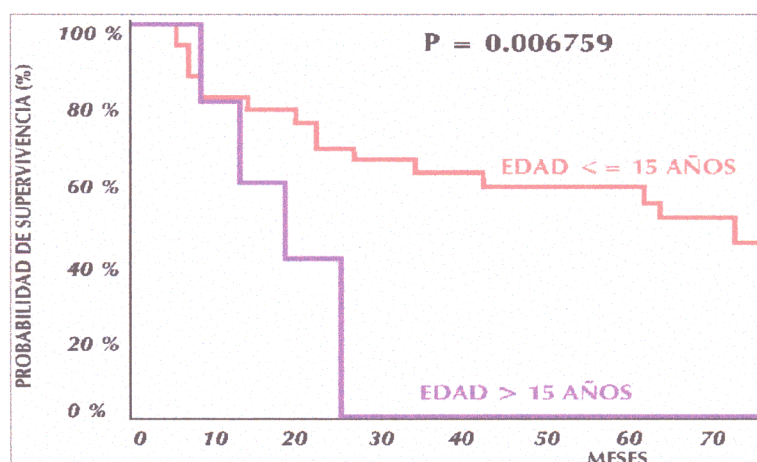


Fig. IV-3. Supervivencia según la edad (≤ 15 ó > de 15 años).

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

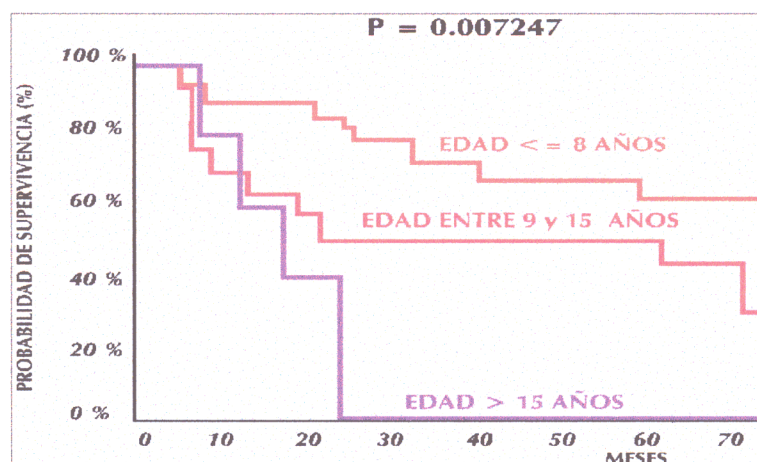


Fig. IV-4. Supervivencia según la edad (menor de 8, entre 9-15 o mayor de 15 años).

- ❖ 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.

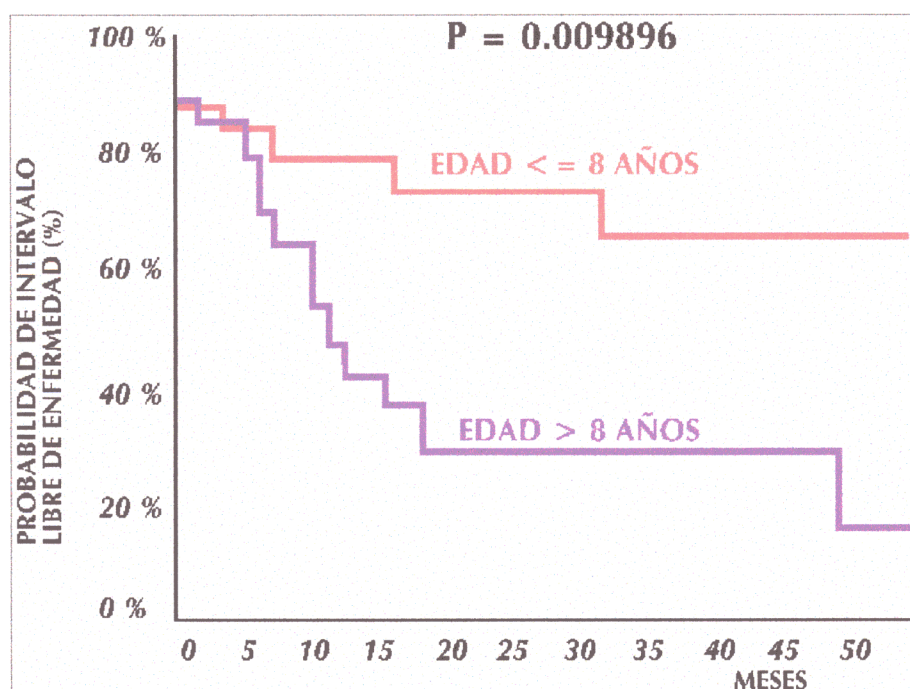


Fig. IV-5. Intervalo libre de enfermedad según la edad (≤ 8 ó $>$ de 8 años).

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

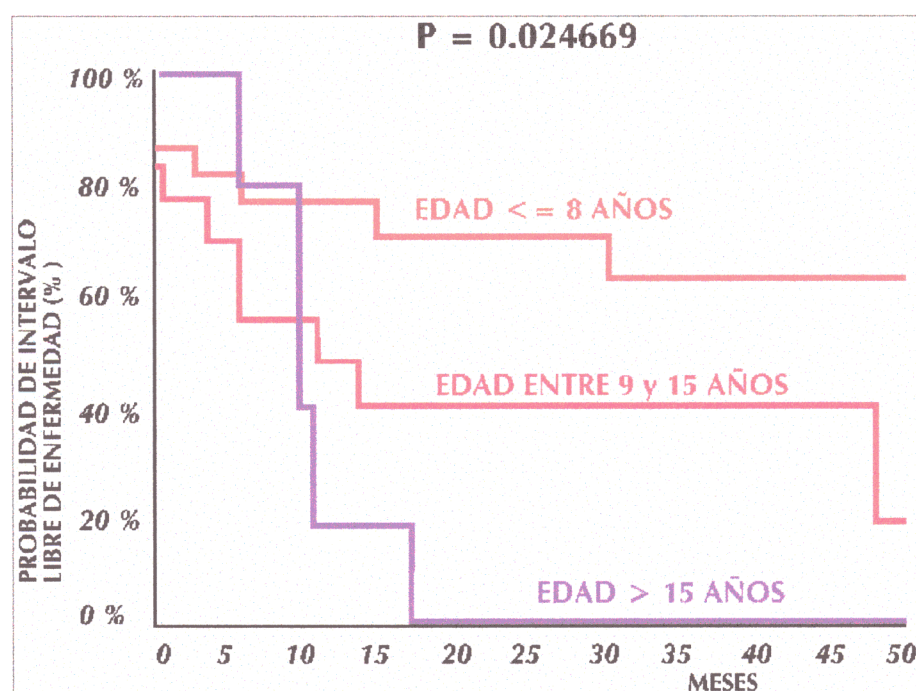


Fig. IV-6. Intervalo libre de enfermedad según la edad (menor de 8, entre 9-15 ó mayor de 15 años).

- 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
SEXO:			
❖ Hombres: 29	15 (68.18%)	14 (60.86%)	p=0.8354902
❖ Femenino: 16	7 (31.82%)	9 (39.14%)	
LOCALIZACIÓN:			
❖ Desfavorable: 28	12 (54.54%)	16 (69.56%)	p=0.5286341
❖ Favorable :17	10 (45.46%)	7 (30.44%)	
ESTADIO:			
❖ I-II: 22	12 (54.54%)	10 (43.47%)	p=0.6612987
❖ III-IV: 23	10 (45.46%)	13 (56.52%)	
TIPO HISTOLÓGICO:			
❖ 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
SEXO:			
❖ Hombres: 29	25 (64.10%)	4 (66.66%)	p=0.7364410
❖ Femenino: 16	14 (35.90%)	2 (33.34%)	
LOCALIZACIÓN:			
❖ Desfavorable: 28	24 (61.53%)	4 (66.66%)	p=0.8275740
❖ Favorable :17	15 (38.47%)	2 (33.34%)	
ESTADIO:			
❖ I-II: 22	20 (51.28%)	2 (34.34%)	p=0.7054741
❖ III-IV: 23	19 (48.72%)	4 (66.66%)	
TIPO HISTOLÓGICO:			
❖ 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)	
LOCALIZACIÓN:			
❖ Desfavorable: 28	11(68.75%)	17 (5.62%)	p=0.7267344
❖ Favorable:17	5(31.25%)	12 (41.38%)	
ESTADIO:			
❖ I-II:22	6(37.5%)	16(55.17%)	p=0.5847758
❖ III-IV:23	10(62.5%)	13(44.83%)	
TIPO HISTOLÓGICO:			
❖ Embrionario:31	12(75%)	19(65.51%)	p=0.7467035
❖ Alveolar:14	4(25%)	10(34.49%)	

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).

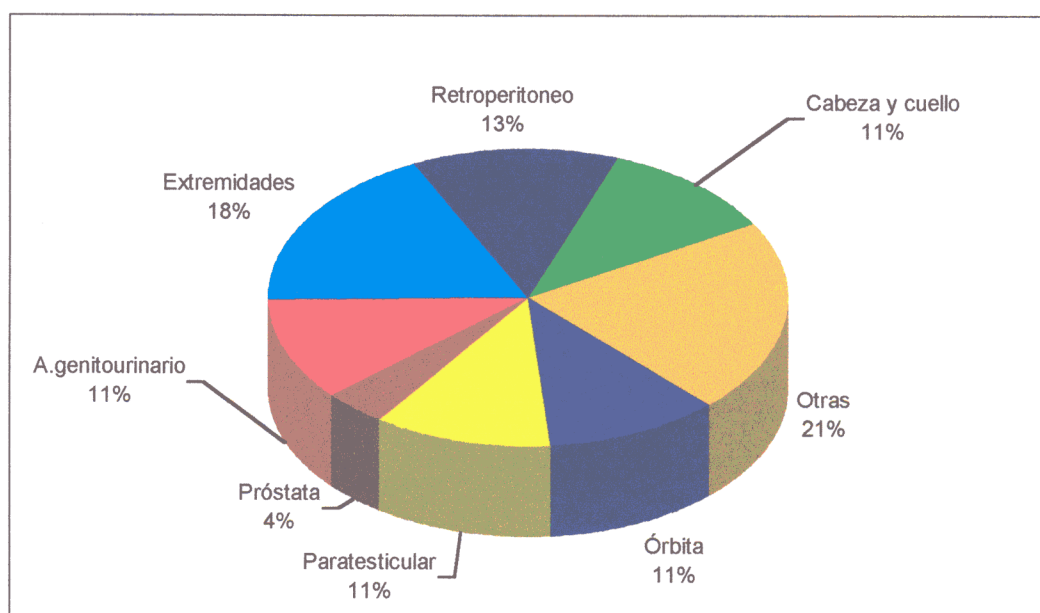


Fig. IV-7. RESULTADOS. Distribución de los RMSs según la localización.

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).

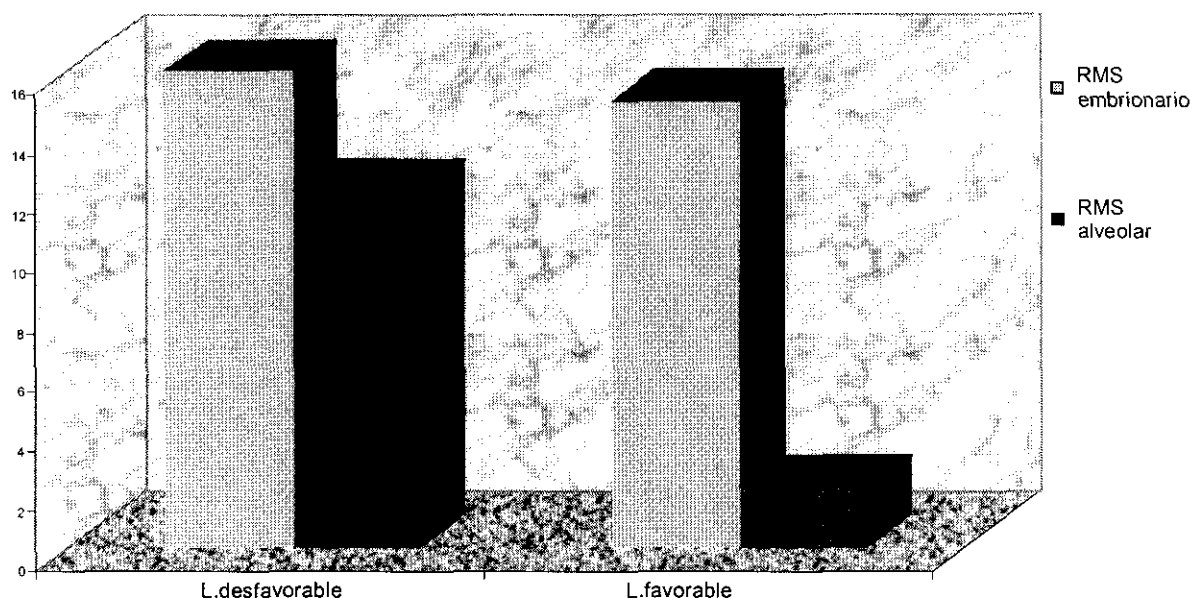


Fig. IV-8. RESULTADOS: Distribución del tipo histológico según la localización.

- ❖ 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

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

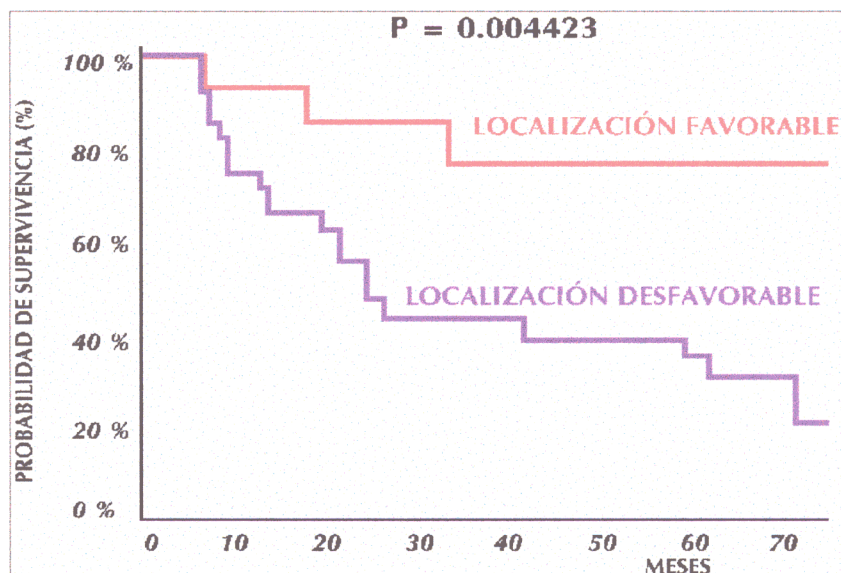


Fig IV-9. Supervivencia según la localización (localización desfavorable-localización favorable).

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

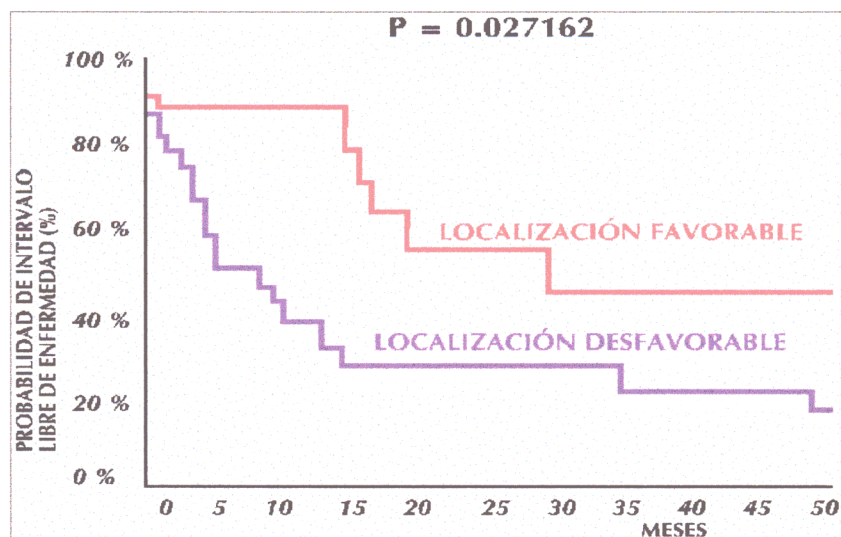


Fig IV-10. Intervalo libre de enfermedad según la localización (localización desfavorable-localización favorable).

- ❖ 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%)	

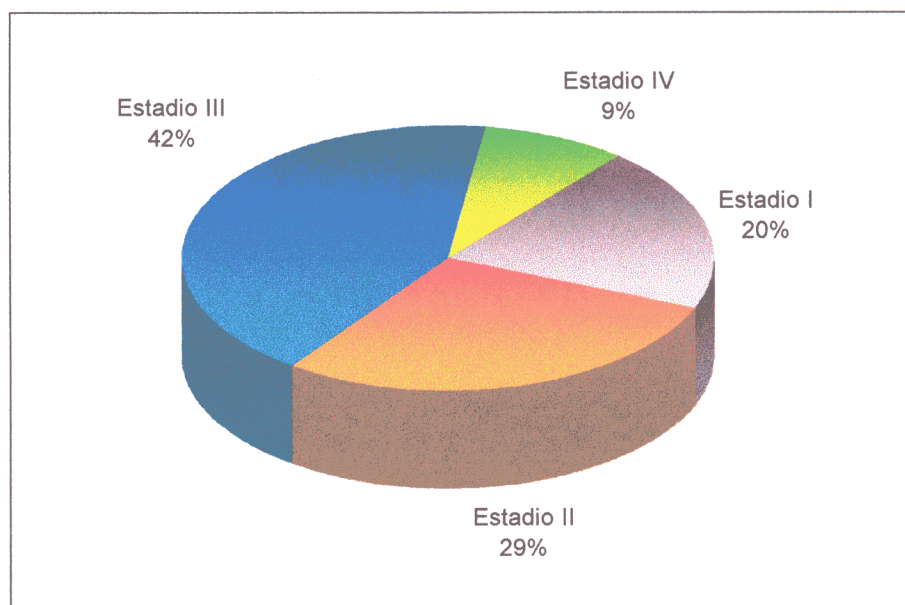
Tabla IV-VI. RESULTADOS. Relación estadística de la localización con diversos parámetros clínicos e histológicos.

- ❖ 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.



Fg. 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 ($p=0.0611896$).

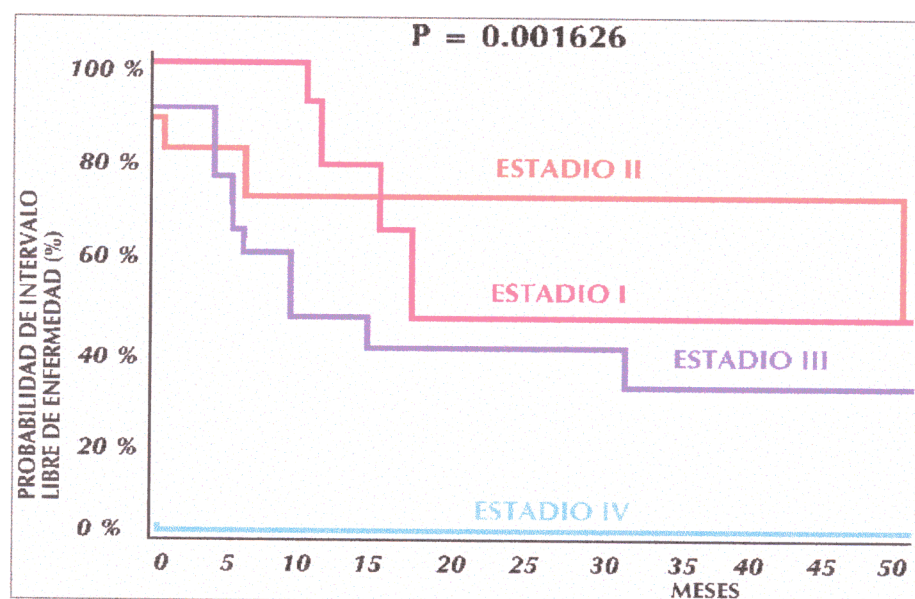


Fig IV-12. Intervalo libre de enfermedad según el estadio clínico dividido en cuatro grupos (I, II, III, IV).

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

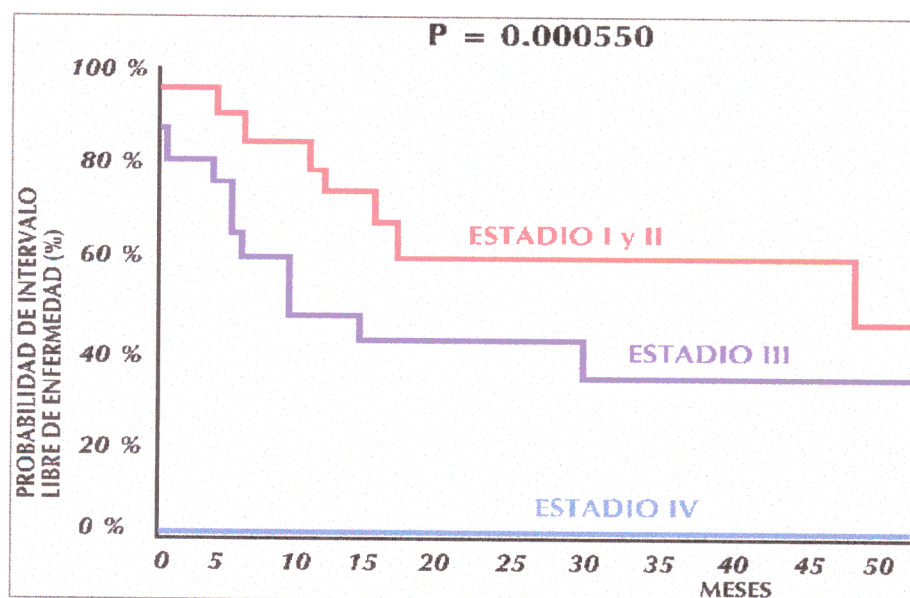


Fig. IV-13. Intervalo libre de enfermedad según el estadio clínico dividido en tres grupos (I-II, III, IV).

❖ 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.

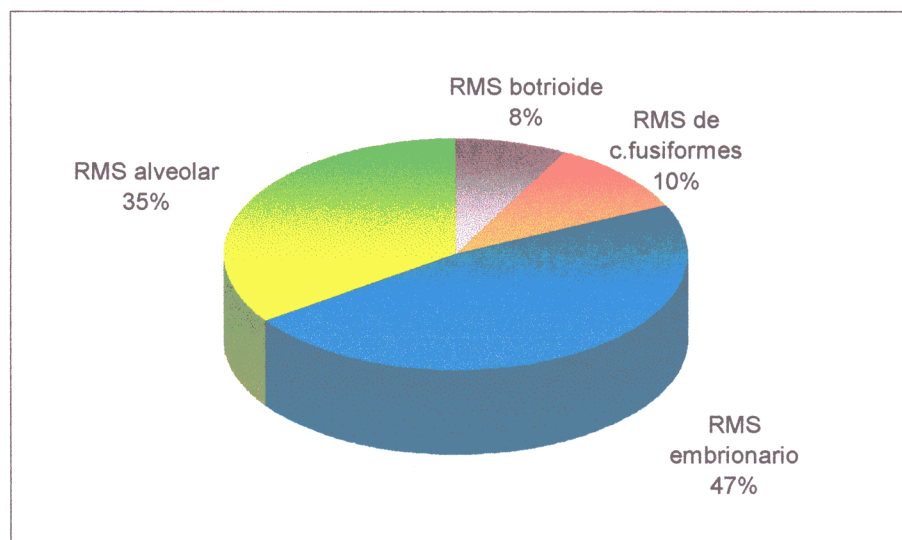


Fig IV-14. RESULTADOS. Distribución de los RMSs según el tipo histológico.

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 rabdomioblástica, 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” subyacente 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 atípia 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** ($p=0.648197$).

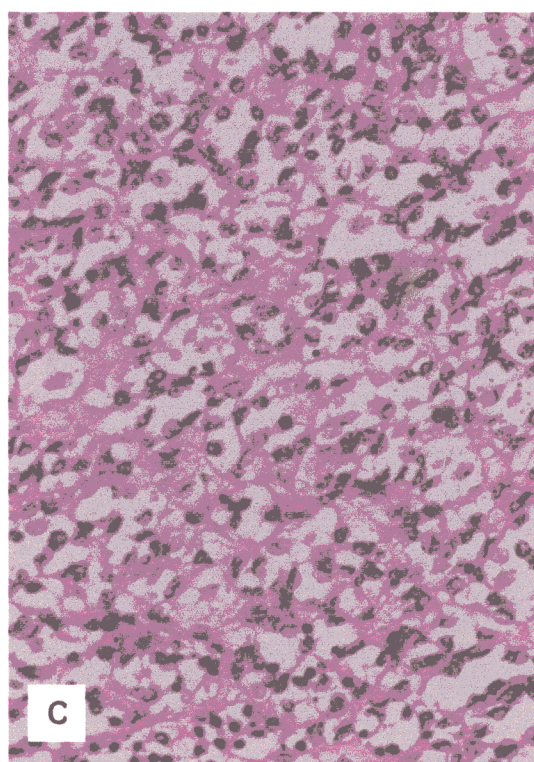
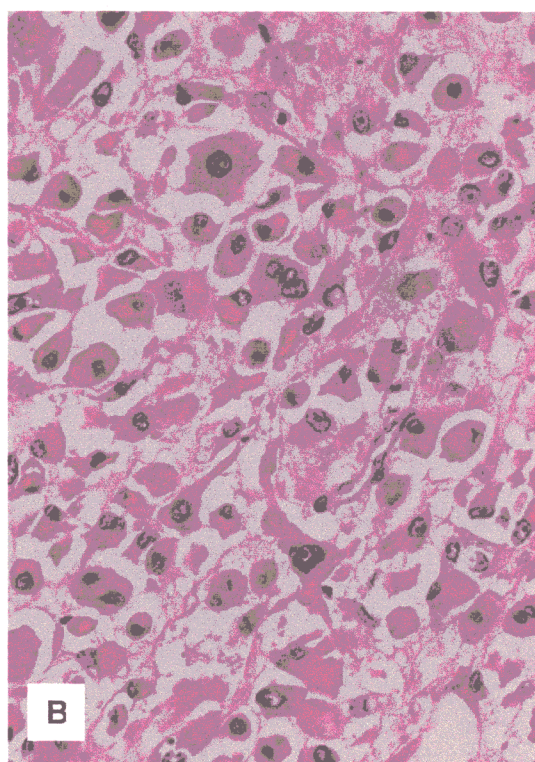
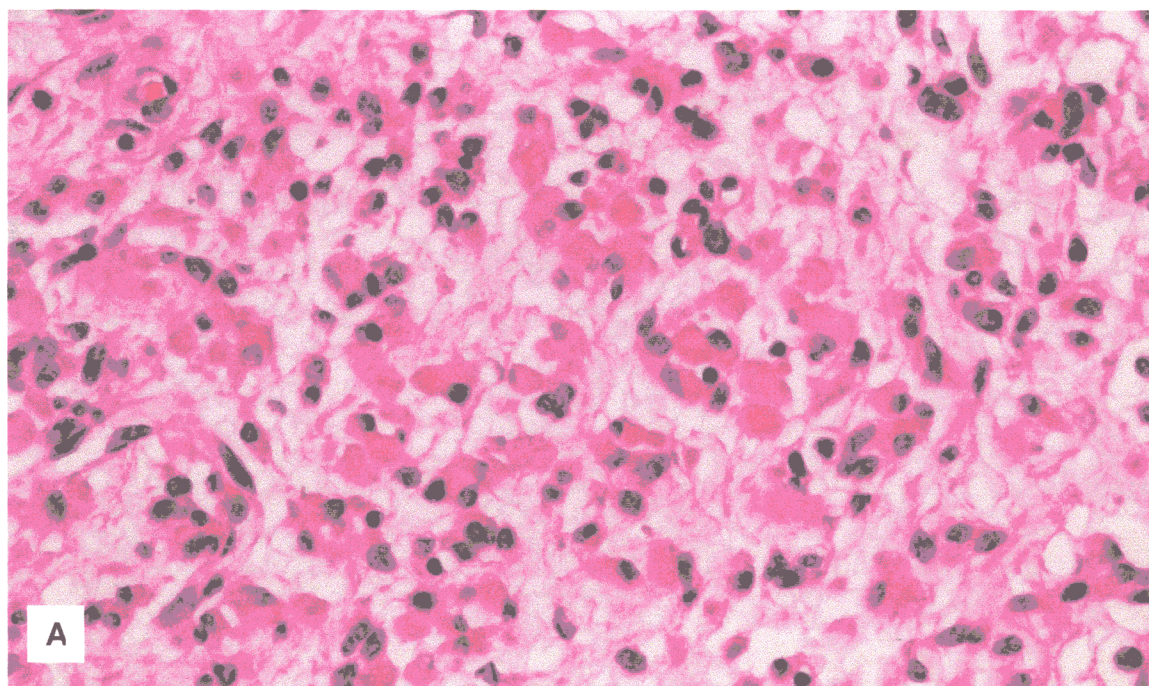


Lámina IV-I.- RMS embrionario mostrando grados variables de diferenciación celular.

A.- Focos de células con moderada diferenciación rabdomioblástica. 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 rabdomioblástica. Las células son redondas, con citoplasma escaso.

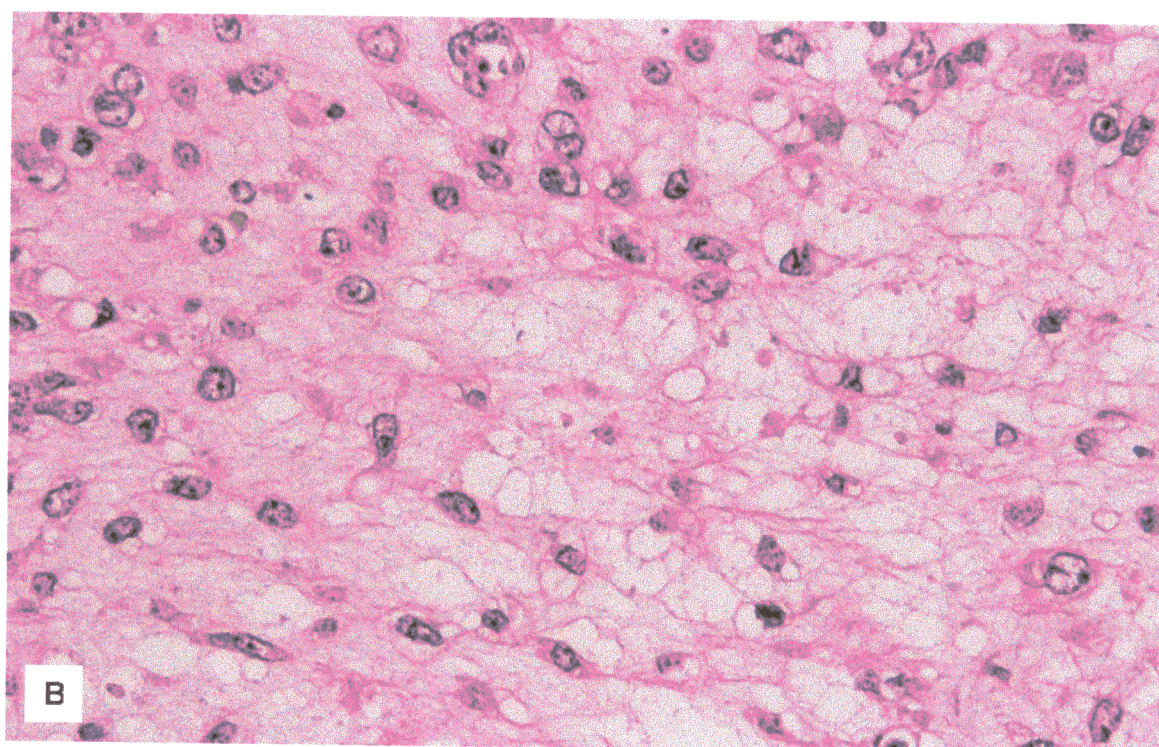
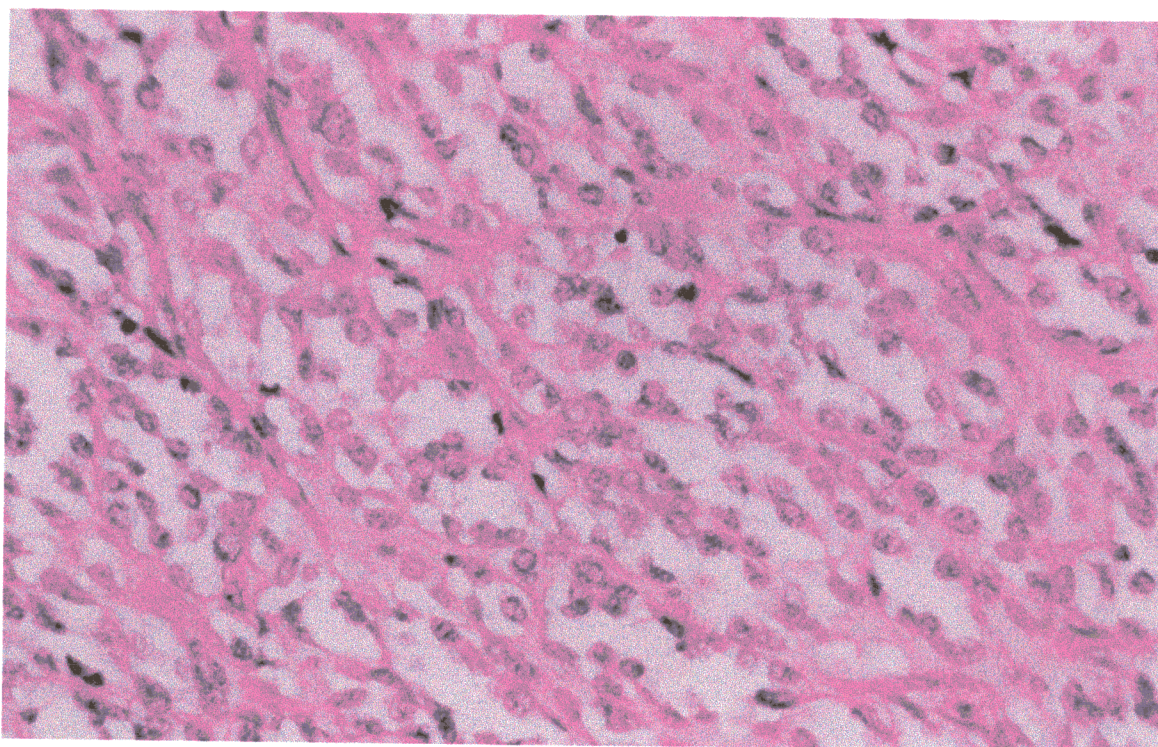


Lámina IV-II.- RMS embrionario mostrando grados variables de atípia nuclear.

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.

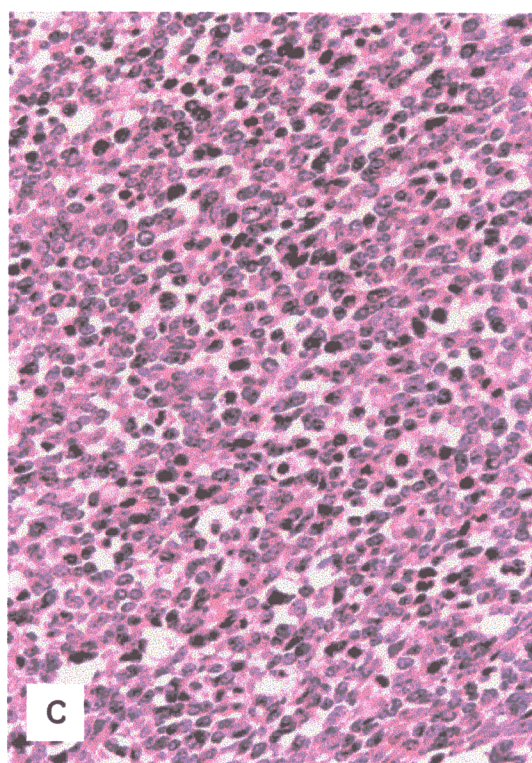
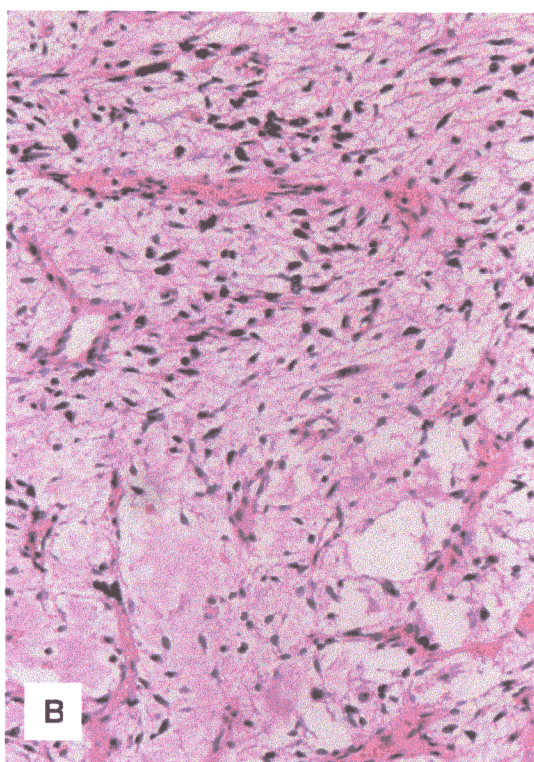
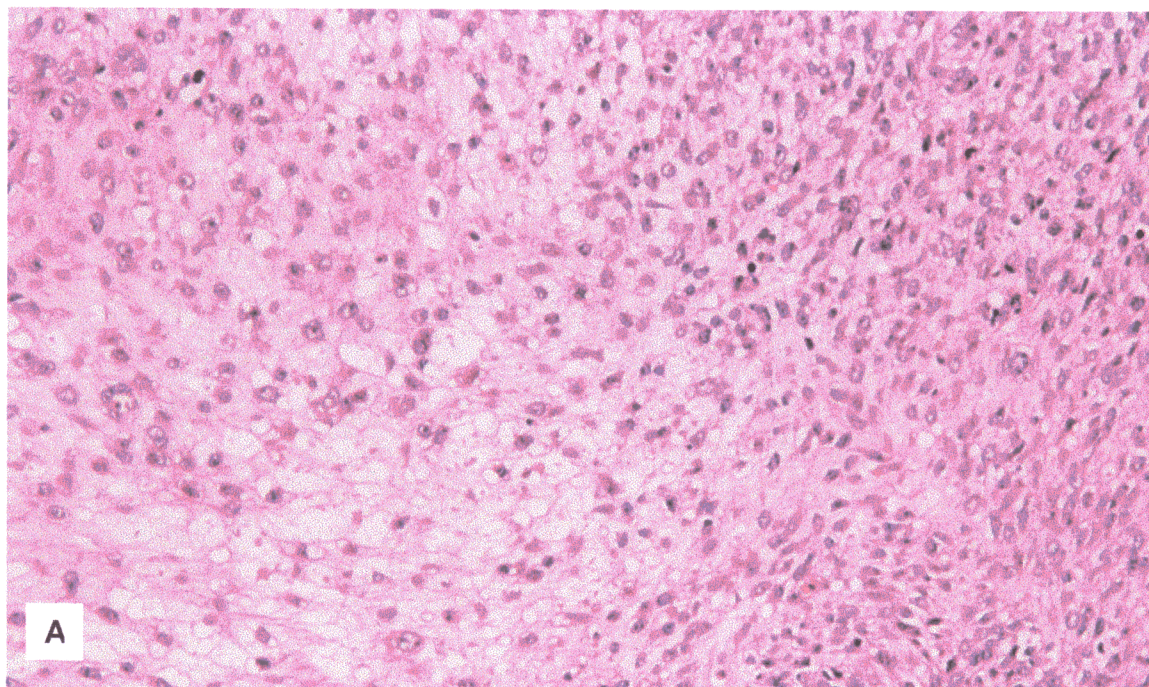


Lámina IV-III. RMS embrionario mostrando grados variables de densidad celular.

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.

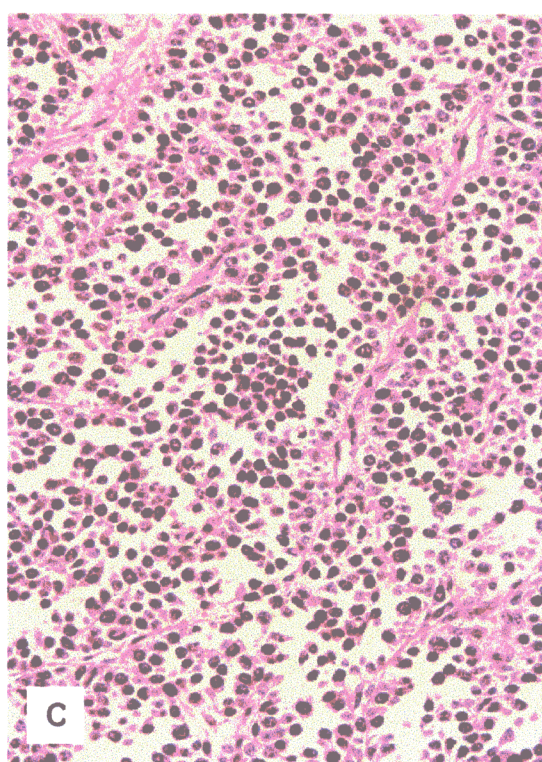
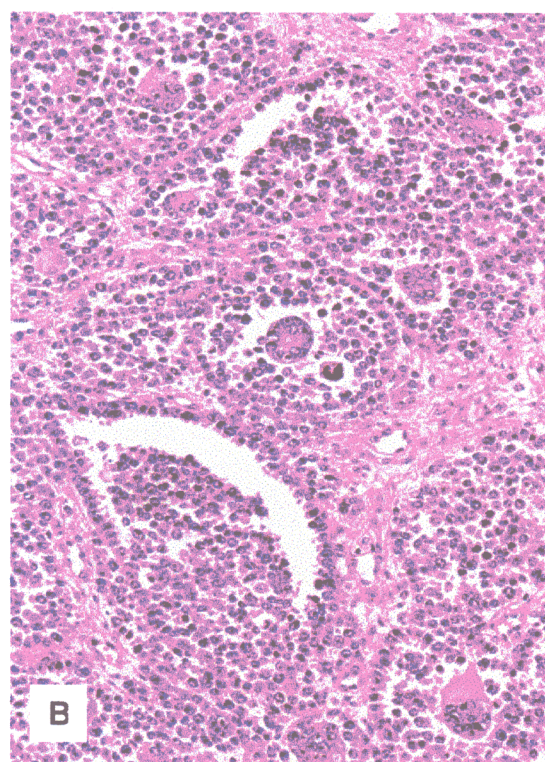
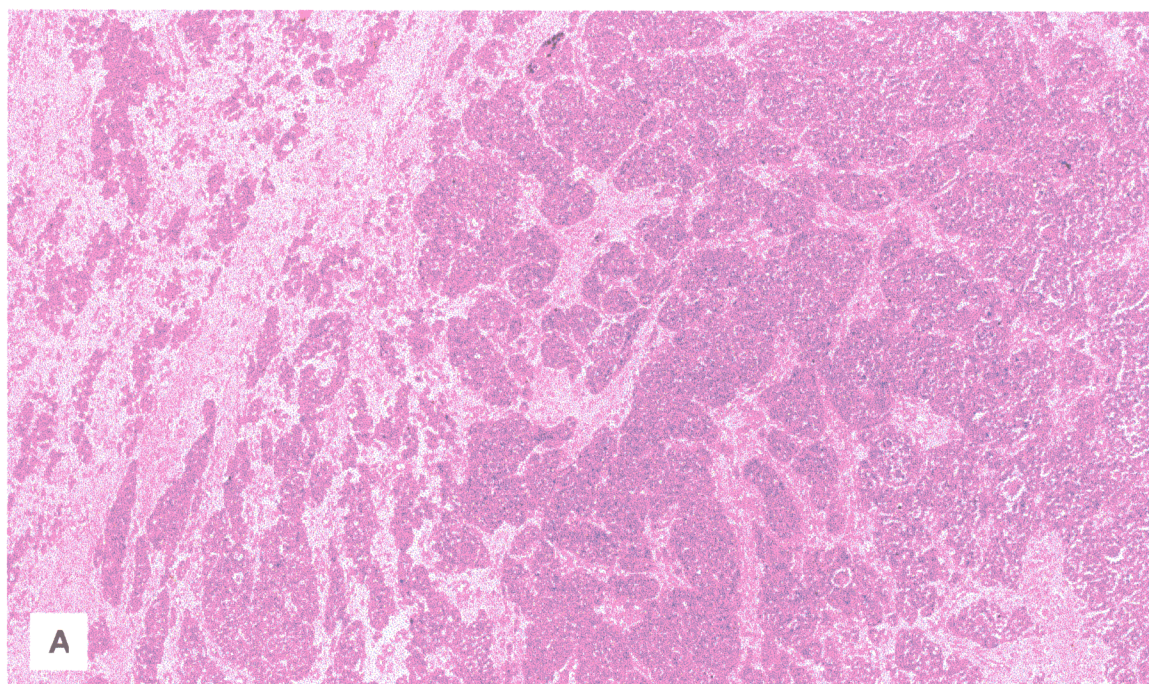


Lámina IV-IV.- RMS alveolar clásico.

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

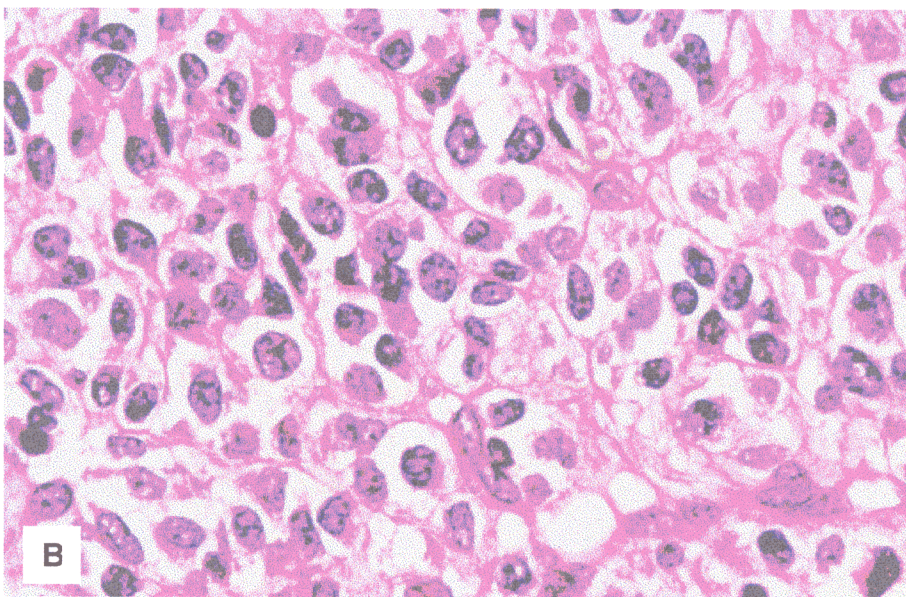
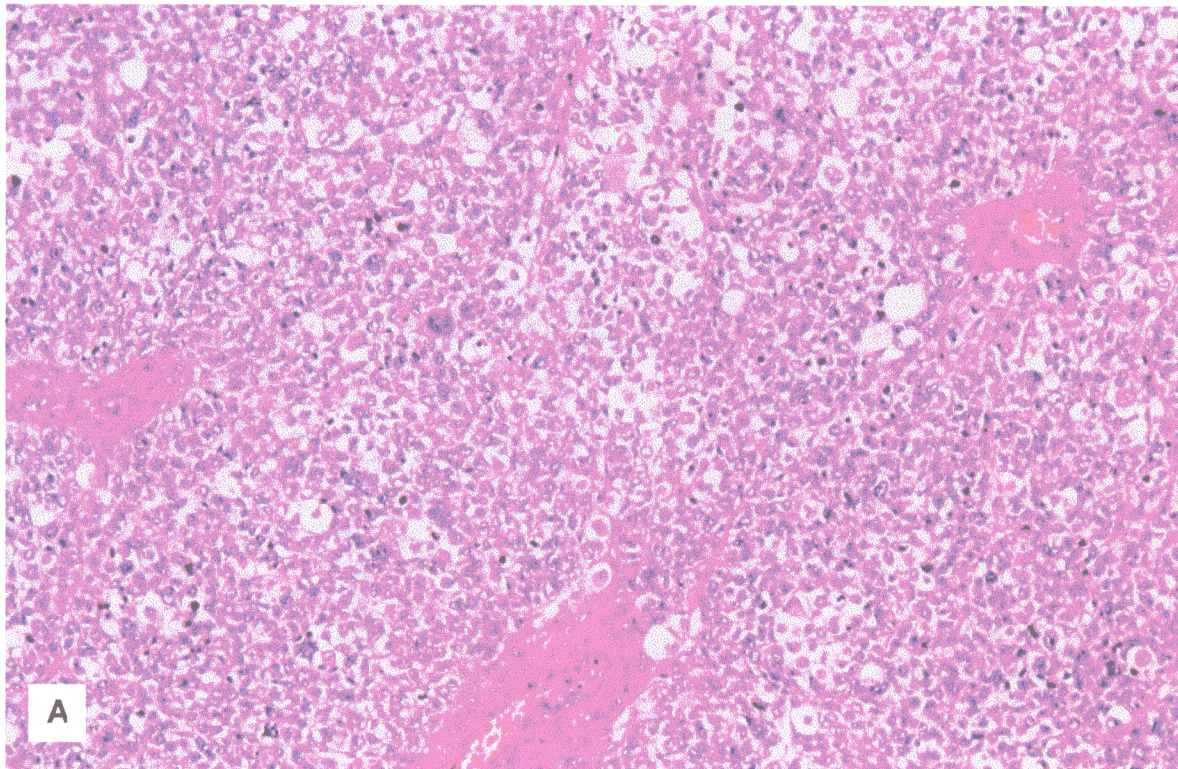


Lámina IV-V.- RMS alveolar sólido.

- 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.

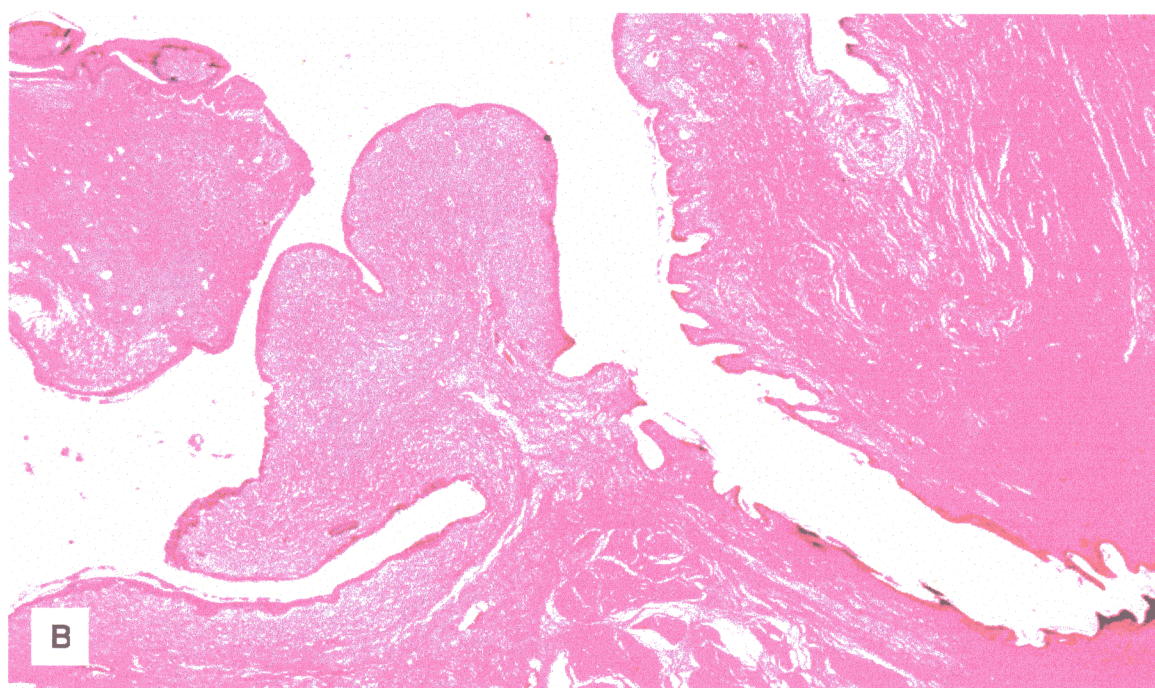
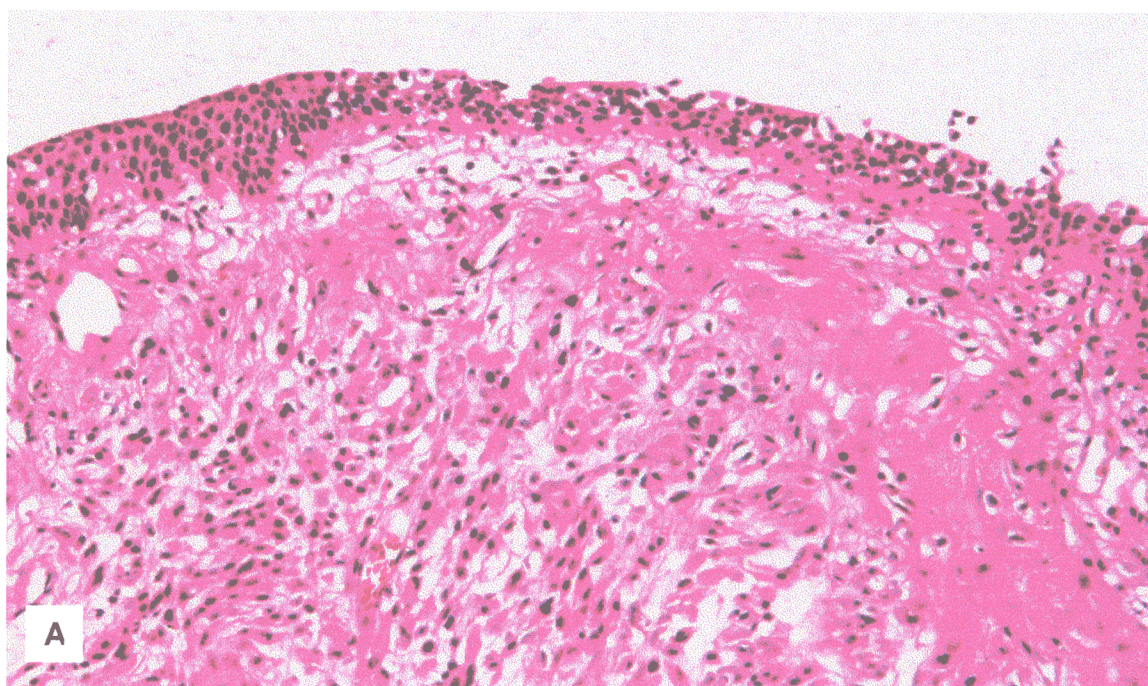


Lámina IV-VI. - RMS embrionario variante botrioide.

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.

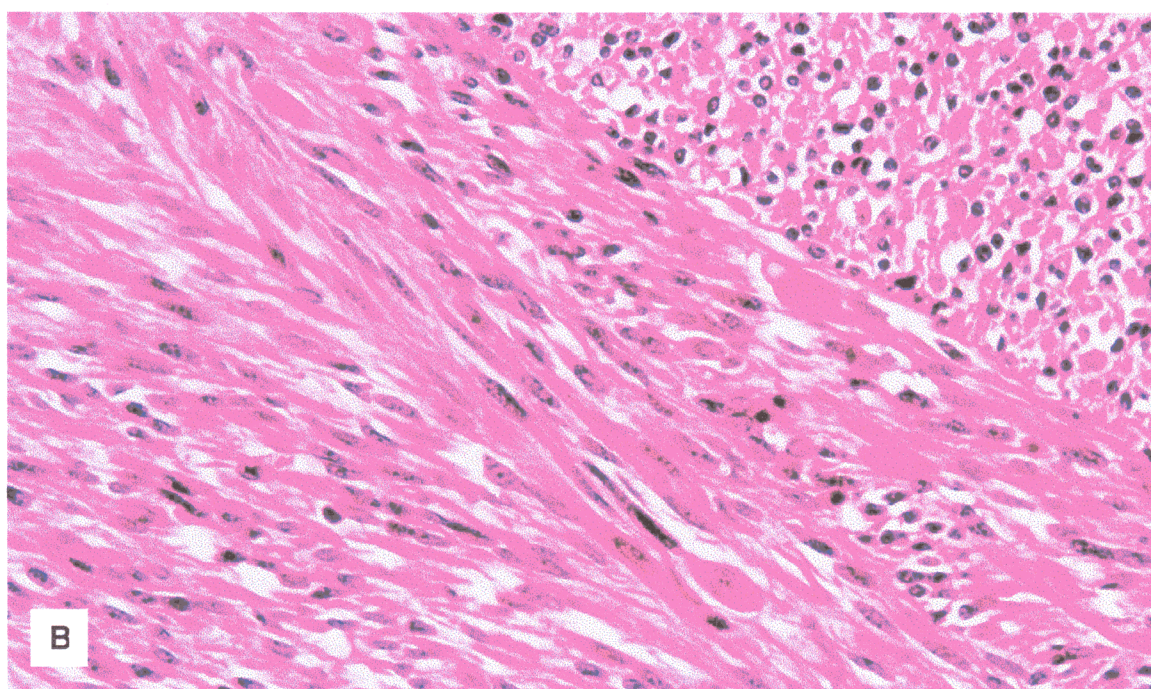
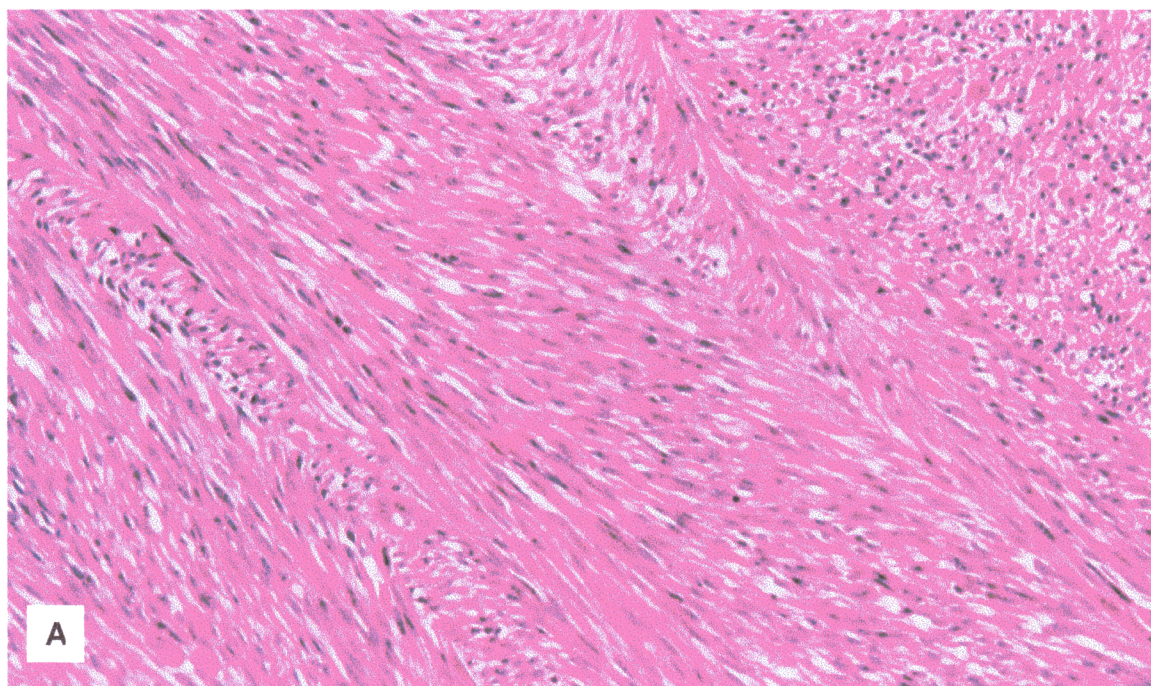


Lámina IV-VII.- RMS embrionario variante de células fusiformes.

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 hipercromático 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).

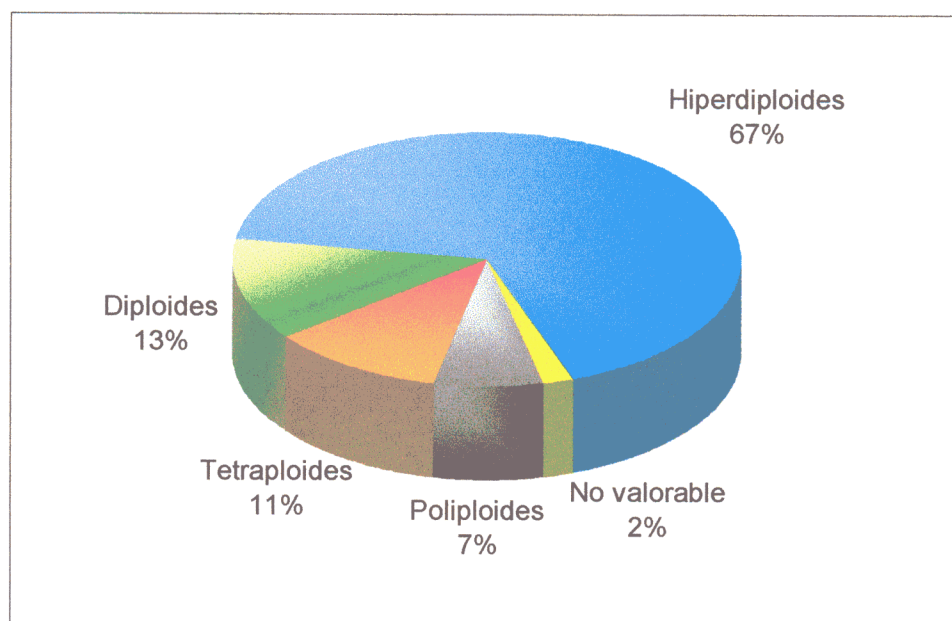


Fig. IV-15. RESULTADOS. Distribución de los RMSs según el tipo de histograma.

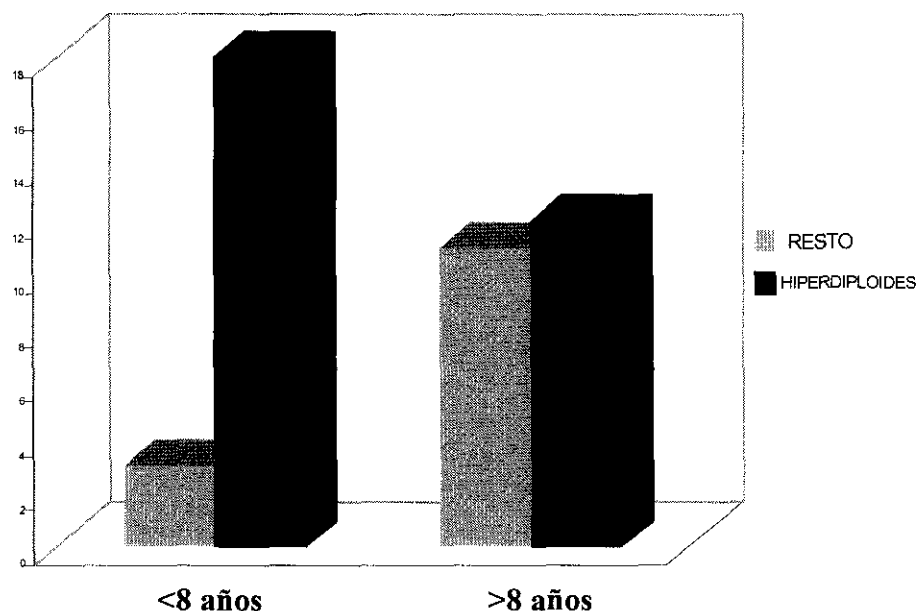


Fig. IV-16. RESULTADOS. Distribución de la edad según el tipo de histograma.

También se intentó evaluar la asociación entre la ploidía estratificada en los cuatro patrones valorados (Lámina IV-VIII) y los **parámetros clínicopatológicos** 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.

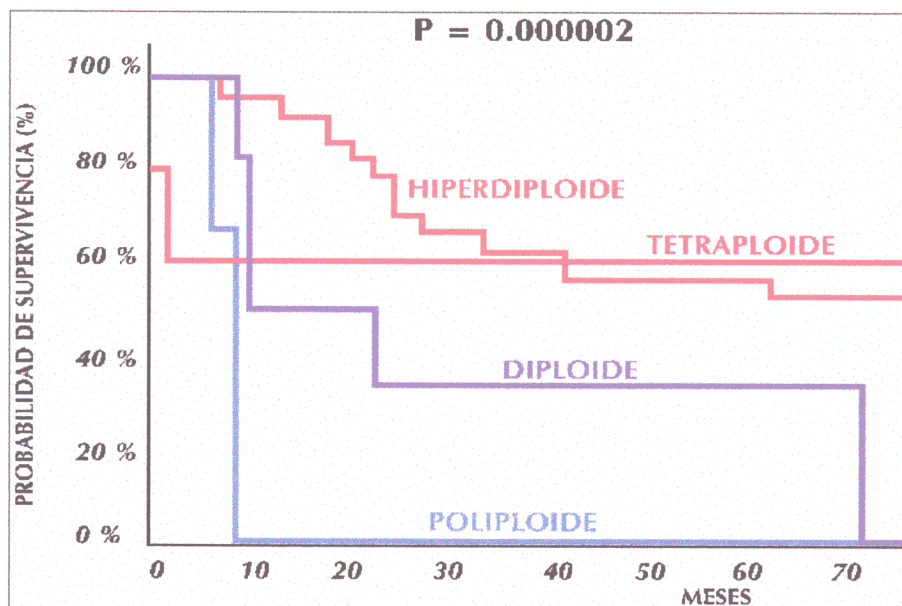


Fig.IV-17.- Supervivencia según la ploidía (Hiperdiploides/ diploides/ tetraploides/ poliploides). Se encuentran diferencias significativas:

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

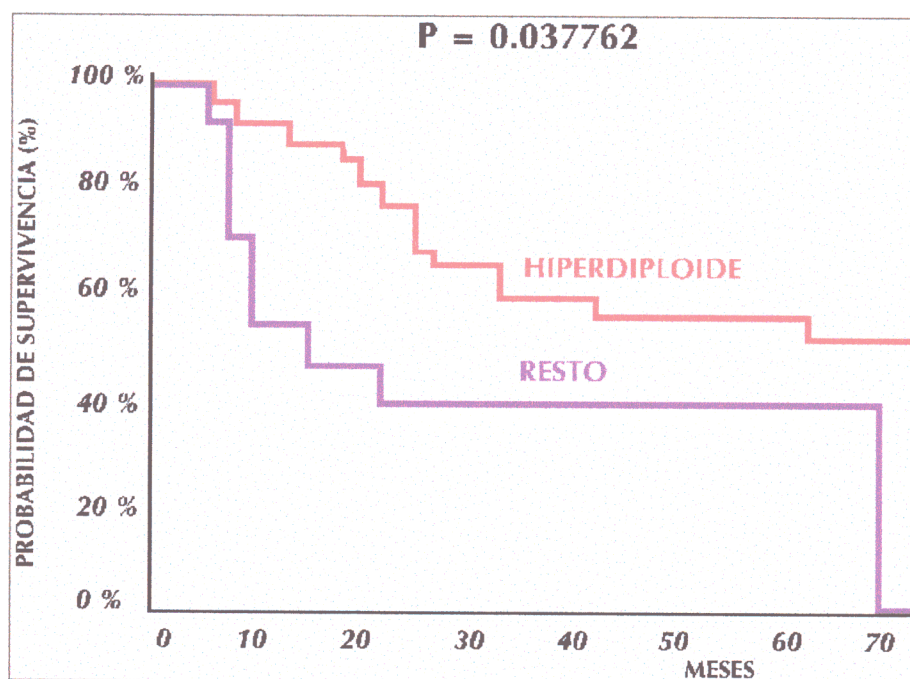


Fig. IV-18.- Supervivencia según la ploidía (Hiperdiploides y resto).

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

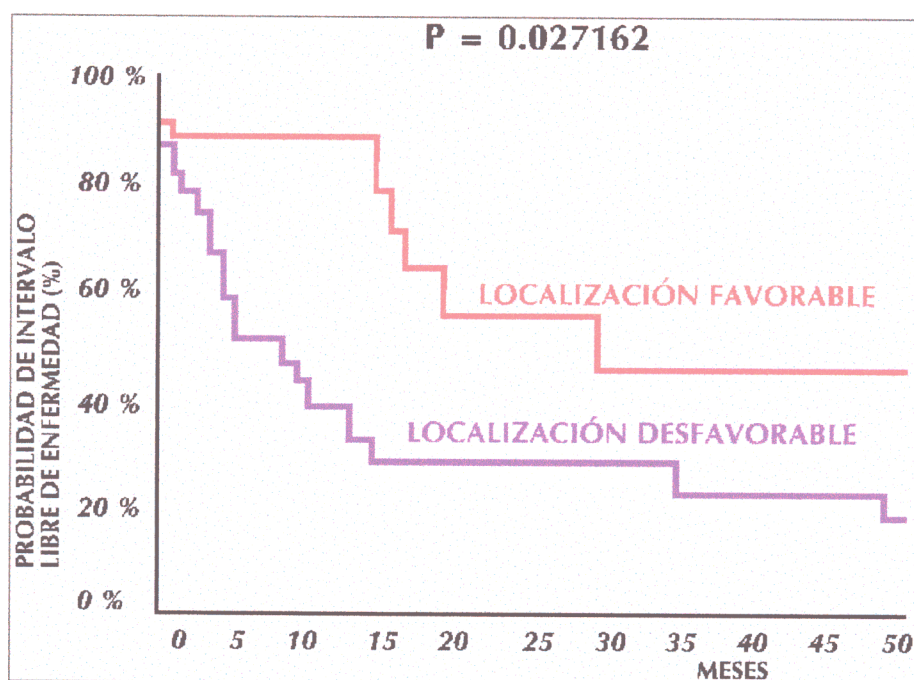


Fig. IV-19.- Intervalo libre de enfermedad según la ploidía (Hiperdiploides/ diploides/ tetraploides/ poliploides). Se encuentran diferencias significativas:

- ❖ 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)	
EDAD:			
➤ ≤ de 8 años:21	18(60%)	3(21.42%)	p=0.0370076
➤ > de 8 años:23	12(40%)	11(78.58%)	
SEXO:			
➤ Hombre:28	9(63.33%)	9(64.28%)	p=0.7798006
➤ Mujer:16	11(36.37%)	5(35.72%)	
LOCALIZACIÓN:			
➤ Favorable:17	14(46.66%)	3(21.43%)	p=0.2014232
➤ Desfavorable: 27	16 (53.34%)	11(78.57%)	
ESTADIO:			
➤ I-II:22	18(60%)	4(28.57%)	p=0.1013098
➤ III-IV:22	12(40%)	10(71.42%)	
HISTOLOGÍA:			
➤ Embrionario:30	22(73.33%)	8(57.15%)	p=0.5256457
➤ Alveolar:14	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)	POLIPLOIDE (n=3 casos)
EDAD				
• ≤ de 8 años	1 (17%)	18 (60%)	1 (20%)	1 (33%)
• > de 8 años	5 (83%)	12 (40%)	4 (80%)	2 (67%)
SEXO				
• Mujer	2 (33%)	19 (63%)	2 (40%)	1 (33%)
• Hombre	4 (67%)	11 (37%)	3 (60%)	2 (67%)
LOCALIZACIÓN				
• Favorable	1 (17%)	14 (47%)	1 (20%)	1 (33%)
• Desfavorable	5 (83%)	16 (53%)	4 (80%)	2 (67%)
ESTADIO				
• I	2 (33%)	6 (20%)	1 (20%)	3 (100%)
• II	1 (17%)	11 (37%)	1 (20%)	
• III	2 (33%)	10 (33%)	3 (60%)	
• IV	1 (17%)	3 (10%)		
T. HISTOLÓGICO				
• RMS botrioide		3 (10%)		3 (100%)
• RMS de c. Fusiformes	1 (17%)	3 (10%)		
• RMS embrionario	2 (33%)	16 (53%)	2 (40%)	
• RMS alveolar	3 (50%)	8 (27%)	3 (60%)	

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
SUPERVIVENCIA	p=0.045147	p=0.092642	p=0.000002
ILE	p=0.072811	p=0.176799	p=0.000170

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

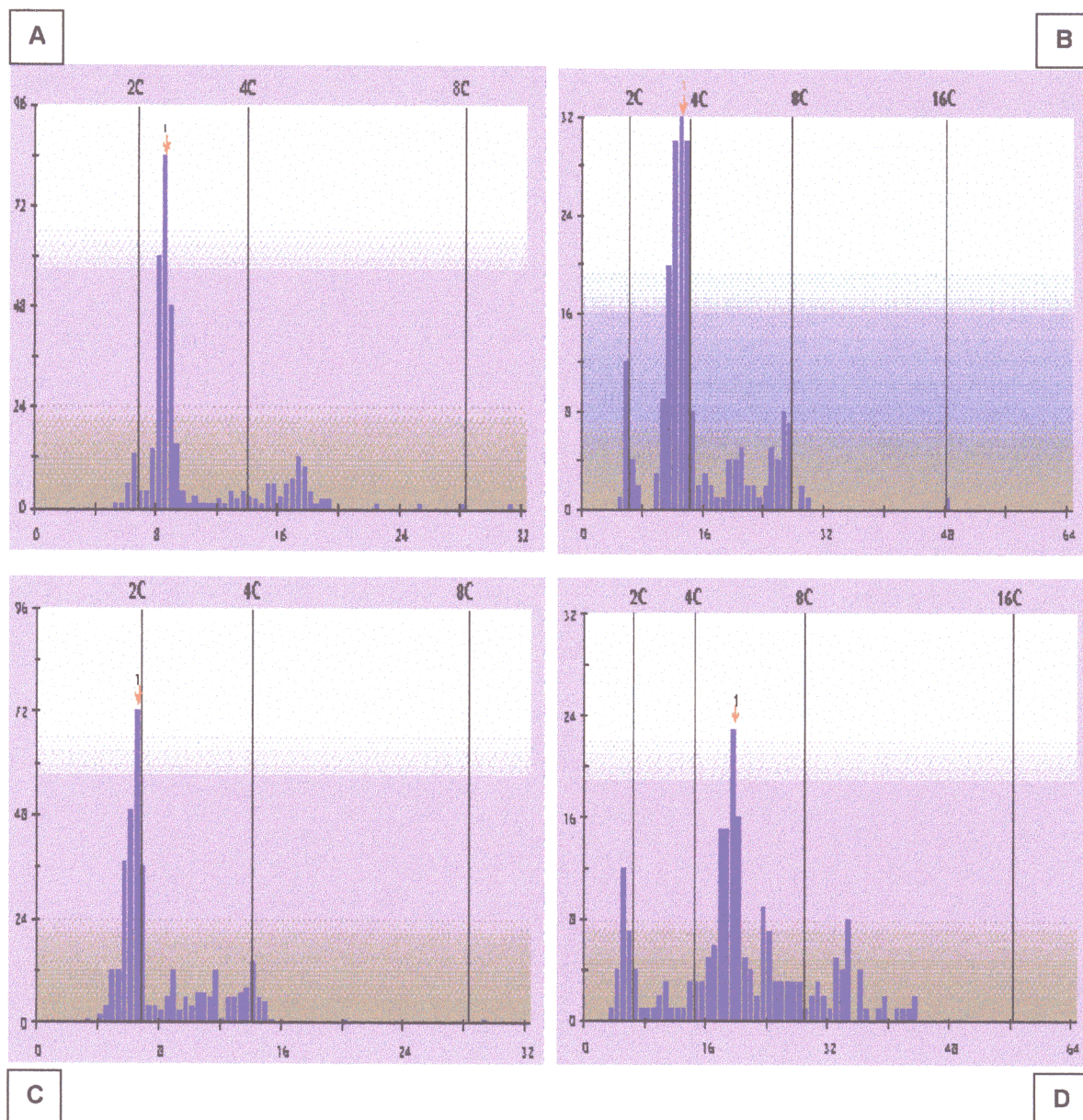


Lámina IV-VIII. Ejemplos de histogramas.:

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).

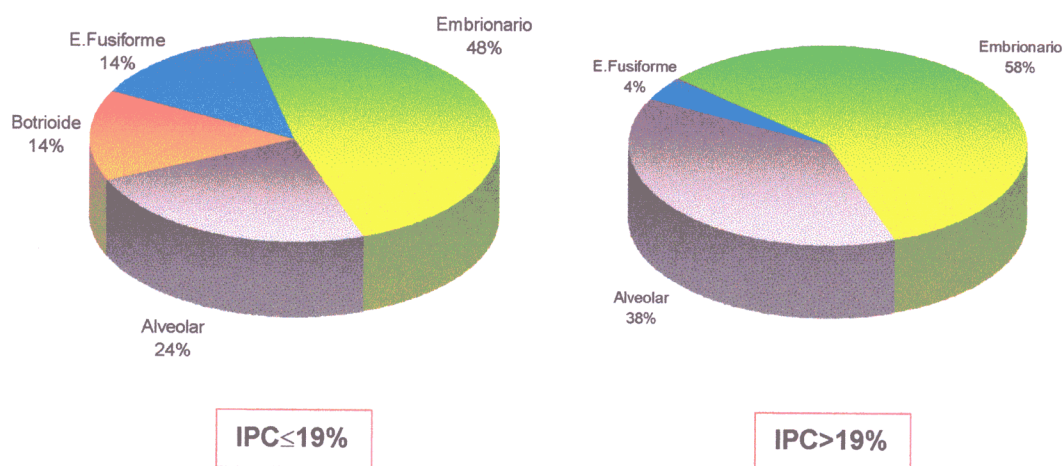


Fig IV-22. RESULTADOS. Distribución del tipo histológico según el IPC:

- * **IPC $\leq 19\%$:** Se observa un predominio relativo de las formas histológicas con buen pronóstico: embrionario botrioid (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).

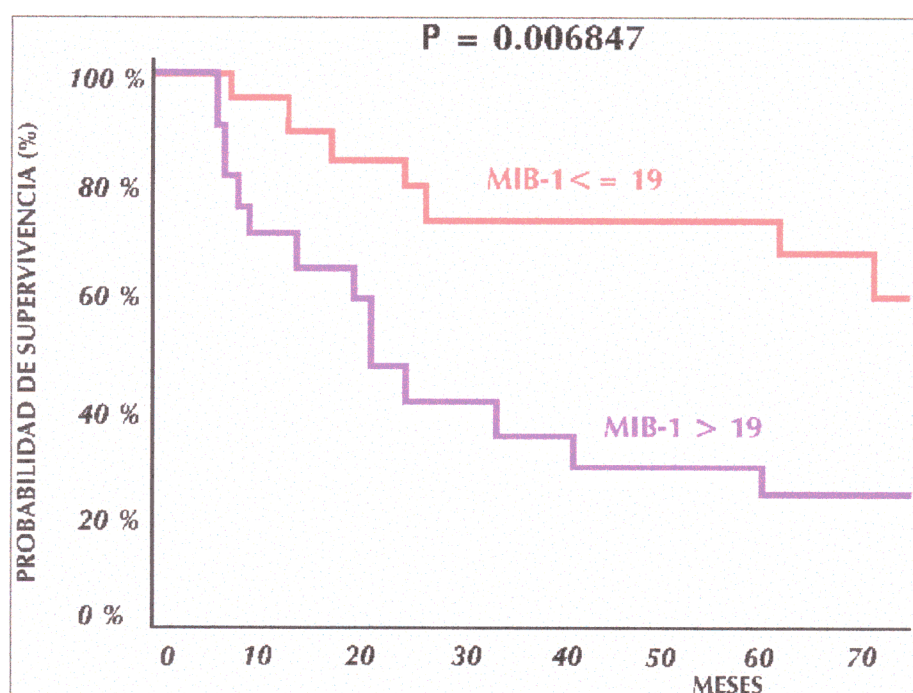


Fig. IV-20. Supervivencia según el IPC ($\leq$ ó $> 19\%$).

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

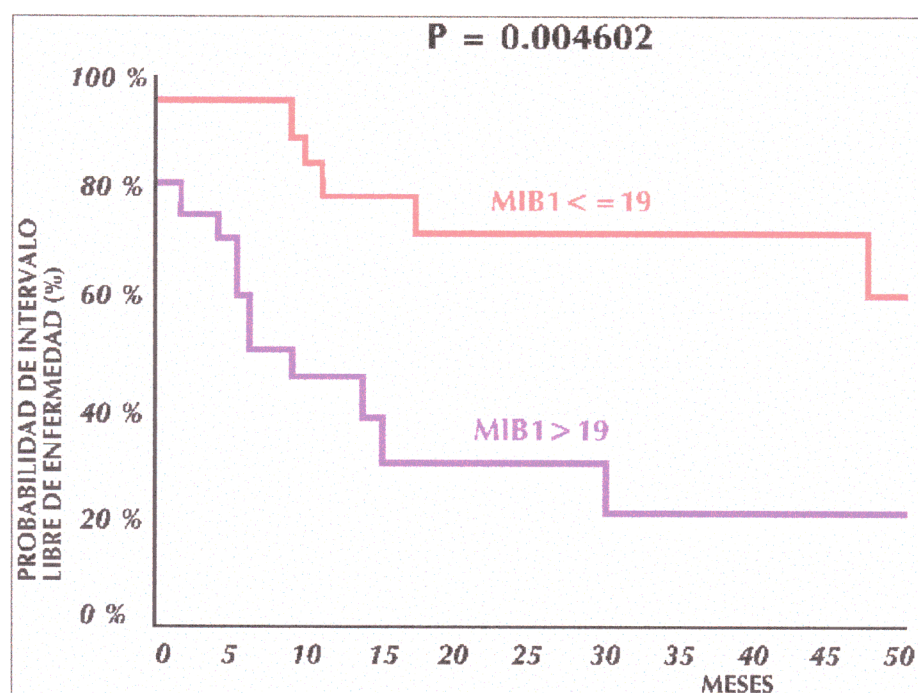


Fig. IV-21. Intervalo libre de enfermedad según el IPC ($\leq$ ó $> 19\%$).

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

	IPC ≤ 19% (21 casos)	IPC > 19% (24 casos)	VALOR p
EDAD:			
➤ ≤ 8 años:22	11 (52.38%)	11 (45.83%)	p=0.8764590
➤ > 8 años:23	10 (47.62%)	13 (54.16%)	
SEXO:			
➤ Hombre:29	15 (71.42%)	14 (58.33%)	p=0.5537096
➤ Mujer:16	6 (28.58%)	10 (41.66%)	
LOCALIZACIÓN:			
➤ Favorable:16	11 (52.38%)	6 (25%)	p=0.1093463
➤ Desfavorable:28	10 (47.62%)	18 (75%)	
ESTADIO:			
➤ I-II:22	13(61.91%)	9(37.5%)	p=0.8764590
➤ III-IV:23	8 (38.09%)	15(62.5%)	
TIPO HISTOLÓGICO			
➤ Embrionario:31	16 (76.17%)	15(62.46%)	p=0.5121564
➤ Alveolar:14	5 (23.83%)	9 (37.54%)	
PLOIDIA:			
➤ 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 χ^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, nuestros 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 multivariantes, 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 parameningeos (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 parameningeos 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 rabdomioblástica 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 botrioide 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 leiomioma (Cavazzana, 1992; Leuscher, 1993) (lámina IV-VII). Estas células tenían marcada diferenciación rabdomioblástica 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
PATRÓN	Difuso	Multinodular
ESTROMA	Mixoide	Ausente (tejido conectivo denso entre grupos celulares grandes)
CÉLULAS GIGANTES	No	Si (frecuentes)
DENSIDAD CELULAR	Condensación celular multifocal	Densidad celular uniforme
ATIPIA NÚCLEAR	+ / ++	+++

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 multivariantes, que investiguen el valor pronóstico de la ploidía frente a los demás factores clínicopatológicos 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; Clemon, 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, botrioide 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 G₀ y G₁ 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 leiomioma 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 rabdomiosarcoma requiere una descripción más detallada y precisa de los diversos tipos histológicos, especialmente para aquellas variantes difícilmente separables morfológicamente (rabdomiosarcoma 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 rabdomiosarcoma alveolar sólido frente al patrón difuso del rabdomiosarcoma embrionario atípico.
- B) La presencia de focos mixoides en el rabdomiosarcoma embrionario atípico y su ausencia en el rabdomiosarcoma alveolar sólido.
- C) La condensación celular multifocal en el rabdomiosarcoma embrionario atípico frente a la densidad celular homogénea del RMS alveolar sólido.

2.- El rabdomiosarcoma 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. Extraskelatal 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 of 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, Vallengio 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, Howedy 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 chemotherapy 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 chemotherapy 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, Wohlemberg 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, Ruggie 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, Chann A.** Proliferation markers in resected 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 Vielt 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, Vielt 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, Kuttlesch J, Rowe S, Ashmun 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.** Embryonal 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.** Proliferation markers 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. 2nd 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.



BIBLIOTECA