





R: 48.386

FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE VALENCIA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

VALOR DEL CULTIVO CELULAR PARA EL EMPLEO DE TECNICAS  
MORFOLOGICAS Y DE BIOLOGIA MOLECULAR EN EL ESTUDIO DE LOS  
TUMORES DE CELULAS REDONDAS DE LA INFANCIA Y ADOLESCENCIA.

Memoria presentada por el licenciado  
SAMUEL NAVARRO FOS para aspirar al  
grado de Doctor en Medicina.  
Valencia, Mayo 1987.

UMI Number: U602921

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U602921

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.

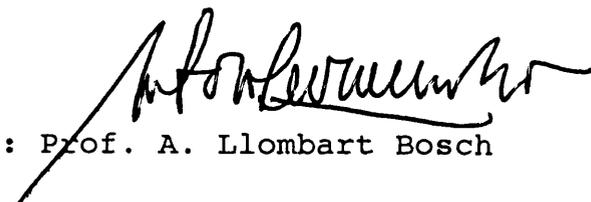


ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

D. ANTONIO LLOMBART BOSCH, Catedrático numerario de Histología y Anatomía Patológica y Director del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

CERTIFICO: Que D. SAMUEL NAVARRO FOS ha realizado personalmente bajo mi dirección, el trabajo para optar al grado de DOCTOR EN MEDICINA titulado:  
" Valor del cultivo celular para el empleo de técnicas morfológicas y de Biología Molecular en el estudio de los tumores de células redondas de la infancia y adolescencia".

Y para que conste, a efectos académicos, expido la presente en Valencia, Mayo 1987.

  
Fdo.: Prof. A. Llobart Bosch

El presente trabajo ha sido realizado bajo el patrocinio de una beca de colaboración del Comité conjunto Hispano-Norteamericano (Grant No. 8309\058) entre los departamentos de Patología de la Universidad de Valencia y el laboratorio de Patología del NCI-NIH Bethesda MD. (USA).

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de Valencia.

Al Prof. Dr. Antonio Llombart Bosch, por su apoyo, orientación y estímulo decisivos para realizar este trabajo.

Al Prof. Dr. Amando Peydró Olaya, por la excelente planificación de esta tesis.

Al Prof. Dr. Antonio Pellín Perez, por iniciarme en los terrenos de la Biología Molecular.

A la Dra. Rosa Noguera Salvá, sin cuyo estímulo y ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos del Departamento, y en especial al Dr. Miguel Perez Bacete, cuya cotidiana correspondencia me ayudó a superar momentos difíciles, y a Alejo Sempere Crespo por su colaboración en la realización del material iconográfico.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr. Timothy J. Triche, for giving to me the opportunity of working in his laboratory.

To Dr. Andrea O. Cavazzana, for his friendship, help, advice and encouragement, that have been essential for my work.

To Dr. Maria Tsokos, Dr. Gregory Kouraklis, Dr. Anna Kelsey, and all the members of the Ultrastructure Section, lab. of Pathology, NIH/ NCI, for having made me feel at home during all the time that I have been working amongst them.

A ROSA y SAMI

INDICE

Pag.

1.	INTRODUCCION.....	11
2.	REVISION BIBLIOGRAFICA	
2.1.	Tumores de células redondas pequeñas de la infancia y adolescencia.....	16
2.1.1.	Sarcoma de Ewing.....	19
2.1.2.	Neuroepitelioma periférico.....	31
2.1.3.	Neuroblastoma.....	36
2.1.4.	Rabdomiosarcoma.....	43
2.1.5.	Osteosarcoma microcelular.....	46
2.2.	Estudio del citoesqueleto y filamentos intermedios.....	48
2.2.1.	Queratina.....	48
2.2.2.	Vimentina.....	50
2.2.3.	Desmina.....	51
2.2.4.	Neurofilamentos.....	52
2.2.5.	Gliofilamentos.....	53
2.3.	Marcadores de especificidad neural.....	54
2.3.1.	HNK-1.....	54
2.3.2.	Cromogranina.....	55
2.4.	Aplicación de técnicas de biología molecular al diagnóstico histopatológico. Expresión de oncogenes.....	57
3.	MATERIAL Y METODOS	
3.1.	Líneas celulares utilizadas.....	62
3.2.	Procedencia y caracterización de las líneas celulares.....	63
3.2.1.	Sarcoma de Ewing	
3.2.1.1.	Línea celular A 4573.....	63
3.2.1.2.	Línea celular Tc 71.....	64
3.2.1.3.	Línea celular 5838.....	65
3.2.1.4.	Línea celular Tc 106.....	65
3.2.2.	Neuroepitelioma periférico	
3.2.2.1.	Línea celular Tc 32.....	66
3.2.2.2.	Línea celular Tc 248.....	67
3.2.2.3.	Línea celular Tc 135.....	68
3.2.3.	Neuroblastoma	
3.2.3.1.	Línea celular KCNR.....	69
3.2.3.2.	Línea celular IM-32.....	70
3.2.4.	Rabdomiosarcoma	
3.2.4.1.	Línea celular Tc 212.....	70
3.2.5.	Osteosarcoma	
3.2.5.1.	Línea celular HOS.....	71
3.2.6.	Carcinoma de Colon	
3.2.6.1.	Línea celular CC.....	72
3.2.7.	Fibroblastos normales	
3.2.7.1.	Línea celular NF.....	73
3.3.	Método de cultivo de tejidos	
3.3.1.	Obtención de las líneas celulares.....	73
3.3.2.	Mantenimiento de las líneas celulares.....	74
3.3.3.	Caracterización de las líneas celulares.....	75

INDICE	Pag.
3.4.	Microscopía óptica por contraste de fase..... 75
3.5.	Microscopía electrónica de transmisión..... 75
3.6.	Inmunofluorescencia indirecta..... 76
3.7.	Estudio del citoesqueleto..... 78
3.8.	Estudio de gránulos neurosecretores..... 80
3.9.	Demostración de filamentos intermedios y gránulos neurosecretores. Western blot..... 81
3.10.	Estudio de expresión de oncogenes.
3.10.1.	Obtención de RNA total a partir de líneas celulares..... 85
3.10.2.	Electroforesis en gel de agarosa. Northern blot..... 87
4.	RESULTADOS
4.1.	Microscopía óptica por contraste de fase..... 92
4.1.1.	Sarcoma de Ewing
4.1.1.1.	Línea celular A 4573..... 92
4.1.1.2.	Línea celular Tc 71..... 93
4.1.1.3.	Línea celular 5838..... 93
4.1.1.4.	Línea celular Tc 106..... 94
4.1.2.	Neuroepitelioma periférico
4.1.2.1.	Línea celular Tc 32..... 95
4.1.2.2.	Línea celular Tc 248..... 95
4.1.2.3.	Línea celular Tc 135..... 96
4.1.3.	Neuroblastoma
4.1.3.1.	Línea celular KCNR..... 97
4.1.3.2.	Línea celular IMR-32..... 97
4.1.4.	Rabdomiosarcoma
4.1.4.1.	Línea celular Tc 212..... 98
4.1.5.	Osteosarcoma
4.1.5.1.	Línea celular HOS..... 98
4.1.6.	Carcinoma de colon
4.1.6.1.	Línea celular CC..... 99
4.1.7.	Fibroblastos normales
4.1.7.1.	Línea celular NF..... 99
4.2.	Microscopía electrónica de transmisión
4.2.1.	Sarcoma de Ewing
4.2.1.1.	Línea celular A 4573..... 101
4.2.1.2.	Línea celular Tc 71..... 101
4.2.1.3.	Línea celular 5838..... 102
4.2.1.4.	Línea celular Tc 106..... 102
4.2.2.	Neuroepitelioma periférico
4.2.2.1.	Línea celular Tc 32..... 103
4.2.2.2.	Línea celular Tc 248..... 103
4.2.2.3.	Línea celular Tc 135..... 104
4.2.3.	Neuroblastoma
4.2.3.1.	Línea celular KCNR..... 104
4.2.3.2.	Línea celular IMR-32..... 105
4.2.4.	Rabdomiosarcoma
4.2.4.1.	Línea celular Tc 212..... 105
4.2.5.	Osteosarcoma
4.2.5.1.	Línea celular HOS..... 106
4.2.6.	Carcinoma de colon
4.2.6.1.	Línea celular CC..... 106

INDICE	Pag.	
4.2.7.	Fibroblastos normales	
4.2.7.1.	Línea celular NF.....	106
4.3.	Estudio inmunohistoquímico mediante inmunofluorescencia indirecta.....	108
4.3.1.	Sarcoma de Ewing	
4.3.1.1.	Línea celular A 4573.....	108
4.3.1.2.	Línea celular Tc 71.....	109
4.3.1.3.	Línea celular 5838.....	110
4.3.1.4.	Línea celular Tc 106.....	110
4.3.2.	Neuroepitelioma periférico	
4.3.2.1.	Línea celular Tc 32.....	111
4.3.2.2.	Línea celular Tc 248.....	111
4.3.2.3.	Línea celular Tc 135.....	111
4.3.3.	Neuroblastoma	
4.3.3.1.	Línea celular KCNR.....	112
4.3.3.2.	Línea celular IMR-32.....	112
4.3.4.	Rabdomiosarcoma	
4.3.4.1.	Línea celular Tc 212.....	113
4.3.5.	Osteosarcoma	
4.3.5.1.	Línea celular HOS.....	113
4.3.6.	Carcinoma de colon	
4.3.6.1.	Línea celular CC.....	113
4.3.7.	Fibroblastos normales	
4.3.7.1.	Línea celular NF.....	114
4.4.	Análisis del citoesqueleto y gránulos neurosecretores mediante Western blot.....	115
4.4.1.	Sarcoma de Ewing	
4.4.1.1.	Línea celular 4573.....	116
4.4.1.2.	Línea celular Tc 71.....	116
4.4.1.3.	Línea celular 5838.....	117
4.4.1.4.	Línea celular Tc 106.....	117
4.4.2.	Neuroepitelioma periférico	
4.4.2.1.	Línea celular Tc 32.....	118
4.4.2.2.	Línea celular Tc 248.....	118
4.4.2.3.	Línea celular Tc 135.....	118
4.4.3.	Neuroblastoma	
4.4.3.1.	Línea celular KCNR.....	119
4.4.3.2.	Línea celular IMR-32.....	119
4.4.4.	Rabdomiosarcoma	
4.4.4.1.	Línea celular Tc 212.....	119
4.4.5.	Osteosarcoma	
4.4.5.1.	Línea celular HOS.....	120
4.4.6.	Carcinoma de colon	
4.4.6.1.	Línea celular CC.....	120
4.4.7.	Fibroblastos normales	
4.4.7.1.	Línea celular NF.....	120
4.5.	Expresión de oncogenes. Northern blot	
4.5.1.	Sarcoma de Ewing	
4.5.1.1.	Línea celular A 4573.....	123
4.5.1.2.	Línea celular Tc 71.....	123
4.5.1.3.	Línea celular 5838.....	123
4.5.1.4.	Línea celular Tc 106.....	123
4.5.2.	Neuroepitelioma periférico	
4.5.2.1.	Línea celular Tc 32.....	124
4.5.2.2.	Línea celular Tc 248.....	124

INDICE	Pag.
4.5.2.3. Línea celular Tc 135.....	124
4.5.3. Neuroblastoma	
4.5.3.1. Línea celular KCNR.....	124
4.5.3.2. Línea celular IMR-32.....	125
4.5.4. Rabdomiosarcoma	
4.5.4.1. Línea celular Tc 212.....	125
5. DISCUSION.....	126
6. CONCLUSIONES.....	145
7. BIBLIOGRAFIA.....	149

## 1. INTRODUCCION

Dentro de las Ciencias Médicas, la Patología ocupa un lugar preferencial, no sólo por su papel fundamental en el diagnóstico de las distintas lesiones, sino porque profundiza en el estudio de las causas de la enfermedad, su patogenia y en definitiva porque trata de esclarecer la biología de los procesos morbosos.

Los tumores, constituyen uno de los blancos a los que se dirigen los mayores esfuerzos científicos en orden a determinar con exactitud el complejo proceso de transformación neoplásica y sus causas, pasos previos indispensables para el descubrimiento y posterior aplicación de una terapéutica eficaz.

Para realizar esto, el patólogo se apoya en unas técnicas, como la utilización de la microscopía electrónica, la histoquímica enzimológica y la inmunohistoquímica, que se han convertido en métodos habituales en la mayoría de laboratorios de Patología.

Junto a estas técnicas, mayoritariamente utilizadas, existen otras como el cultivo de tejidos, cuyo empleo ha estado durante muchos años restringido a los laboratorios de Biología. El cultivo celular, no obstante, no es una técnica nueva, aunque su utilización ha venido teniendo importancia en la última década.

La ventajas que supone trabajar con cultivos celulares,

se resumen en que son una fuente continua de material celular apta para estudios morfológicos simples, como la microscopía de contraste de fase, pero también para otros estudios, que requieren técnicas más elaboradas, como la citogenética, los estudios bioquímicos, la obtención de anticuerpos monoclonales, o la genética molecular. Estas técnicas proporcionan un volumen importante de datos científicos, no solo de valor diagnóstico-pronóstico, sino también útiles para el esclarecimiento de las interrogantes existentes en la biología tumoral.

Dentro de los tumores de la infancia y adolescencia, las neoplasias de células redondas constituyen un grupo de tumores poco frecuentes, que tienen en común su alto grado de indiferenciación celular y que comparten muchos signos clínicos y morfológicos análogos.

Tres grandes problemáticas se plantean en estos tumores:

\* La gran dificultad diagnóstica que poseen cuando son utilizadas técnicas morfológicas básicas como la microscopía de luz y las coloraciones habituales. Así, se trata de tumores muy inmaduros, constituidos por células redondeadas sin signos aparentes de diferenciación. Por todo ello, desgraciadamente, el porcentaje de errores diagnósticos es importante. Es evidente, que incluso patólogos expertos han tenido alguna vez serios problemas de diagnóstico diferencial entre entidades como el sarcoma de Ewing, la variedad sólida de un rabdosarcoma alveolar o la metástasis ósea de un neuroblastoma.

\* La tipificación de alguno de estos tumores, como el neuroepitelioma periférico, cuya estrecha relación con el sarcoma de Ewing, obliga a realizar estudios definitivos que nos den datos acerca de si se trata o no de la misma entidad.

\* La histogénesis de alguno de estos tumores, como el sarcoma de Ewing, cuyo origen todavía no está aclarado.

Por todo ello, los objetivos que nos hemos planteado al realizar esta tesis han sido:

\* Demostrar el valor del cultivo celular y otras técnicas derivadas de tipo morfológico y de biología molecular en el diagnóstico diferencial de los tumores de las células redondas de la infancia y adolescencia.

\* Estudiar la relación entre el neuroepitelioma periférico y el sarcoma de Ewing, en base a criterios morfológicos, inmunohistoquímicos, bioquímicos y de genética molecular.

\* Contribuir a aclarar la histogénesis del sarcoma de Ewing, en base a estudios inmunohistoquímicos y bioquímicos.

## 2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1.- TUMORES DE CELULAS REDONDAS PEQUEÑAS EN LA INFANCIA Y ADOLESCENCIA.

La patología tumoral en los pacientes jóvenes (infancia y adolescencia) está en gran parte representada por los tumores del SNC y los distintos tipos de leucémias. Afortunadamente estas entidades, que en su conjunto suman más del 60% de las neoplásias, están bien conocidas, tienen amplios criterios diagnósticos y numerosos protocolos terapéuticos, algunos de ellos con éxito y altas cifras de curabilidad, como es el caso de las leucémias linfoides agudas.

Sin embargo, existe otro grupo de neoplásias que forman el restante 40% y en el que se incluyen los linfomas, tumores neurales periféricos, sarcomas de partes blandas (en especial el rabdomiosarcoma), tumor de Wilms y tumores primitivos del hueso en orden decreciente de frecuencia, cuyo diagnóstico en muchas ocasiones plantea serias dificultades aún al patólogo más experimentado. Esto es debido a que muchos de estos tumores, sobre todo en sus variantes más inmaduras, presentan unos patrones morfológicos básicos muy semejantes, siendo a veces imposible llegar a un correcto diagnóstico de los mismos, utilizando los medios usuales de la microscopía de

luz y técnicas de rutina.

Es por esta razón, por la que algunos de estos tumores se han agrupado bajo el concepto de tumores de células redondas pequeñas o tumores de células pequeñas azules (debido a que la alta relación núcleo-citoplasma y el hipercromatismo nuclear confieren a dichas células un aspecto azulado, con apenas citoplasma discernible).

Un aspecto importante que justifica la necesidad de realizar un diagnóstico diferencial de estas neoplasias, es el diferente pronóstico y el distinto protocolo terapéutico que se sigue en cada una de ellas.

Clásicamente se han incluido dentro del grupo de tumores de células redondas, cuatro grandes entidades:

- \* Sarcoma de Ewing
- \* Neuroblastoma
- \* Rabdomyosarcoma
- \* Linfoma.

La complejidad que ya existía para establecer un correcto diagnóstico se ha visto acrecentada en las dos últimas décadas, con la descripción de nuevas entidades clinicopatológicas que presentan asimismo caracteres comunes con estos grandes grupos. De modo que actualmente se englobarían dentro de los tumores de células redondas las siguientes neoplasias:

- \* Sarcoma de Ewing óseo
- \* Neuroepitelioma periférico
- \* Sarcoma de Ewing extraesquelético
- \* Variante sólida del

Rabdomiosarcoma alveolar

- \* Tumor de Askin de la pared torácica
- \* Sarcoma primitivo indiferenciado
- \* Linfoma extranodal
- \* Neuroblastoma metastático.

Algunos autores incluyen otros tumores, como osteosarcoma microcelular (Yunis 1986), condrosarcoma mesenquimal (Yunis 1986), y sinoviosarcoma (Triche y Askin 1983), aunque estos últimos suelen presentar unas características clinico-patológicas más claras y por tanto no plantean tantas dudas diagnósticas como los anteriormente mencionados.

Es importante puntualizar asimismo que también en estas dos últimas décadas se han logrado numerosos recursos técnicos que facilitan el diagnóstico diferencial. Este es el caso de los linfomas, sobretodo en los de alto grado de malignidad, cuya localización en ocasiones extranodal condiciona serias dudas diagnósticas. Actualmente con el desarrollo de técnicas inmunológicas con marcadores de superficie y citoplásmicos (Triche y cols. 1986), prácticamente estandarizadas en todos los grandes laboratorios, se está capacitado, en la mayoría de los casos, para tipificar la exacta naturaleza linfoide de la neoplásia, por esta razón los excluimos del presente estudio.

Seguidamente nos vamos a centrar en la revisión bibliográfica de estos tumores de células redondas, poniendo especial énfasis en el sarcoma de Ewing, neuroblastoma y

neuroepitelioma periférico que son el motivo específico de esta tesis.

#### 2.1.1. SARCOMA DE EWING:

En 1921, James Ewing hizo la primera descripción de esta neoplasia, como entidad clinicopatológica y lo llamó "endotelioma difuso del hueso". Ewing lo describió como un sarcoma de células redondas de naturaleza y origen desconocidas, constituido por islotes de células poliédricas pequeñas con citoplasma pálido, núcleo hipercromático, bordes bien definidos y completa ausencia de material intercelular. Asimismo, describió la marcada vascularización del tumor, razón por la cual tomó la denominación inicial de endotelioma difuso o la que tres años más tarde le dió de mieloma endotelial del hueso.

El reconocimiento general de dicho tumor como entidad propia fué cuestionado por numerosos autores, así Willis en 1940, lo consideró como una forma metastática en hueso del neuroblastoma, Schajowicz en 1959 lo redefinió como una patología tumoral ósea con entidad propia y hoy ocupa un lugar entre los tumores primarios de hueso en la clasificación de la OMS (Schajowicz y cols. 1972).

El sarcoma de Ewing, es el segundo tumor maligno óseo en orden de frecuencia que aparece en la infancia y adolescencia. Su pico de incidencia se sitúa en la segunda década de la vida, aunque se han descrito casos extremos (Kim

y cols. 1986). En cuanto a su localización puede darse afectación de cualquier hueso del organismo, pero el más comúnmente afectado es la metáfisis femoral.

Terapeuticamente es un tumor radiosensible y los últimos protocolos se basan en la radioterapia y la quimioterapia. Su pronóstico depende de varios factores clínicos. El más importante de todos es la presencia de metástasis (Wilkins y cols. 1986, Hartman y cols. 1987), también la localización pélvica confiere un mal pronóstico (Wilkins y cols. 1986, Kissane y cols. 1983), así como la VSG elevada (Wilkins y cols. 1986).

Ultimamente han habido varios trabajos acerca de la importancia de la morfología en cuanto al pronóstico del sarcoma de Ewing. Así Llombart Bosch y cols. (1986) y Stefani y cols. (1984) indicaron la necrosis tumoral como factor pronóstico, aunque concluyeron que su importancia es relativa comparada con los datos clínicos. Finalmente, Workman y cols. (1985) señalaron las alteraciones citogenéticas, el crecimiento tumoral rápido in vitro y la alta tasa de receptores adrenérgicos como signos desfavorables.

Los criterios histológicos de esta neoplásia están bien definidos y en general son aceptados por todos los autores. Así, en 1982, Llombart Bosch y cols., definieron las bases para diagnóstico del sarcoma de Ewing, como constituido por células redondas con núcleo redondeado y pálido, dispuestas en cordones o estructuras rosetoides con ausencia o escasez de fibras reticulares con un variado número de vasos y evidencia de necrosis.

En cuanto a los patrones morfológicos de crecimiento, Kissane y cols. (1983), describieron el patrón difuso, el lobular y el filigrée (damero), este último como compuesto por cordones bicelulares rodeados por un estroma fibrovascular denso. Por su parte Llombart Bosch y col. (1986), clasificaron los patrones arquitecturales en: cohesivo (difuso), disociado (células separadas por tractos fibrosos o vasos), en damero, con pseudorosetas y reticular.

Un hecho importante y básico durante muchos años para el diagnóstico histológico fué la descripción de Schajowicz (1959), señalando el masivo contenido de glucógeno de las células tumorales del sarcoma de Ewing, demostrable histoquímicamente por la técnica de PAS, y PAS diastasa. Únicamente la presencia de glucógeno, en unas células tumorales inmaduras procedentes de una neoplásia ósea en un paciente joven, ha servido durante mucho tiempo como firme criterio diagnóstico de sarcoma de Ewing. En su trabajo, Schajowicz (1959), destacaba la importancia de este hallazgo y su criterio diferencial con el reticulosarcoma óseo, neuroblastoma u osteosarcoma. En base a esta PAS positividad, muchos laboratorios utilizan la técnica de improntas citológicas óseas como una de las bases de diagnóstico (Yunis 1986), sin embargo la presencia de glucógeno no se produce en todos los casos de sarcoma de Ewing, como demostraron Kissane y cols. (1981) en un estudio en el que encontraron un 37% de casos negativos al PAS.

Con la utilización del M.E., se consiguió un gran avance en el conocimiento de este tipo de tumor. Fueron Friedman y

Gold (1968), los primeros en proporcionar una descripción detallada de la ultraestructura tumoral, confirmando inicialmente el carácter indiferenciado y blastematoso de las células tumorales.

Una de las primeras observaciones que el ME objetivó, fué la existencia de dos poblaciones celulares: una, la más numerosa, constituida por células inmaduras (célula principal) con un núcleo redondo, con cromatina fina dispersa y nucleolo no prominente, un citoplasma pobre en orgánulos, con aisladas mitocondrias, vesículas lipídicas, numerosos ribosomas libres, aislados complejos de Golgi y abundante glucógeno en situación perinuclear. Estas células principales presentaban una membrana plasmática desarrollada y era posible ver uniones estrechas y estructuras tipo desmosoma. La otra población celular, estaba constituida por las llamadas células oscuras o secundarias, que presentaban núcleo pequeño, con cromatina condensada e irregularidades en su membrana y un citoplasma pobre en orgánulos, con mitocondrias vacuoladas, ribosomas, vacuolas lipídicas, lisosomas primarios y glucógeno. La importancia de este tipo celular no llegó a trascender y fué catalogado por la mayoría de autores como una forma degenerativa de la célula principal (Povysil y Matejovsky 1977, Llombart Jr. y cols. 1970, Llombart Bosch y cols. 1978, Mahoney y Alexander 1978).

Otros signos ultraestructurales descritos en las células principales del clásico sarcoma de Ewing son la presencia ocasional de microtúbulos (Mahoney y Alexander 1978, Takahasi y cols. 1976), filamentos intermedios (Navas Palacios y cols.

1984), incluso imágenes características de otros tumores de células redondas como el neuroblastoma. Así, Schmidt y cols. (1982), describieron 4 casos de sarcoma de Ewing que presentaban gránulos densos de tipo neurosecretor, procesos similares a los dendríticos y microtúbulos; estas imágenes han sido también corroboradas por Perez Atayde y cols. (1985).

En 1975, Van der Heul, describió la existencia de casos de sarcoma de Ewing con aparición de otro tipo celular más abigarrado y lo denominó Ewing atípico. Esta inicial impresión es pronto aceptada y en 1978, Llombart Bosch y cols. realizaron una descripción detallada tanto óptica como ultraestructural de 28 casos de sarcoma de Ewing típico y atípico, y así, microscópicamente, el núcleo del Ewing atípico era más irregular, mostrando pliegues de la membrana, con la cromatina más condensada, el nucleolo más prominente. El citoplasma poseía más cantidad de glucógeno y presentaba inclusiones lipídicas. Además, la arquitectura tumoral se caracterizaba por una trama reticulínica acusada. Ultraestructuralmente, la célula principal del Ewing atípico presentaba un núcleo más irregular y un citoplasma más rico en orgánulos, tipo mitocondrias, RER, ribosomas. Una peculiaridad de estas células es la presencia de numerosos filamentos citoplásmicos de 80-100 Å y depósitos lipóideos. La cantidad de glucógeno era siempre menor a la observada en el Ewing típico.

También Llombart Bosch y Peydró Olaya, en 1983, confirmaron su previo análisis ultraestructural, añadiendo un

estudio con microscopía electrónica de barrido, demostrando la presencia de microvellosidades superficiales y estrechos contactos celulares, existiendo sólo escasas diferencias entre las células del Ewing típico y el Ewing atípico (estas últimas revelaban una gran variabilidad de tamaño y forma).

En 1980, Nascimento y cols., describieron las características clinico-patológicas del Ewing atípico o de células grandes, insistiendo en su necesario diagnóstico diferencial con el linfoma de células grandes y el osteosarcoma microcelular. Las imágenes morfológicas coinciden con las descritas por Llombart Bosch y cols. (1978) y Navas Palacios y cols. (1984). Destaca la alta incidencia en la segunda década de la vida, su predominio en varones y señala cómo no tiene diferente pronóstico respecto al Ewing típico; aunque por su parte, Hartman y cols. (1986) en un reciente estudio, observaron que el patrón atípico del sarcoma de Ewing conlleva peor pronóstico que el Ewing típico.

Otra variedad del Ewing atípico distinta al de células grandes, fué descrita por Llombart Bosch y cols. en 1970, como sarcoma de Ewing del hueso con caracter endotelial y cuya morfología óptica se caracterizaba por una proliferación lobular de células principales y secundarias algunas de ellas configurando espacios vasculares. incompletos. Ultraestructuralmente, la célula principal de este tumor, en concreto la que tapizaba estos espacios vasculares, presentaba procesos citoplásmicos, interdigitaciones, uniones estrechas, cuerpos multivesiculares limitados por membrana y

conteniendo microtúbulos (cuerpos de Weibel-Palade) y numerosos filamentos citoplásmicos. Estas dos últimas características eran propias de célula endotelial.

En 1975, Angervall y Enzinger, describieron otra variedad de sarcoma de Ewing no relacionada con el hueso, sino con partes blandas y lo definieron como sarcoma de Ewing extraesquelético. En su amplio estudio clinico-patológico describen esta entidad con una localización más frecuente en el área paravertebral, aunque se han descrito casos hasta en la piel (Peters y cols. 1985), y una incidencia en cuanto a la edad alrededor de los 20 años de vida. La descripción histológica y ultraestructural es idéntica a la del sarcoma de Ewing del hueso. Estos autores ya recalcaron las dificultades diagnósticas con el neuroblastoma, linfoma, y neuroepitelioma periférico y el valor de la ME en este diagnóstico diferencial complejo, sobretodo con la variedad sólida del rhabdomiosarcoma embrionario. Así, Soule y cols. (1978), hicieron una revisión de 26 casos de sarcoma de Ewing extraesquelético encontrados en el estudio cooperativo del rhabdomiosarcoma (IRS intergrup, Rhabdomyosarcoma study).

Gillespie y cols. (1979), proporcionaron una perfecta descripción histológica y ultraestructural de 3 casos, indistinguibles por lo demás de su homólogo óseo y planteaban las mismas dudas diagnósticas.

Dickman y Triche (1986), compararon los sarcomas de Ewing extraesqueléticos y los rhabdomiosarcomas embrionarios proponiendo la búsqueda de criterios sólidos diferenciales ultraestructurales, presentes sólo en los tumores musculares

como son las bandas Z, filamentos de miosina, colágeno fagocitado, matriz colágena y membrana basal.

Por su parte Kinsella y cols (1983), realizaron un estudio clínico comparativo entre sarcoma de Ewing del hueso y Ewing extraesquelético, observando altas tasas de curación siguiendo protocolos terapéuticos de irradiación y poliquimioterapia.

Otra de las aportaciones técnicas a la Anatomía Patológica es la histoquímica convencional. A partir de la descripción de Schajowicz (1959) de la PAS positividad de las células del sarcoma de Ewing, esta técnica histoquímica es utilizada rutinariamente en todos los casos de diagnóstico. Hoy se ha comprobado que el contenido en glucógeno no es privativo del sarcoma de Ewing, y que rhabdomiosarcomas, neuroepiteliomas y más aún neuroblastomas (Triche y Ross 1978, Yunis y cols. 1979) pueden presentar glucógeno citoplásmico en mayor o menor grado.

En cuanto a los resultados y especificidad de las técnicas histoquímicas en el sarcoma de Ewing son contradictorios. Así, Navas Palacios y cols. (1984) describieron la PAS positividad del sarcoma de Ewing y sin embargo encontraron negatividad respecto a las fosfatasa alcalinas. Povysil y Matejovsky (1977), sin embargo, refirieron que las células del sarcoma de Ewing son positivas a las fosfatasa alcalinas a nivel de su membrana. Llombart Bosch y cols. (1982) destacaron la negatividad del sarcoma de Ewing respecto a la  $\alpha$  naftil esterasa y fosfatasa ácidas, marcando estos resultados como signos diferenciadores frente

al retículo endoplasmático. También Llobart Bosch y cols. (1980) describieron la positividad a las fosfatasas alcalinas, en su estudio del caso con caracter endotelial y en los sarcomas de Ewing convencionales.

La introducción de las técnicas inmunohistoquímicas en el campo de Anatomía Patológica también ha tenido su importancia en la mejor comprensión del sarcoma de Ewing, aunque en muchos de los casos, acompañan a hipótesis histogenéticas variadas y que complican aún más la situación. Uno de los primeros estudios inmunohistoquímicos es el realizado por Miettinen y cols. (1982), quienes observaron la constante expresión del filamento intermedio vimentina (característico de las células mesenquimales), en las células del sarcoma de Ewing, y destacaron asimismo la negatividad del tumor a marcadores endoteliales, tipo factor VIII o Ulex europeus (corroborado en 1984 por Navas Palacios y cols.), sin embargo en el mismo año Roessner y cols. habían descrito la positividad de células del sarcoma de Ewing al factor VIII defendiendo su origen endotelial. El mismo Roessner, describió posteriormente (1984), la coexpresión de queratina y vimentina por el tumor.

Harvey y cols. (1982), comunicaron la presencia de colágeno tipo I y Dickman y cols. (1982) demostraron la producción de colágenos tipo I, III y IV, abogando por un origen mesenquimal. Modesti y cols. (1985), también demostraron la producción de estos tipos de colágeno y de laminina y fibronectina. Todas estas experiencias fueron realizadas con cultivos celulares de diversas líneas de

sarcoma de Ewing establecidas "in vitro".

También han sido descritos casos de sarcoma de Ewing, positivos a marcadores neurales tipo NSE (Mierau 1985, Yunis 1986, Kawaguchi y Koike 1986), HNK-1 (Lipinski y cols. 1984, 1986, 1987, Llombart Bosch y cols. 1986), neurofilamentos (Moll y cols. 1987 en prensa), HLA-ABC y  $\beta_2$  microglobulina (Donner y cols. 1985).

Resumiendo estos aspectos, merece señalarse como todavía secundaria la importancia diagnóstica de la inmunocitoquímica comparada con el valor de la ME en el diagnóstico diferencial de los sarcomas de células redondas (Mierau 1985, Triche 1986).

Respecto al valor del cultivo de tejidos en el conocimiento de esta neoplasia, ya fué resaltado por Kadin y Bensch en 1971, pero es actualmente en la década de los 80 cuando está adquiriendo una decisiva importancia en el esclarecimiento de la histogénesis del sarcoma de Ewing.

En 1982, Berthold y cols. resaltaban la importancia morfológica diagnóstica del cultivo, refiriéndose a un complicado caso de diagnóstico diferencial con un neuroblastoma primitivo, siendo la presencia de neuritas en cultivo lo que marcó el diagnóstico. Maletz y cols. (1986), recalcaron asimismo la importancia diagnóstica del cultivo de tejidos y Workman y cols. (1985), definieron la agresividad in vitro como factor de mal pronóstico. También a partir de cultivos, Mc Keon y cols. (1986), encontraron en el sarcoma de Ewing altos niveles de colina acetil transferasa, enzima que interviene en la síntesis de acetilcolina, afirmando el

caracter colinérgico de la neoplásia y su origen neuroectodérmico.

Otro de los sistemas que han influido en el desarrollo de la Anatomía Patológica ha sido la citogenética tumoral. En el caso del sarcoma de Ewing ha sido descrita (Turc-Çarel y cols. 1984, Aurias y cols. 1984, Whang-Peng y cols. 1986) una anomalía cromosómica específica: la translocación (11:22)(q24;q12), considerada actualmente como auténtico marcador del sarcoma de Ewing (aunque se ha detectado asimismo en el neuroepitelioma periférico, Whang-Peng y cols. 1986).

Pese a todos los avances descritos y la aplicación de nuevas técnicas al diagnóstico histopatológico, la histogénesis del sarcoma de Ewing continua todavía mal aclarada y en vía de discusión. Seguidamente señalamos las más importantes teorías histogenéticas aceptadas en la actualidad:

\* Teoría vascular: defendida por J. Ewing (1921) en su primera descripción del tumor y apoyada por Takahashi y cols. (1976), en base a estudios ultraestructurales, refiriendo a la célula del sarcoma de Ewing como derivado transicional desde pericito hasta célula musculo-vascular de la médula ósea. También esta teoría fué defendida por Povysil y Matejovsky (1977), en base a estudios ultraestructurales y histoquímicos. Esta posibilidad sería válida para algunas variantes atípicas del sarcoma de Ewing, como demostró con ME, Llombart Bosch y cols. (1980). También, Roessner y cols.

(1982), abogaron por un origen endotelial de la neoplasia sustentandose en los hallazgos por inmunofluorescencia de depósitos intercelulares de colágeno tipo IV y presencia de células tumorales positivas al factor VIII.

\* Teoría reticular: apoyada por Friedman y Hanaoka (1971), sugiriendo la derivación de la célula de Ewing, de una célula reticular inmadura de la médula ósea en base a hallazgos ultraestructurales.

\* Teoría mieloide: defendida por Kadin y Bensch (1971), en estudios realizados en cultivo de tejidos.

\* Teoría mesenquimal: es quizá la teoría que más apoyo ha suscitado. Está sustentada por Llombart Bosch y cols. (1970,1972,1974,1978,1980,1982,1983,1986), en base a estudios inmunohistoquímicos, ópticos y ultraestructurales, definiendo el origen del sarcoma de Ewing a partir de una célula mesenquimal inmadura multipotencial con capacidad evolutiva de diferenciación fibroblástica, histiocítica o angioblástica.

Esta teoría ha sido apoyada también por Miettinen y cols. (1982) con la demostración inmunohistoquímica de filamentos de vimentina; Harvey y cols. (1982) y Dickman y cols. (1982) con la demostración de la producción de colágeno tipo I,III,IV.

\* Teoría neural o neuroectodérmica: aparece sustentada por los estudios de Mierau (1985), Kawaguchi y Koike (1986), Yunis (1986) demostrando NSE en las células del sarcoma de Ewing; por Lipinski y cols. (1984,1985,1987), con la demostración de HNK-1, marcador neuroectodérmico en dichas células; por Perez Atayde y cols. (1985), con su estudio ultraestructural de la presencia de gránulos neurosecretorios y filamentos intermedios; por Cavazzana y cols. (1985,1987), por sus estudios de inducción de la diferenciación neural en cultivos de sarcoma de Ewing; y por Mc Keon y cols. (1986) demostrando altas tasas de enzimas colinérgicos en líneas de sarcomas de Ewing. Recientemente Llobart y cols. (1986), han demostrado, también, carácter neural en un grupo de Ewing atípicos.

\* Teoría blastémica: recientemente propuesta por Moll y cols. (1987) en base a la demostración de queratina, vimentina, desmoplaquina, y neurofilamentos en las mismas células de sarcoma de Ewing y proponiendo así un origen de la neoplasia a partir de una célula blastémica primitiva que pudiera evolucionar hacia célula mesenquimal, epitelial o neural respectivamente.

#### 2.1.2.- NEUROEPITELIOMA PERIFERICO:

Si en el caso del sarcoma de Ewing, es controvertida la histogénesis, con numerosas teorías postuladas y con resultados contradictorios según los autores, en el caso del

neuroepitelioma periférico, existen auténticos problemas de definición y nomenclatura, si bien es reconocida su histogénesis y aceptada por la mayor parte de autores como un tumor derivado de la cresta neural (Abell y cols. 1970, Seemayer y cols. 1975).

La primera descripción de esta entidad, la realizó Stout en 1918, en el caso de un tumor de células redondas, formador de rosetas y que dependía del nervio cubital, aunque anteriormente en 1892, Garré había definido un tumor de naturaleza similar situado o dependiente de nervios periféricos de la zona del muslo.

En 1926, Bayley y Cushing, lo definieron como una neoplasia maligna de origen neuroectodérmico, a partir de las células espongioblásticas, aunque el definitivo término de neuroepitelioma periférico se debe a Penfield (1932).

A partir de entonces, esta entidad ha recibido numerosas denominaciones tales como neuroblastoma periférico (Bolen y Thorning 1980, Nesland y cols. 1985, Hashimoto y cols. 1983), tumor neuroectodérmico periférico (Seemayer y cols. 1975, Dehner 1986, Schmidt y cols. 1985), tumor neuroectodérmico primitivo (Nesland y cols. 1985, Jaffé y cols. 1984), neuroblastoma adulto (Mackay y cols. 1976), o neurocristoma (Dehner 1986).

En general, los autores definen esta neoplasia como un tumor primitivo, constituido por células redondas, de localización periférica, que aparece a cualquier edad (Enzinger y Weiss 1983), aunque más frecuentemente en la segunda década de la vida (Hashimoto y cols. 1983), que no

siempre es posible demostrar su dependencia de un nervio, y que a diferencia del neuroblastoma no existe afectación suprarrenal o ganglionar simpática, no acompañándose tampoco, por lo general, de niveles elevados de catecolaminas o de sus metabolitos y además poseyendo un curso agresivo, puede producir metástasis pulmonares y hepáticas (Dehner 1986).

Respecto a su localización, los lugares más frecuentes de afectación son el tronco y las extremidades inferiores (Hashimoto y cols. 1983). Su frecuencia es relativamente baja, así Hadju (1979), describió 31 casos de neuroepitelioma preiférico en una revisión de 2.489 sarcomas de partes blandas (1'1%).

Morfológicamente y a nivel de microscopía óptica, es un tumor que generalmente crece adoptando un patrón lobular (Jaffé y cols. 1984), constituido por células redondas de pequeño tamaño, núcleo hipercromico con nucleolo evidente y escaso citoplasma. El índice mitótico suele ser elevado.

Con la técnica del PAS, se demuestra glucógeno intracelular (Schmidt y cols. 1985) en la mayoría de los casos, aunque Jaffé y cols. (1984) encontraron una positividad al PAS inferior al 1% de la población celular.

Un criterio histológico fijo en todas las descripciones, es la presencia más o menos abundante de rosetas tipo Homer-Wright (Jaffé y cols. 1984, Hashimoto y cols 1983, Schmidt y cols. 1985, Seemayer y cols. 1975, Bolen y Thorning 1980, Nesland y cols. 1985), constituidas por agrupaciones concéntricas de células con un material fibrilar central.

A nivel ultraestructural, los criterios también estan

más o menos definidos por la mayoría de autores: se trata de tumores, cuyas células presentan un núcleo ovoide o elongado con cromatina grumosa, y nucleolo prominente. El citoplasma presenta mayor cantidad de orgánulos que el sarcoma de Ewing, con ribosomas, mitocondrias, y RER.

Mackay y cols. (1976), fueron los primeros en describir la presencia de gránulos densos rodeados de membrana, de 50-200 nm, típicamente de carácter neurosecretor. Actualmente casi todos los autores coinciden con su presencia en mayor o menor medida (Jaffé y cols. 1984, Schmidt y cols. 1985, Dehner 1986, Voss y cols. 1984).

Otra característica ultraestructural descrita, es la existencia de microtúbulos, filamentos intermedios, glucógeno en cantidad relativa y proyecciones de carácter dendrítico. Todas estas características son similares a los primarios signos ultraestructurales del neuroblastoma, aunque en el caso del neuroepitelioma periférico son mucho menos prominentes (Jaffé y cols. 1984). También se han visto ultraestructuralmente fragmentos de lámina basal (Nesland y cols. 1985).

Inmunohistoquímicamente, estos tumores, reaccionan con marcada positividad frente a la Enolasa neuronal específica (Jaffé y cols. 1984, Hashimoto y cols. 1983, Nesland y cols. 1985) y a otro marcador neural como la proteína S-100 (Hashimoto y cols. 1983). En un reciente estudio (Cavazzana y cols. 1987), nosotros mismos hemos comprobado tales resultados, a los que añadimos la expresión de filamentos intermedios tipo vimentina y ocasionalmente queratina, la

presencia de  $\beta_2$  microglobulina (constantemente negativo en neuroblastoma), y la reactividad en un 20% de los casos frente a HNK-1, marcador neuroectodérmico (Lipinski y cols. 1984, 1986, 1987, Llombart Bosch y cols. 1986).

Además, Donner y cols. (1985), en un estudio con anticuerpos monoclonales, compararon el sarcoma de Ewing y el neuroepitelioma que reaccionan positivamente al HLA-ABC y  $\beta_2$  microglobulina, hecho que los diferencia del clásico neuroblastoma negativo frente a estos marcadores.

Respecto a la utilización del cultivo de tejidos en estos tumores, ya Stout y Murray (1942) ponían especial énfasis, al considerar que el verdadero origen neuroepitelial podía establecerse in vitro, con el crecimiento celular y la aparición de proyecciones de carácter neurítico. Sin embargo, Jaffé y cols. (1984) llegaron a cultivar con éxito 3 de los 4 tumores que estudiaron, y en su análisis no señalan el crecimiento espontáneo de neuritas, apareciendo las mismas, sólo cuando utilizaron medio desprovisto de suero. Asimismo, observaron una clara positividad de las células tumorales a la Enolasa neuronal específica, pero tanto la fluorescencia de catecolaminas como el intento de maduración y diferenciación con dibutiril AMP ciclico dieron resultados negativos.

También, a partir de cultivos de tejido, se han efectuado técnicas bioquímicas de determinación enzimática. Así, Mc Keon y cols. (1986), demostraron altos niveles de colina acetil transferasa (enzima que interviene en la síntesis de acetil colina), sugiriendo así la naturaleza

colinérgica de la neoplasia y su adscripción a los tumores del sistema nervioso parasimpático. Esto difiere del análisis efectuado en neuroblastomas, caracterizados por altos niveles de enzimas importantes en la síntesis de catecolaminas y por niveles normales de colina acetil transferasa. En el mismo trabajo, Mc Keon y cols., describieron altos niveles de dicha enzima en las líneas de sarcoma de Ewing, equiparando a dicho tumor con el neuroepitelioma y afirmando su origen neuroectodérmico.

Por otra parte, también se han efectuado estudios citogenéticos en el neuroepitelioma periférico. Así, Whang-Peng y cols. (1984), demostraron en dos casos la presencia de un marcador común, como es la  $t(11;22)(q24;q12)$ , también comunicada por la misma autora y además por Turc-Carel y cols. (1984) y Aurias y cols. (1984) en sarcomas de Ewing.

Finalmente, queremos efectuar algunos comentarios dentro de este mismo apartado de neuroepiteliomas referido al llamado tumor maligno de células pequeñas de la infancia de la región toracopulmonar, también denominado tumor de Askin, porque fué dicho autor quien lo describió en 1979, en un estudio de 20 casos, en donde encuentra una edad media de afectación a los 14 años (Lieberman 1981, describe también esta neoplasia en adultos), y un predominio en sexo femenino (75%).

El patrón histológico de esta neoplasia es totalmente indistinguible del neuroepitelioma periférico, células redondas, creciendo con un patrón lobular y formando rosetas imperfectas. También la ultraestructura es similar, con

gránulos de neurosecreción, procesos citoplásmicos y microtúbulos.

Askin propuso un origen neuroectodérmico de la neoplasia y señaló un diagnóstico diferencial frente al sarcoma de Ewing y al clásico neuroblastoma. Este origen neural es también aceptado por Gonzalez Crussi y cols. (1984), quienes describieron los mismos patrones ultraestructurales e histológicos.

También, Linnoila y cols. (1986), han realizado un estudio detallado de 15 casos, demostrando la presencia de Enolasa neural específica y concluyendo que es una variante de neuroepitelioma periférico, opinión que actualmente es aceptada por buen número de autores (Triche y cols. 1986, Yunis 1986).

### 2.1.3.- NEUROBLASTOMA:

El neuroblastoma, si excluimos los tumores del SNC, es el más común de los tumores sólidos de la infancia y constituye el prototipo, en sus formas más indiferenciadas de tumor de células pequeñas redondas (Triche y Askin 1983).

La mayor parte de neuroblastomas, son diagnosticados antes de los 5 años de vida y la mitad aproximadamente en niños menores de 2 años. En cuanto al sexo, la incidencia es ligeramente superior en varones.

La localización más frecuente es a nivel abdominal, con tumores iniciados en la médula suprarrenal (40% de los casos), ganglios simpáticos paraespinales (25%). En un 15% de

los casos, puede existir localización mediastínica y en un 5% y un 3% de los casos, se diagnostican a nivel pélvico o ganglionar cervical (Seeger y cols. 1982).

Peculiarmente los neuroblastomas son tumores de crecimiento rápido con diseminación y metástasis en la cortical de los huesos largos, así como en los ganglios linfáticos regionales, hígado, médula ósea y tejido celular subcutáneo (Fernbach y cols. 1977).

Clinicamente, para el diagnóstico del neuroblastoma, es fundamental el estadiaje de la neoplasia. Para ello se utiliza el protocolo de Evans y cols. (1976) que consideran estadios I y II a los tumores localizados, III a la extensión regional y IV a la diseminación metastática. Existe un estadio especial, IV-S que supone el diagnóstico de un neuroblastoma, en un niño menor de un año de edad, con enfermedad metastática en piel, hígado o médula ósea pero sin evidencia radiológica de afectación ósea. Este estadiaje es fundamental para la terapéutica y es el principal factor pronóstico (Kajanti y Holsti 1986).

También la edad es un factor pronóstico, siendo favorables aquellos casos diagnosticados antes del primer año de vida (Triche y Askin 1983).

Otro de los parámetros clínicos importantes en el estudio de los neuroblastomas, es el ser neoplasias con capacidad de producir y segregar catecolaminas. Fueron Mason y cols. en 1957, quienes primero demostraron la secreción de adrenalina por el neuroblastoma. Desde entonces se ha convertido en una práctica rutinaria la detección de

catecolaminas o sus metabolitos tanto en orina como en suero, siendo importante factor tanto diagnóstico como pronóstico (Romansky y cols. 1978). Sin embargo, muchos de los casos de neuroblastoma indiferenciado no se acompañan de determinaciones sericas o urinarias elevadas de catabolitos de catecolaminas y son estos casos los que plantean más serios problemas de diagnóstico diferencial dentro del campo de los tumores de células redondas (Triche y Askin 1983). También, una de las características más sobresalientes del neuroblastoma, es la capacidad de madurar diferenciandose o incluso involucionar espontáneamente o bajo terapia (Jaffe 1976).

El neuroblastoma, fué inicialmente descrito como entidad anatomoclínica por Wright en 1910 y su origen como derivado de la cresta neural es aceptado por la mayor parte de autores (Seemayer y cols. 1975). Es un tumor que está compuesto por precursores de células ganglionares en diversos estadios madurativos, de modo que existen formas muy inmaduras con apenas signos de diferenciación neural, dificiles de distinguir de los demás tumores de células redondas y formas más maduras con aparición de células ganglionares en mayor o menor medida tipificando las entidades conocidas como ganglioneuroblastoma y ganglioneuroma (Triche y Askin 1983).

Histológicamente, es un tumor cuyas células se disponen en cordones separados por tractos fibrovasculares con frecuentes áreas de necrosis y hemorragia. Son células redondas de pequeño tamaño, nucleo redondeado hiperocrómico con escaso número de mitosis. Dos signos histológicos

típicos, son la formación de rosetas, constituidas por agrupaciones concentricas de células, polarizadas hacia un área central, rica en material fibrilar, así como la presencia de dicho material fibrilar a nivel intercelular.

La primera descripción de la ultraestructura del neuroblastoma, se debió a Misugi y cols. (1967), quienes ya proporcionaban una serie de criterios y signos diagnósticos. Con ME, se observó como se trata de células que presentan un núcleo muy regular, con cromatina ordenadamente distribuida y un nucleolo prominente. El citoplasma contiene RER y numerosos polirribosomas. El signo más característico, es la presencia a nivel citoplásmico de gránulos densos de 50-200 nm, rodeados de membrana (gránulo neurosecretor), visto tanto en los neuroblastomas, como también en otros tumores neurales (Triche y Askin 1983, Romansky y cols. 1978). Dichos gránulos neurosecretores, aparecen localizados periféricamente, sobre todo en prolongaciones de las células que semejan a primitivos procesos neurales. Estos gránulos se distinguen de los lisosomas, los cuales tienen una ubicación más central, siendo vecinos al aparato de Golgi y más pleomórficos en cuanto a tamaño y a forma.

Otro signo típico, que conlleva cierto grado de diferenciación, es la presencia de nidos epiteliales con células, con procesos de tipo neural en su centro. También es destacable la marcada irregularidad de la superficie celular, con una aposición de las membranas entre las células vecinas, no dejando apenas material extracelular visible.

También se diferencian uniones intercelulares

irregulares, asimétricas y que semejan los contactos sinápticos entre las células neurales (Luse 1964).

Otra característica, es la presencia de glucógeno citoplasmático en muchos de los casos de neuroblastoma (Triche y Ross 1978, Yunis y cols. 1979), factor importante y que demuestra la poca validez de su presencia para realizar el diagnóstico diferencial con otros tumores de células redondas como por ejemplo el sarcoma de Ewing.

En el estudio inmunohistoquímico del neuroblastoma, destaca la presencia del marcador neural conocido como el isoenzima gamma-gamma del enzima glucolítico enolasa, en las células de dicho tumor (Herschman y cols. 1973). Este estudio que se realizó in vitro, sirvió de base para la demostración de la Enolasa neural específica a nivel de secciones histológicas. También, Tsokos y cols. (1984) y Jaffe y Yunis (1983) demostraron positividad a la Enolasa neuronal específica (NSE) en todos los casos de neuroblastomas estudiados y compararon estos resultados con la ausencia de dicho marcador en otros tumores de células redondas, por lo que la determinación de NSE puede ser, según dichos autores, esencial en el diagnóstico diferencial de este grupo de neoplasias.

Por otra parte, Osborn y cols. (1986), demostraron positividad a la NSE no solo en neuroblastomas sino también en dos rhabdomyosarcomas, cuestionando así, la validez del uso de la NSE como marcador diferencial de los tumores de células redondas. Nosotros mismos (Llombart Bosch y cols. 1986, Cavazzana y cols. 1987), hemos descrito la presencia de NSE

también en neuroepitelioma periférico e incluso en muchos casos de sarcoma de Ewing.

Osborn y cols. (1986), también concedieron especial importancia a la demostración inmunohistoquímica de la triplete de neurofilamentos usando anticuerpos monoclonales, demostrando la reactividad del neuroblastoma a dichos anticuerpos, pero sólo utilizando secciones por congelación y no material fijado con alcohol-formol e incluido en parafina.

Donner y cols. (1985), han utilizado un extenso panel de anticuerpos monoclonales, estableciendo el diferente patrón de reactividad del neuroblastoma frente al neuroepitelioma periférico, sarcoma de Ewing y rhabdomyosarcoma. Así, demostraron la positividad del neuroblastoma al HSAN 1,2, mientras el resto de tumores de células redondas expresaban HLA-ABC y  $\beta_2$  microglobulina, no presentes en el neuroblastoma.

Otra técnica utilizada en el diagnóstico del neuroblastoma, es la auto-fluorescencia presente en las células productoras de catecolaminas cuando son expuestas a vapores de formaldehído (Falck y cols. 1962). Debido a sus dificultades técnicas, otro método más reciente ha sido utilizado para demostrar dicha fluorescencia, con el ácido glioxílico (Lindvall y cols. 1973). El valor de este método, se basa en aprovechar este fenómeno, que no se da en otros tumores de células redondas, siendo muy útil en el diagnóstico diferencial (Reynolds y cols. 1981, Triche y Askin 1983).

El método de cultivo de tejidos es también de gran

importancia para la tipificación del neuroblastoma. Murray y Stout (1947) fueron ya los primeros en describir las características de las células del neuroblastoma cultivadas in vitro, demostrando la aparición de neuritas y confirmando el carácter neural de la neoplasia. También Reynolds (1981), ha descrito recientemente, este signo como típico de los neuroblastomas, no presente en otras neoplasias de células redondas. Desafortunadamente, este signo no aparece en todos los neuroblastomas cultivados in vitro (Triche y Askin 1983).

También Triche y Askin (1983), concedieron cierto valor a la disposición de las células del tumor en acúmulos de aspecto epitelioido, fenómeno que no está presente en los demás tumores que configuran el espectro de sarcomas de células redondas.

A partir de cultivos, se ha realizado también, determinaciones bioquímicas, como la demostración de enzimas típicamente adrenérgicas (tirosin hidroxilasa), como demostraron Mc Keon y cols. (1986) en comparación con los altos valores de enzimas colinérgicos detectados en el neuroepitelioma periférico y el sarcoma de Ewing (Triche y cols. 1986).

Finalmente, refiriendonos a los estudios citogenéticos, también el neuroblastoma posee marcadores característicos, siendo universal la alteración del cromosoma 1, con una fórmula del(1)(p32p36), como constataron Gilbert (1984) y Sandberg y Turc-Carel (1987). También se han descrito HRS en el cromosoma 1 y dobles minutos extracromosómicos (Triche y cols. 1986). Estas alteraciones cromosómicas, contrastan con

la traslocación (11;22) comunicada en el sarcoma de Ewing (Turc-Carel y cols. 1984, Aurias y cols. 1984, Whang-Peng y cols. 1986) y en el neuroepitelioma periférico (Whang-Peng y cols. 1984), poseyendo por tanto valor en su diagnóstico diferencial.

#### 2.1.4.- RABDOMIOSARCOMA:

La primera descripción de esta neoplásia como entidad propia fué en 1946. En dicho año, Stout, recogió 14 casos de rabdomiosarcoma y los definió con criterios histológicos evidentes. Dicho autor observó únicamente esta neoplásia en adultos, configurando el llamado rabdomiosarcoma pleomórfico.

Stobbe y Dargeon, en 1950 describieron el rabdomiosarcoma en niños y adolescentes y fué el primer reporte de rabdomiosarcoma embrionario.

Por su parte, Riopelle y Theriault describieron en 1956, la variedad alveolar del rabdomiosarcoma, como entidad de características propias, siendo además la de peor pronóstico clínico (Gonzalez Crussi y Black-Schaffer 1979, Shimada y cols. 1987). El primer caso comunicado en España de esta variante tumoral fué efectuada por Llombart Bosch en 1962.

Son tres tipos básicos de rabdomiosarcomas los aún reconocidos hoy (Triche y cols. 1986). La variedad más frecuente, es la conocida como rabdomiosarcoma embrionario (Maurer y cols. 1978).

Actualmente el "Rhabdomyosarcoma Intergroup Study", reconoce otra variedad de rabdomiosarcoma indeferenciado tipo

I o de células pequeñas, o tipo II de células grandes (Maurer y cols. 1978).

La histología del rabdomiosarcoma embrionario, se caracteriza por ser un tumor de células primitivas, con aisladas células mostrando diferenciación mioblástica con estriación transversal.

La ultraestructura de estos tumores es también un reflejo de la morfología óptica, predominando células fusiformes sin signos mioblásticos con RER abundante, junto con aislados mioblastos con ocasionales imágenes de estriación en filamentos de actina y miosina (Triche y cols. 1986).

El rabdomiosarcoma alveolar, recibió esta denominación por Riopelle y Theriault (1956), debido a la imagen histológica constituida por células grandes tapizando septos fibrosos, configurando una imagen similar al del alveolo pulmonar. Se describieron células gigantes multinucleadas y células mononucleares de citoplasma acidófilo debido a su contenido en miofilamentos.

La imagen ultraestructural más sobresaliente es la demostración de estas estriaciones filamentosas en el citoplasma celular (Triche y cols. 1986).

El rabdomiosarcoma pleomórfico, es muy poco frecuente en niños, tal como lo describió Stout (1946), y se caracteriza histológica y ultraestructuralmente por largas células expresando miofilamentos en su citoplasma.

La variedad indiferenciada (Maurer y cols. 1978) constituye aproximadamente una cuarta parte de los

rabdomiosarcomas (Gonzalez Crussi y Black-Schaffer 1979). Se describieron el tipo I, de células grandes, muy parecido al rabdomiosarcoma embrionario pero cuyas células demuestran ausencia de diferenciación mioblástica (Triche y cols. 1986). El otro grupo (tipo II), estaría compuesto por células pequeñas, redondas, planteandose un serio problema de diagnóstico diferencial con el sarcoma de Ewing del hueso (Triche y cols. 1986). La diferencia más sustancial con el sarcoma de Ewing, es la presencia de fibras de colágeno intracitoplásmicas, muy poco apreciables en el sarcoma de Ewing (Triche y cols. 1986). Este mismo autor, propuso que esta tumoración correspondía a las áreas sólidas de un rabdomiosarcoma alveolar.

El diagnóstico de rabdomiosarcoma se basa pues, en la morfología óptica (presencia de estriaciones), y en la ultraestructura (bandas Z, filamentos de actina y miosina).

Distintas tinciones histoquímicas han sido empleadas también para demostrar la presencia de filamentos, como el PTAH, la demostración de ATPasa o la presencia de actividad de la nicotinamida-adenina-dinucleotido-tetrazolio reductasa, aunque bastante inespecíficas y de relativo valor (Triche y cols. 1986).

La aportación de la inmunohistoquímica al diagnóstico del rabdomiosarcoma ha sido fundamental, sobretodo en los casos en que la morfología óptica y ultraestructural no consigue demostrar la diferenciación muscular de la neoplásia.

Así, Tsokos y cols. (1983,1986), destacaron el valor de

la demostración de desmina, mioglobina, CKMM y CKBB en las células tumorales, y su importancia en el diagnóstico diferencial con los sarcomas de células redondas. De la misma opinión son Eusebi y cols. (1986) y Ceccarelli y cols. (1986), poniendo énfasis en la demostración de la cadena pesada de miosina fetal, incluso en aquellos rhabdomiosarcomas de nula diferenciación mioblástica.

También el cultivo de tejidos a corto término tiene cierto valor diagnóstico en el caso del rhabdomiosarcoma como demostraron Cavazzana y cols. (1987) con la presencia de un caso problemático de diagnóstico, que con la ultraestructura original no presentaba ningún signo de diferenciación y que sin embargo in vitro demostró la presencia de células gigantes con clásicas bandas Z.

Respecto a la importancia de la citogenética, ha sido descrito un marcador en los rhabdomiosarcomas consistente en la traslocación (2;13)(q37;q14), presente en la variedad alveolar (Sandberg y Turc-Carel 1987). También nosotros hemos observado un marcador común en 5 líneas de rhabdomiosarcomas analizadas, presente siempre en el cromosoma 1 (Cavazzana y cols 1987).

#### 2.1.5.- OSTEOSARCOMA MICROCELULAR:

En 1979, Sim y cols, describieron el osteosarcoma microcelular, como una entidad anatomoclínica propia y considerada como una variedad poco frecuente del sarcoma osteogénico. Dichos autores, realizaron un estudio sobre

1.000 casos de sarcoma osteogénico y encontraron 24 casos de tumor óseo que presentaban tanto clínica como morfológicamente patrones similares al sarcoma de Ewing. Es por tanto bastante baja su incidencia.

En su descripción de los casos, Sim, reveló no existir diferencias en cuanto a sexos; la edad media de aparición era de 28 años y la localización más frecuente, la metáfisis femoral.

Las características histológicas de la tumoración consistían en islotes de células redondas pequeñas, separadas por tejido fibroso denso. El núcleo era redondeado u oval, con cromatina dispersa y nucleolo poco evidente. El citoplasma escaso y sus bordes mal definidos. El índice mitótico era poco elevado y la necrosis infrecuente. Existía abundante vascularización reactiva. Esta descripción histológica es similar a la del sarcoma de Ewing. La diferencia morfológica más importante en cuanto a diagnóstico diferencial es la presencia de osteoide neoplásico (Sim y cols. 1979, Triche y cols. 1986) y en ocasiones de material condral (Martin y cols. 1982).

En cuanto al valor histoquímico de la detección de glucógeno, Sim y cols. (1979) no encontraron PAS positividad en ninguno de sus casos, sin embargo, Martin y cols. (1982) sí demostraron algunos casos PAS positivos.

El estudio ultraestructural de esta neoplásia, revela dos signos claramente diferenciales con el sarcoma de Ewing, que son la presencia de abundantes cisternas paralelas de RER en el citoplasma celular y asimismo la evidencia de grandes

acúmulos de material intracelular constituidos por matriz colágena (Triche y cols. 1986).

Inmunohistoquímicamente, se ha señalado reactividad antigénica frente a la vimentina y HLA-DR y algunos casos frente al monoclonal Leu M<sub>2</sub>, características de la serie macrofágica (Löning y cols. 1985). Dichos resultados fueron similares a los obtenidos con sarcoma de Ewing por los mismos autores.

El pronóstico de estos tumores, es peor que el de los osteosarcomas clásicos y el tratamiento debe ser quirúrgico con asociación quimioterápica (Sim y cols. 1979).

## 2.2.- ESTUDIO DEL CITOESQUELETO Y FILAMENTOS INTERMEDIOS.

Se denomina filamentos intermedios, a un grupo de proteínas que configuran el citoesqueleto de los animales vertebrados (Lazarides 1980). Su definición como elementos intermedios, se debe a su tamaño (8-10 nm), situado entre el de los microtúbulos (25 nm) y el de los microfilamentos (≤7 nm) (Steinert 1984).

Las proteínas que comprenden los así llamados filamentos intermedios varían entre 40.000 a 200.000 daltons de peso molecular. Su función biológica primordial es estabilizar la morfología tridimensional de las células de cualquier tejido.

Han sido definidos cinco tipos de filamentos intermedios (Lazarides 1980): queratina, vimentina, desmina, neurofilamentos y gliofilamentos.

### 2.2.1.- QUERATINA:

La queratina, es el filamento característico de las células epiteliales. Se han descrito 19 diferentes subunidades en tejidos epiteliales humanos, cuyos pesos moleculares oscilan entre 40.000 y 70.000. Las subunidades que componen la familia de la queratina pueden ser ácidas o básicas. Los epitelios ductales expresan queratina ácida de 46 kD y básica de 56 kD; el epitelio basal de la epidérmis expresa queratina ácida de 46,50, y 52 kD y básica de 56 y 58 kD. Por su parte, las células epidérmicas de estratos más superficiales expresan una queratina ácida de 56'5 kD y una básica de 67 kD (Steinert 1984).

La obtención de anticuerpos monoclonales frente a estos distintos tipos de queratina y su aplicación al diagnóstico histopatológico mediante técnicas de inmunohistoquímica ha sido resaltado por numerosos autores (Gabbiani y cols. 1981, Debus y cols. 1982, Osborn y Weber 1983, Miettinen y cols. 1984, 1985, 1986). Así, dichos autores proponen la determinación de queratina, usando anticuerpos monoclonales, marcador de los tumores de naturaleza epitelial (carcinomas), independientemente de su grado de diferenciación. También ha sido descrita la utilidad diagnóstica de la determinación de queratina en tumores neuroendocrinos del tracto gastrointestinal (Miettinen y cols. 1985), en tumores de los plexos coroides (Miettinen y cols. 1986), en sarcomas sinoviales (Miettinen y cols. 1984) etc..

Existen pocos trabajos acerca de la presencia de queratina en sarcomas de células redondas, motivo de este estudio. Recientemente, Moll y cols. (1987), han demostrado la presencia de queratina en sarcoma de Ewing usando electroforesis bidimensional e inmunofluorescencia. También, Cavazzana y cols. (1987), han detectado inmunohistoquímicamente en material incluido en parafina, la ocasional presencia de células positivas a la queratina en aislados casos de sarcoma de Ewing y neuroepitelioma periférico.

#### 2.2.2.- VIMENTINA:

La vimentina, es un filamento intermedio tipificado por una proteína de 52.000 dalton de peso molecular, aislada por primera vez a partir de fibroblastos de pollo (Lazarides 1980). Característicamente, es el filamento intermedio típico de las células de origen mesenquimal, (endotelio, linfocitos, fibroblastos, condrocitos, células musculares, vasculares, etc.), (Osborn y cols. 1984). También ha sido descrita su presencia en células de Langerhans de la epidermis, melanocitos, células de Sertoli, células de la granulosa del ovario (Miettinen y cols. 1984). También se ha visto coexpresión de vimentina y desmina en células musculovasculares y coexpresión de vimentina con GFAP (proteína gliofibrilar ácida) en células ependimales y gliales.

La detección de vimentina por técnicas

inmunohistoquímicas y su aplicación al diagnóstico histopatológico, tiene importancia sobre todo en la tipificación de los tumores de origen mesenquimal (sarcomas) y linfomas (Osborn y Weber 1983, Gabbiani y cols. 1981).

En el grupo de los sarcomas de células redondas, la vimentina es un marcador de presencia constante en sarcomas de Ewing (Cavazzana y cols. 1987; Moll y cols. 1987, Osborn y Weber 1983, Llombart Bosch y cols. 1986, Miettinen y cols. 1982), rhabdomyosarcomas, coexpresado junto con desmina (Gabbiani y cols. 1981), neuroepitelioma periférico (Cavazzana y cols. 1987), linfomas (Osborn y Weber 1983), osteosarcoma microcelular (Löning y cols. 1985), etc., y por tanto, su valor como marcador en el diagnóstico diferencial es escaso.

### 2.2.3.- DESMINA:

La desmina, es el filamento intermedio característico de las células musculares lisas, estriadas, y cardíacas. Es una proteína ácida de 53 Kdalton, constituida por dos variedades isoeléctricas que difieren sólo en su grado de fosforilación (Steinert y cols. 1984). Su localización en la célula muscular es a nivel de la línea Z, con lo que su misión consistiría en la regulación y unión de las miofibrillas adyacentes a la línea Z, esencial para la contracción muscular (Steinert y cols. 1984).

Otras localizaciones más atípicas de la desmina han sido descritas por Miettinen y cols. 1984, quienes describieron su

presencia no sólo en células musculares, sino también en las células de Purkinje del cerebelo y en células mesangiales del glomérulo renal, así como su ausencia en algún tipo específico de célula muscular de los vasos, como la porción elástica de la aorta.

La aplicación de anticuerpos obtenidos frente a la desmina en el diagnóstico histopatológico tiene importancia, en el caso de tipificar tumores de naturaleza muscular tanto benignos, como los leiomiomas, como malignos (leiomiosarcomas y rhabdomyosarcomas), (Osborn y Weber 1983, Gabbiani y cols. 1981, Miettinen y cols. 1984).

La determinación inmunohistológica de desmina, es una práctica habitual en el diagnóstico diferencial de los sarcomas de células redondas, como marcador tumoral de los rhabdomyosarcomas (incluso los más indiferenciados), y su ausencia en otros tumores como neuroblastoma, neuroepitelioma, sarcoma de Ewing o linfomas (Tsokos y cols. 1986, Eusebi y cols. 1986).

#### 2.2.4.- NEUROFILAMENTOS:

Los neurofilamentos, consisten en una tripleta de proteínas de 200, 160 y 68 Kdalton, y caracterizan a las neuronas del SNC y SNP. También han sido reconocidos en células cromafines, (Bader y cols. 1984). Una de las características más notables de los neurofilamentos, es su marcada susceptibilidad a la proteólisis en presencia de iones  $Ca^{++}$ , (Lazarides 1980). Su misión sería establecer la

morfología tridimensional de las células nerviosas y sus axones, ejerciendo una función primordial en la transmisión de los impulsos nerviosos (Lazarides 1980).

La determinación inmunohistológica mediante anticuerpos frente a cualquiera de las subunidades proteínicas de los neurofilamentos, tiene importancia en el diagnóstico de determinadas neoplasias, como neuroblastomas (Osborn y cols. 1986), meduloblastoma (Trojanowski 1987), feocromocitomas (Trojanowski y cols. 1984, Miettinen y cols. 1985), e insulinomas (Miettinen y cols. 1985).

El valor diagnóstico de la determinación de neurofilamentos, en el caso de los sarcomas de células redondas, es importante para descartar linfomas y rhabdomyosarcomas. Recientemente Moll y cols. (1987), describieron su presencia en sarcoma de Ewing y Cavazzana y cols. (1987) confirmaron dicha presencia en sarcoma de Ewing y neuroepitelioma periférico.

#### 2.2.5.- GLIOFILAMENTOS:

Los gliofilamentos, son el último tipo de filamento intermedio, característicos de células gliales y ependimarias (Steinert y cols. 1984). Consisten en una proteína glial fibrilar ácida de 51 Kdalton, (Lazarides 1980).

La presencia de la proteína gliofibrilar ácida, es característica de los astrocitos normales y reactivos, así como de los tanicitos ependimarios (Miettinen y cols. 1984), sin embargo, destaca su ausencia en células de

oligodendroglía (Miettinen y cols. 1984).

La determinación inmunohistoquímica de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP), tiene importancia en el diagnóstico de los astrocitomas (Osborn y Weber 1983, Trojanowski y cols. 1984, Cerdá Nicolas y cols. 1985) y ependimomas (Miettinen y cols. 1984,1986). La presencia de GFAP en meduloblastomas es controvertida y las aisladas células positivas observadas en dichos tumores parecen ser astrocitos atrapados en el interior de la neoplasia (Miettinen y cols. 1984).

Su valor diagnóstico en los sarcomas de células redondas, permanece interrogante, aunque no se ha demostrado su presencia en ninguno de los tumores que forman este grupo.

### 2.3.- MARCADORES DE ESPECIFICIDAD NEURAL.

En este trabajo hemos intentado, además de la demostración de filamentos intermedios en tumores de células redondas, tipificar estos tumores en base a la expresión o producción de otros antígenos que poseen un carácter neural, como es el caso del HNK-1 y de la cromogranina.

#### 2.3.1.- HNK-1:

El anticuerpo monoclonal HNK-1, detecta el antígeno Leu 7, expresado por una subpoblación sanguínea de

aproximadamente 15% de linfocitos que componen el grupo de "natural killer" y "killer cells", (Lipinski y cols. 1983).

HNK-1 ha sido detectado en las células periféricas de los centros germinales en los ganglios linfáticos (Caillaud y cols. 1984) y en la médula ósea, donde las células HNK-1 positivas, constituyen el 0'2-1'2% de las células nucleadas totales, (Lipinski y cols. 1983).

Este anticuerpo monoclonal ha sido también detectado, en organos no hematopoyéticos de nuestra economía, como el tiroides y la próstata (Perez Bacete y Llombart Bosch 1986), células cromafines (Lipinski y cols. 1983), neuronas, glia (Adelman y cols. 1985), etc..

La importancia de la detección inmunohistoquímica de HNK-1 en el diagnóstico histopatológico, es su presencia en tumores de naturaleza neuroectodérmica (Lipinski y cols. 1983, Caillaud y cols. 1984), donde HNK-1 reconoce un glicolípido presente en las células tumorales, (Lipinski y cols. 1987). HNK-1 ha sido detectado en numerosos casos de tumores del SNC (Parentes y Rubinstein 1986), carcinoma medular de tiroides, feocromocitoma, insulinoma, esteseoneuroblastoma (Adelman y cols. 1985).

Dentro del grupo de tumores de células redondas, HNK-1 ha sido observado en neuroblastomas (Lipinski y cols. 1983) y en sarcoma de Ewing tanto "in vitro" (Lipinski y cols. 1983), como en material incluido en parafina (Caillaud y cols. 1984, Llombart Bosch y cols. 1986, Cavazzana y cols. 1987, Kawaguchi y Koike 1986).

### 2.3.2.- CROMOGRANINA:

El término de cromogranina, comprende un grupo de polipéptidos ácidos de varios tamaños, que forman la mayor proporción de proteínas solubles detectadas en la médula suprarrenal (Wilson y Lloyd 1984).

Han sido descritos tres tipos de cromogranina: la cromogranina tipo A, obtenida a partir de la médula suprarrenal humana, la cromogranina tipo B, obtenida a partir de médula suprarrenal bovina, y la cromogranina tipo C detectada en la hipófisis, (Angeletti 1986).

De los tres tipos, la más importante es la cromogranina A, constituida por una proteína ácida de 68.000 daltons de peso molecular (O'Connor y Deftos 1986). Esta proteína está relacionada con el almacenamiento y la liberación de catecolaminas (Lloyd y cols. 1986), y otras hormonas y ha sido detectada por inmunoelectronhistoquímica en los gránulos neurosecretorios de los órganos neuroendocrinos (Wilson y Lloyd 1984), aunque también ha sido detectada su presencia en órganos del sistema inmunitario, como el bazo, timo, ganglios linfáticos e hígado fetal (Angeletti y Hickey 1985).

La obtención de anticuerpos monoclonales frente a la cromogranina A, ha permitido su detección en órganos de nuestra economía, como la médula suprarrenal, células parafoliculares del tiroides, islotes pancreáticos, células del lóbulo anterior de la hipófisis y en general en todas las células del sistema neuroendocrino difuso (O'Connor y cols. 1983, Angeletti 1986, Wilson y Lloyd 1984, Hagn y cols.

1986). Estos mismos autores, han demostrado su presencia también en los tumores derivados de estas células, como feocromocitoma, insulinoma, carcinoma medular de tiroides, etc., no sólo a nivel inmunohistoquímico, sino plasmático, (O'Connor y Deftos 1986).

El interés de la detección de cromogranina A en el grupo de tumores de células redondas, es que el neuroblastoma es positivo frente a este marcador (Wilson y Lloyd 1984), mientras que no se ha detectado la presencia de cromogranina en otros tipos tumorales pertenecientes a este grupo

#### 2.4.- APLICACION DE TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR AL DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO. EXPRESION DE ONCOGENES.

En los últimos años, se ha avanzado notablemente en el conocimiento de los mecanismos que intervienen en la génesis del cancer. A los variados factores relacionados con la transformación neoplásica (p.e. factores ambientales, hormonales, etc.), hay que añadir los descubrimientos logrados en la última década a nivel molecular y genético.

A los genes directamente relacionados con la transformación neoplásica se les ha denominado oncogenes (Hunter 1984, Bishop 1983, Weinberg 1984). La primera observación de la acción de los oncogenes, fué en 1970, a partir del virus del sarcoma de Rous (retrovirus, cuyo RNA se

retrotranscribe en DNA cuando infecta una célula animal). A dicho gen se le denominó src (referido por Hunter 1984). A partir de este descubrimiento se han aislado un buen número de oncogenes, a partir de retrovirus que producen carcinomas, sarcomas, leucemias, linfomas, en pollos y otras aves, ratas, ratones o monos. En todos los casos, el oncogen es muy parecido a un gen normal de la célula huésped, denominado así, proto-oncogen, y es capaz de determinar una proteína similar a una proteína normal (Bishop 1983).

Además de los estudios de oncogenes efectuados a partir de retrovirus, se han aislado también genes presentes en el DNA de células neoplásicas, que cuando se introducen (fenómeno de transfección) en cultivos celulares normales (p.e. fibroblastos de ratón NIH 3T3), los transforman en cancerosos. Estos genes también son copias de proto-oncogenes presentes en células normales en estado inactivo, en el sentido de transformación neoplásica (Weimberg 1984).

Los proto-oncogenes, presentes en las células normales, se han conservado durante la evolución animal, desde los hongos hasta el ser humano, lo cual debe implicar que las proteínas codificadas por dichos genes, deben poseer funciones importantes en el metabolismo, crecimiento o división de la célula (Weatherall 1985). Así, se intenta agrupar a los proto-oncogenes aislados, por familias, dependiendo de la naturaleza de la proteína que determinan, por ejemplo, el oncogen abl, relacionado directamente con la leucemia mieloide crónica, se incluye dentro de la familia de las protein-kinasas tirosin específicas, el oncogen myc se

asocia a un grupo de proteínas nucleares (Sherr 1980), y el oncogen sis determina una proteína similar al factor de crecimiento plaquetario.

Otro aspecto importante de la acción de los oncogenes, en la transformación neoplásica, es la relación observada entre estos genes y alteraciones cromosómicas típicas de determinadas neoplásias. Así, en el linfoma de Burkitt, se han detectado traslocaciones que afectan al cromosoma 8, y precisamente el punto de rotura en dicho cromosoma, coincide exactamente con la localización del oncogen c-myc. En la leucemia mieloide crónica, es típica la alteración conocida como cromosoma Philadelphia, que supone una traslocación 9;22. La rotura en el cromosoma 9 coincide con el locus genético del oncogen c-abl (Weatherall 1985).

En resumen, existen oncogenes, aislados a partir de virus neoplásicos en animales y que también se han obtenido en células de diferentes neoplásias humanas: abl en leucemia mieloide crónica, c-myc en linfoma de Burkitt y carcinomas (Alitalo y cols. 1983, Shibuya y cols. 1985), N-myc en neuroblastoma (Schwab y cols. 1983) y en retinoblastoma (Lee y cols. 1984), y ras en carcinomas (Hunter 1984, Sherr 1986).

Si bien, todo lo expuesto hasta ahora en esta breve revisión, hace referencia a terrenos de investigación pura, prácticamente restringida a los grandes laboratorios de biología molecular, desde donde se están produciendo grandes avances en el conocimiento íntimo de la naturaleza del cancer y su origen, la aplicación de técnicas sencillas de genética molecular, como la determinación de oncogenes, puede reportar

una ayuda considerable en el diagnóstico anatomopatológico, clasificando los tumores según el patrón de expresión genética (Mc Keon y cols. 1986).

Por otra parte, la recientemente observada relación entre la expresión de oncogenes y el agravamiento del pronóstico clínico de determinadas neoplasias, por ejemplo, N-myc en neuroblastomas (Rosen y cols. 1986), o HER-2/neu en cancer de mama (Slamon y cols. 1987), hacen que el patólogo tenga que entregar al clínico una información, solo adquirible mediante la aplicación de técnicas de genética molecular.

En el campo de los tumores de células redondas, si excluimos los estudios exhaustivos realizados con la expresión y amplificación de N-myc en neuroblastomas (Schwab y cols. 1983, Michistsch y cols. 1984, Brodeur y cols. 1984), existen pocos trabajos relacionados con el resto de tumores pertenecientes a este grupo.

Bechet y cols., en 1984, comunicaron la expresión de c-myc en sarcoma de Ewing y la ausencia de c-sis en dicho tumor.

Mc Keon y cols., en 1986, han señalado la diferencia entre neuroblastoma, neuroepitelioma y sarcoma de Ewing, a nivel molecular. Dichos autores han comunicado altos niveles de N-myc en el neuroblastoma, no observados en los otros dos tumores. En contraposición tanto el neuroepitelioma como el sarcoma de Ewing expresaron altos niveles de c-myc, no detectables en los neuroblastomas estudiados.

### 3. MATERIAL Y METODOS

El material con el que se ha realizado este estudio procede de la sección de Ultraestructura del Laboratorio de Patología del National Institutes of Health (Bethesda MD. USA).

### 3.1.- LINEAS CELULARES UTILIZADAS.

#### A) Sarcoma de Ewing:

Líneas denominadas: A 4573

Tc 71

5838

Tc 106

#### B) Neuroepitelioma Periférico:

Líneas denominadas: Tc 32

Tc 248

Tc 135

#### C) Neuroblastoma:

Líneas denominadas: KCNR

IMR-32

D) controles:

Rabdomiosarcoma: línea denominada: Tc 212

Osteosarcoma: línea denominada: HOS

Carcinoma de colon: línea denominada: CC

Fibroblastos: línea denominada: NF

### 3.2.- PROCEDENCIA Y CARACTERIZACION DE LAS LINEAS CELULARES.

#### 3.2.1.- SARCOMA DE EWING:

##### 3.2.1.1.- Línea celular A 4573:

Línea obtenida en 1977 a partir de biopsia de tumoración clavicular en un paciente de sexo femenino y de 17 años de edad. El diagnóstico morfológico por microscopía óptica y electrónica fué de sarcoma de Ewing.

El crecimiento de dicha línea fué en cultivo monocapa.

Su morfología fué epiteloidea.

Se inyectó a ratones atímicos creciendo un tumor cuya morfología óptica y ultraestructural fué de sarcoma de Ewing.

Citogenética: muestra distintas alteraciones citogenéticas, destacando la  $t(11;22)(q24;q12)$  como marcador citogenético (Whang-Peng 1986).

El medio de congelación fué RMPI 1640 + 20% FBS (95%) y DMSO (5%).

El medio de cultivo utilizado fué RMPI 1640 + 20% FBS.

Su viabilidad fue del 98%.

Los test para micoplasmas, bacterias y hongos fueron negativos.

Dicha línea fue confirmada como humana por análisis enzimáticos.

### 3.2.1.2.- Línea celular Tc 71:

Línea celular obtenida en 1981 a partir de una biopsia de tumoración humeral practicada a un paciente varón de 22 años. El diagnóstico histopatológico realizado con microscopía óptica y electrónica fue de sarcoma de Ewing.

El crecimiento de dicha línea fue en cultivo monocapa.

Su morfología por microscopía de contraste de fase fue epiteloidea.

Se inyectó a ratones atímicos obteniéndose tumoración con análogas características ópticas y ultraestructurales.

Citogenética: muestra distintas alteraciones cromosómicas, destacando la  $t(11;22)(q24;q12)$  como marcador citogenético (Whang-Peng 1986).

El medio de congelación utilizado fue RPMI 1640 + 20% FBS (95%) y DMSO (5%).

El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1640 + 20% FBS.

Su viabilidad fue del 95%.

Los test para micoplasmas, hongos y bacterias fueron negativos.

Dicha línea fue confirmada como humana por análisis enzimáticos.

### 3.2.1.3.- Línea celular 5838:

Línea obtenida en 1977 a partir de una biopsia de tumoración humeral en un paciente varón de 27 años. El diagnóstico morfológico por microscopía óptica y ultraestructural fué de sarcoma de Ewing.

El crecimiento de dicha línea fué en cultivo monocapa.

La morfología por contraste de fase fué epiteloidea.

Se inyectó en ratones atímicos cuya morfología óptica y ultraestructural fué análoga a la obtenida en la biopsia original.

Citogenética: presenta múltiples alteraciones cromosómicas destacando la  $t(11;22)(q24;q12)$  como marcador citogenético (Whang-Peng 1986).

El medio de congelación fué RMPI 1640 + 20% FBS (95%) y DMSO (5%).

El medio de cultivo fué RMPI 1640 + 20% FBS.

La viabilidad fué del 95%.

Los test para micoplasmas, bacterias y hongos fueron negativos.

Dicha línea fué confirmada como humana por análisis enzimáticos.

### 3.2.1.4.- Línea celular Tc 106:

Línea obtenida en 1982 a partir de una biopsia de tumoración pélvica efectuada a un paciente varón de 19 años.

El diagnostico morfológico fué de sarcoma de Ewing.

El crecimiento de la línea fué en suspensión.

La morfología por contraste de fase fué de células pequeñas redondas.

Se inyectó a ratones atímicos obteniendose tumoración de análogas características

Citogenética: muestra distintas alteraciones cromosómicas, destacando la  $t(11;22)(q24;q12)$ , como marcador citogenético (Whang-Peng 1986).

El medio de congelación utilizado fué RPMI 1640 + 20% FBS (95%) + DMSO (5%).

El medio de cultivo utilizado fué RMPI 1640 + 20% FBS.

Su viabilidad fué del 93%.

Los test para micoplasmas, bacterias y hongos fueron negativos.

Esta línea fué confirmada como humana por análisis enzimáticos.

3.2.2.- NEUROEPITELIOMA PERIFERICO:

3.2.2.1.- Línea celular Tc 32:

Línea obtenida en 1979 a partir de una biopsia de tumor pelvico efectuada en un paciente de sexo femenino de 17 años de edad.

El diagnóstico morfológico, óptico y ultraestructural fué de neuroepitelioma periférico.

El crecimiento fué en cultivo monocapa.

La morfología por contraste de fase fué epiteloidea.

Se inyectó a ratones atímicos obteniéndose tumoración de análogas características.

Citogenética: presenta junto otras alteraciones citogenéticas una  $t(11;22)(q24;q12)$  como marcador citogenético (Whang-Peng 1986).

El medio de congelación fué RMPI 1640 + 20% FBS (95%) y DMSO (5%).

El medio de cultivo utilizado fué RMPI 1640 + 20% FBS.

La viabilidad fué del 98%.

Los test para micoplasmas, bacterias y hongos fueron negativos.

Dicha línea fué confirmada como humana por análisis enzimáticos.

#### 3.2.2.2.- Línea celular Tc 248:

Línea celular obtenida en 1986 a partir de una biopsia de tumoración pélvica (partes blandas) efectuada en un paciente de sexo femenino de 19 años de edad.

El diagnóstico morfológico, óptico y ultraestructural fué de neuroepitelioma periférico.

El crecimiento fué en cultivo monocapa.

La morfología por contraste de fase fué epiteloidea.

Se inyectó a ratones atímicos obteniéndose tumoración de análogas características.

Citogenética: presenta junto con otras alteraciones citogenéticas una  $t(11;22)(q22;q12)$ .

El medio de congelación fué RMPI 1640 + 20% FBS (95%) y DMSO (5%).

El medio de cultivo fué RMPI 1640 + 20% FBS.

La viabilidad fué del 97%.

Los test para micoplásmas, bacterias y hongos fueron negativos.

Dicha línea fué confirmada como humana por análisis enzimáticos.

### 3.2.2.3.- Línea celular Tc 135:

Línea celular obtenida en 1983 a partir de una biopsia de tumoración en muslo (partes blandas) efectuada en un paciente varón de 14 años.

El diagnóstico morfológico, óptico y ultraestructural fué de neuroepitelioma periférico.

El crecimiento fué en cultivo monocapa.

La morfología por contraste de fase fué epiteloidea.

Se inyectó a ratones atímicos obteniéndose tumoración de análogas características.

El medio de congelación fué RMPI 1640 + 20% FBS (95%) y DMSO.

El medio de cultivo fué RMPI 1640 + 20% FBS.

La viabilidad fué del 95%.

Los test para micoplasmas, bacterias y hongos fueron negativos.

Dicha línea fué confirmada como humana por análisis enzimáticos.

### 3.2.3.- NEUROBLASTOMA:

#### 3.2.3.1.- Línea celular KCNR:

Línea celular obtenida en 1979 a partir de un aspirado de médula ósea practicado en un varón de 11 años diagnosticado previamente de neuroblastoma de médula suprarrenal.

La morfología óptica y ultraestructural confirmó el diagnóstico de neuroblastoma metastático.

El crecimiento fué en cultivo monocapa.

La morfología por contraste de fase consistio en pequeñas placas de células redondas con prolongaciones típicas tipo neurita.

Se inyectó a ratones atímicos obteniendose tumoración de análogas características.

Citogenética: número modal=46. Del (1) (p34) ; t (17,20) (q21,q13).

El medio de congelación fué RMPI 1640 + 20% FBS (95%) y DMSO.

El medio de cultivo fué RMPI 1640 + 10% FBS.

La viabilidad fué del 93%.

Los test para micoplásma, bacterias y hongos fueron negativos.

Dicha línea fué confirmada como humana por análisis enzimáticos.

### 3.2.3.2.- Línea celular IMR 32:

Línea obtenida en 1967 a partir de una masa abdominal presente en un paciente varon de 13 meses de edad.

El diagnóstico morfológico, óptico y ultraestructural fué de neuroblastoma.

El crecimiento fué en cultivo monocapa.

La morfología por contraste de fase fué en pequeñas placas de células redondas con típicas prolongaciones tipo neurita.

Citogenética: número modal=49. M1 y M2 pertenecientes al grupo A con centrómeros submedios. Del (1); 16 -; grupo C con dos extracromosomas.

El medio de congelación fué RMPI 1640 + 20% FBS (95%) y DMSO.

El medio de cultivo fué RMPI 1640 + 20% FBS.

La viabilidad fué del 90%.

Los test para micoplásmas, bacterias y hongos fueron negativos.

Dicha línea fué confirmada como humana por análisis enzimáticos.

### 3.2.4.- RABDOMIOSARCOMA:

#### 3.2.4.1.- Línea celular Tc 212:

Línea obtenida en 1986 a partir de una biopsia de tumoración metastática en testículo (tumor primario

localizado en órbita) efectuada en un paciente varon de 16 años de edad.

El diagnóstico morfológico, óptico y ultraestructural fué de rabdomiosarcoma alveolar.

El crecimiento fué en cultivo monocapa.

La morfología por contraste de fase fué de celularidad mixta consistente en células pequeñas redondas junto a células fusiformes y células gigantes multinucleadas.

Se inyectó a ratones atímicos obteniendose tumoración de análogas características.

El medio de congelación utilizado fué RMPI 1640 + 20% FBS (95%) y DMSO.

El medio de cultivo utilizado fué RMPI 1640 + 20% FBS.

La viabilidad fué del 98%.

Los test para micoplásmas, bacterias y hongos fueron negativos.

Dicha línea fué confirmada como humana por análisis enzimáticos.

### 3.2.5.- OSTEOSARCOMA:

#### 3.2.5.1.- Línea celular HOS:

Línea obtenida en 1964 a partir de biopsia de tumoración en tibia en paciente femenino de 15 años.

El diagnóstico morfológico, óptico y ultraestructural fué de sarcoma osteogénico.

El crecimiento fué cultivo monocapa.

La morfología por contraste de fase fué epiteloidea.

El medio de congelación fué RMPI 1640 + 20% FBS (95%) y

DMSO.

El medio de cultivo utilizado fué RMPI 1640 + 20% FBS.

La viabilidad fué del 95%. Los test para micoplásmas, bacterias y hongos fueron negativos.

Dicha línea fué confirmada como humana por análisis enzimáticos.

### 3.2.6.- CARCINOMA DE COLON:

#### 3.2.6.1.- Línea celular CC:

Línea obtenida en 1985 a partir de exéresis quirúrgica de tumoración cólica en paciente femenino de 56 años.

El diagnóstico morfológico, óptico y ultraestructural fué de adenocarcinoma de colon.

El crecimiento fué en cultivo monocapa.

La morfología por contraste de fase fué epiteloidea con formación de grupos glandulares con material de secreción.

El medio de congelación utilizado fué RMPI 1640 + 20% FBS (95%) y DMSO.

El medio de cultivo utilizado fué RMPI 1640 + 20% FBS.

La viabilidad fué del 95%.

Los test para micoplásmas, bacterias y hongos fueron negativos.

Dicha línea fué confirmada como humana por análisis enzimáticos.

### 3.2.7.- FIBROBLASTOS NORMALES:

#### 3.2.7.1.- Línea celular NF:

Línea obtenida en 1984 a partir de biopsia cutánea.

El crecimiento fué en cultivo monocapa.

La morfología por contraste de fase fué de células fusiformes, (fibroblastos).

La viabilidad fué del 90%.

El medio de congelación fué RMPI 1640 + 20% FBS (95%) y DMSO (5%).

El medio de cultivo utilizado fué RMPI 1640 + 20% FBS.

Los test para micoplásmas, bacterias y hongos fueron negativos.

Dicha línea fué confirmada como humana por análisis enzimáticos.

### 3.3.- METODO DE CULTIVO DE TEJIDOS

#### 3.3.1.- OBTENCION DE LAS LINEAS CELULARES:

En el caso de las líneas celulares establecidas por nosotros (106, 71, 212, 248, y 135) el método utilizado fué el siguiente: el material procedente de biopsia o resección fué troceado en pequeños fragmentos (2-3 mm) que fueron lavados con HBSS 1X (Biofluids inc. USA) al que se añadieron

100 UI/ ml de penicilina-estreptomicina (Gibco USA). Posteriormente dichos fragmentos fueron sumergidos en una solución de HBSS 1X + 5 mgr/ml de colagenasa tipo IV (Cooper Biomedical USA) a 37°C durante 20 minutos con agitación periódica cada 5 minutos. A continuación se procedió a centrifugación a 400 g durante 5 minutos y el sedimento se resuspendió en RMPI 1640 (Whittaker USA) suplementado con 20% de suero bovino fetal (Gibco USA) y enriquecido con ITS premix (Collaborative Reserch) compuesto por insulina (5µg/ml), transferrina (10 µg/ml) y selenio (30 nM); progesterona (6'3 ng/ml) y putrescina (8'8 ng/ml) (Collaborative Reserch USA). La suspensión celular se sembró en frascos de 25 cm<sup>2</sup> (NUNC Dinamarca).

A las 24 horas se realizó una breve tripsinización y el sedimento obtenido se sembró definitivamente en frascos de 25 cm<sup>2</sup> utilizando como medio de cultivo RMPI 1640 + 20% FBS al que se añadió 100 U/ml de penicilina-estreptomicina.

### 3.3.2.- MANTENIMIENTO DE LAS LINEAS CELULARES:

El mantenimiento y crecimiento de las líneas se realizó en frascos de 75 cm<sup>2</sup> con medio de cultivo RMPI 1640 + 20% FBS realizandose cuando las células eran confluentes tantos pases como fueran necesarios.

### 3.3.3.- CARACTERIZACION DE LAS LINEAS CELULARES:

La tumorigenicidad de las líneas a partir de los tumores originales fué establecida por crecimiento en ratones atímicos. Las células cultivadas posteriormente in vitro fueron isomorfas con las células tumorales originales. Además, la ultraestructura de las mismas así como la de los tumores de los ratones atímicos fué indistinguible de la de los tumores originales.

### 3.4.- MICROSCOPIA OPTICA POR CONTRASTE DE FASE.

Para el control de la evolución y crecimiento de las distintas líneas celulares, así como para el reconocimiento de las características morfológicas elementales, utilizamos un microscopio invertido Nikon modelo MS.

Las fotografías de los cultivos se realizaron con una cámara Microflex AFMP (Polaroid land camera) adaptada al microscopio, utilizando film Polaroid tipo 55 (land film 4x5, 50 ASA, 18 DIN) con revelado instantáneo (20-25 segundos a 21°C).

### 3.5.- MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

$2.5 \times 10^4$  células/ml fueron sembradas en frascos de 25 cm<sup>2</sup> utilizando medio de cultivo RMPI 1640 con 20% de FBS.

Después de 3-6 días, los frascos fueron lavados con PBS y se procedió a la fijación in situ con 2'5% gluteraldehído en buffer Sorensen durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas las células se despegaron con una espátula estéril y el material resultante se centrifugó con una microcentrífuga Fisher modelo 235 B a máxima rpm durante 5 minutos. El sedimento obtenido fue lavado con PBS conteniendo 0'1 M glicina. Se procedió a la postfijación con osmio al 1% y a la deshidratación progresiva con alcoholés crecientes. Posteriormente el material fue incluido en Maraglass (Ladd Reserch Industries Inc. USA) o LR- WHITE (Polaron Instruments Inc. USA). Los cortes ultrafinos fueron obtenidos y fotografiados con microscopio electrónico Philips modelos 200 y 400.

### 3.6.- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

$2'5 \times 10^4$  células/ml fueron sembradas sobre cubreobjetos estériles (20 x 24 mm) utilizando el medio de cultivo estandar descrito anteriormente. Transcurridos de 3-6 días se procedió a la fijación de las células utilizando métodos distintos

según la naturaleza del antígeno a demostrar:

a) Filamentos intermedios: Queratina, vimentina y neurofilamentos (160 y 200 KD) utilizamos como fijador el metanol absoluto bajo en acetona (JT.Baker Chemical Co. USA)

a -20°C durante 10 minutos o bien acetona pura (Mallinckrodt Inc. USA) durante el mismo período de tiempo.

b) Antígenos de superficie o antígenos en cuya composición intervinieran moléculas de carácter lipídico (HNK-1): utilizamos el paraformaldehído (polysciences Inc. USA) al 3% en PBS (Dulbecco phosphate buffered saline Gibco Co. USA) pH 7.4 durante 10 minutos.

Posteriormente los cubreobjetos fueron lavados con PBS tres veces consecutivas y se procedió a la incubación del primer antisuero (frente al antígeno a demostrar). Dicha incubación se realizó durante 8-12 horas en cámara húmeda.

Los antisueros utilizados, así como su procedencia y dilución óptima fueron:

- \* anti-vimentina: Boehringer Mannheim (RFA): 1/50
- \* anti-keratina AE1-AE3: Hybritech Inc. (USA): 1/40
- \* anti-neurofilamento 160 KD: Boehringer Mannheim (RFA): 1/10
- \* anti-neurofilamento 200 KD: Boehringer Mannheim (RFA): 1/10
- \* anti-HNK-1: monoclonal NIH: 1/200 (10 µg/ml).

Todas las diluciones fueron efectuadas con PBS suplementado con 0.1% de albumina bovina fracción V (Eastman Kodak Co. USA). Posteriormente se realizaron tres lavados consecutivos con PBS y se procedió a la incubación con el segundo antisuero marcado con fluoresceína (IgG o IgM goat anti-mouse conjugado con FITC Boehringer RFA), utilizando una dilución 1:20 durante 30 minutos en cámara oscura y húmeda.

Una vez finalizada dicha incubación, se efectuaron tres lavados con PBS y los cubreobjetos fueron examinados con un microscopio Universal Zeiss (DRA) 100 con dispositivo de fluorescencia IV FI EPI. Las fotografías fueron realizadas con una cámara MC 63 adaptada al microscopio.

La obtención del anticuerpo monoclonal HNK-1 se realizó a partir del hibridoma HNK-1 facilitado por la American Type Culture Collection (Maryland USA). Dicha línea celular fue desarrollada y crecida en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS. A los 3-4 días,  $10^6$  células fueron inyectadas por vía intraperitoneal a ratones, provocando a las 2-3 semanas una ascitis. El líquido ascítico recogido fue purificado por cromatografía de afinidad, obteniéndose una fracción IgM anti HNK-1 que luego fue utilizada como antisuero primario a dilución de 10  $\mu$ gr/ml.

### 3.7.- ESTUDIO DEL CITOESQUELETO.

Para la extracción del citoesqueleto utilizamos el siguiente protocolo:

\*  $2.5 \times 10^5$  células fueron sembradas en discos de 150  $\text{cm}^2$  y crecidas hasta la confluencia en medio estandar. Una vez confluentes se utilizó el siguiente método para la extracción de filamentos intermedios (queratina, vimentina y neurofilamentos):

\* lavado de los discos con PBS sin calcio ni magnesio (Whitaker USA) conteniendo 5 mM EGTA (ácido etilenglicoltetracético) y 5 mM EDTA (ácido etilendiamino tetracético) como agentes quelantes.

\* tratamiento con Triton X-100 buffer: 10 mM Tris-ClH pH 7'5, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0'14 M ClNa, 5 mM EDTA.

\* Recogida del material celular con una espátula y centrifugación con microcentrífuga Beckman a 3.000g durante 10 minutos.

\* El sedimento se disolvió en tampón rico en sales: 10 mM Tris HCl pH 7'5, 5 mM EDTA, 0'5% Triton X-100, 1'5 M ClK, 2 mM EGTA permaneciendo dicha solución a 4°C durante 10 minutos.

\* Centrifugación a 12.000g durante 10-15 minutos.

\* El sedimento se disolvió en 200-300µl de tampón de extracción: 50 mM Tris-HCl pH 6'8, 1% SDS (Sodium dodecilsulfato), 2% dimercapto-etanol, 1 mM Cl<sub>2</sub>Mg. Dicha solución se homogeniza o se sonica brevemente y es calentada a 80°C durante 10-15 minutos.

\* Centrifugación a 15.000g durante 15-20 minutos con una microcentrífuga Fisher.

\* Recogida y alicuotado del sobrenadante, material con el que se puede efectuar una electroforesis monodimensional.

### 3.8.- ESTUDIO DE GRANULOS NEUROSECRETORES.

Para la extracción de cromogranina utilizamos el siguiente protocolo:

\*  $2.5 \times 10^5$  células/ml fueron sembradas en discos de 150 cm<sup>2</sup> y crecidas hasta la confluencia durante 3-6 días.

\* Lavado de los discos con PBS sin calcio ni magnesio.

\* Tratamiento con buffer de lisis: 0.3 M sucrosa + 5  $\mu$ M PMSF (fenil metil sulfonil fluoride).

\* Despegado de las células con espátula y homogenización de las mismas.

\* Centrifugación a 800g durante 20 minutos durante 4°C. (centrífuga Sorvall RC-5).

\* Recogida del sobrenadante y ultracentrifugación del mismo a 137.000g durante 60 minutos (ultracentrífuga Beckman L265B con rotor SW50.1).

\* Disolución del sedimento en SDS-PAGE sample buffer: 0.5 M

Tris HCl pH 6'8, glicerol, 10% SDS, 2%  $\beta$ mercaptoetanol, 0'05% azulbromofenol.

Todas las operaciones de extracción tanto de filamentos intermedios como de cromogranina se efectuaron a 4°C. En el caso de neurofilamentos y cromogranina utilizamos médula espinal humana y glándula suprarrenal procedentes de autopsias clínicas las cuales fueron homogenizadas con los tampones de lisis siguiendo el mismo protocolo que para los cultivos celulares.

Una vez realizada la extracción se determinó la cantidad de proteínas totales siguiendo el método de Bio-Rad midiendo la densidad óptica mediante un espectrofotómetro Gilford (Gilford Instrument Laboratories Inc. USA) a una longitud de onda de 580 nm.

Posteriormente se alicuotaron las muestras en partes proporcionales de 30  $\mu$ gr de proteína y se almacenaron a 20°C.

### 3.9.- DEMOSTRACION DE FILAMENTOS INTERMEDIOS Y GRANULOS NEUROSECRETORES: WESTERN BLOT.

Las alicuotas (30  $\mu$ gr) obtenidas fueron disueltas en SDS-PAGE sample buffer en una proporción de 1:1'5.

Se realizó electroforesis monodimensional en gel de poliacrilamida utilizando un aparato minivertical Slab-gel (Bio-Rad USA). El método está basado siguiendo a Laemmli (1970):

\* Una vez el aparato está montado se efectúa una base a partir de agarosa al 1%.

\* Preparación del gel separador: utilizamos dos tipos según la proporción de acrilamida, dependiendo del peso molecular de la proteína a demostrar:

- gel 7'5% compuesto por:

10 ml acrilamida bisulfato (Bio-Rad)  
10 ml Tris 1'5M pH 8'8  
400  $\mu$ l SDS 10%  
20  $\mu$ l TEMED (Bio-Rad)  
300  $\mu$ l amonio persulfato (Bio-Rad)  
19'3 ml agua

- gel 10% compuesto por:

13'34 ml acrilamida bisulfato  
10 ml Tris 1'5M pH 8'8  
400  $\mu$ l SDS 10%  
20  $\mu$ l TEMED  
300  $\mu$ l amonio persulfato  
16 ml agua

Una vez el gel separador ha polimerizado se prepara el gel iniciador (stack gel) compuesto por:

1'7 ml acrilamida bisulfato  
2'5 ml Tris 0'5M pH 6'8  
100  $\mu$ l SDS 10%  
5  $\mu$ l TEMED

50  $\mu$ l amoniopersulfato

5'7 ml agua

Cuando se produce la polimerización de este segundo gel se introduce en el aparato el tampón de electroforesis: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 1% SDS, pH 8'3 y se inicia la electroforesis utilizando una fuente de alimentación LKB (Bromma USA) mantenida a un voltaje de 60-100 V durante 1-2 horas.

En cada pocillo del gel fueron introducidos 30  $\mu$ l de la muestra a estudiar. Como marcador de los distintos pesos moleculares utilizamos el PM standard (Bio-Rad USA).

Una vez efectuada la separación de las proteínas se utilizaron dos métodos diferentes:

a) Visualización de las proteínas mediante la tinción del gel con azul-Comassie: dicha tinción se efectuó con una solución de Comassie-Blue (Bio-Rad) durante una hora a temperatura ambiente. La visualización de las distintas bandas se consiguió tras 6-12 horas de tratamiento con una solución de ácido acético al 10% y metanol al 40%.

b) Transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa: siguiendo el método de Towbin y cols. (1979), que consiste en adherir el gel a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad), colocar estos entre dos papeles de filtro e introducirlo en un aparato de transferencia (Transblot cell Bio-Rad), utilizando como tampón una solución 25 mM Tris, 0'2 M glicina y 20% metanol absoluto pH 8'3. Dicho aparato se conectó a una fuente de alimentación LKD

manteniendo un voltaje de 60 V durante 2-4 horas.

Cuando fué necesario demostrar proteínas de elevado peso molecular (NFTP 160 Y 200 KD, los papeles de filtro fueron embebidos previamente durante dos horas con una solución 25 mM Tris, 192 mM glicina, 1% SDS, conteniendo 74 µgr/ml de Pronasa (Calbio Chem.USA).

Finalizada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fué tratada con una solución de albúmina bovina fracción V al 3% en PBS durante 2-3 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se procedió a la incubación frente al primer antisuero, frente al antígeno a demostrar. Dicha incubación se realizó a 4°C durante 8-12 horas utilizando los siguientes antisueros y diluciones:

- \* anti-vimentina (Boehringer): 1/50
- \* anti-queratina (Hybritech): 1/40
- \* anti-neurofilamentos 160 KD (Boehringer): 1/100
- \* anti-neurofilamentos 200 KD (Boehringer): 1/100
- \* anti-cromogranina (Boehringer): 1/200

Todas las diluciones se realizaron en PBS conteniendo 0.1% de albúmina bovina.

Con posterioridad a la incubación, la membrana fué lavada tres veces con PBS y posteriormente sometida a la acción del segundo antisuero utilizando para ello, inmunoglobulinas de conejo frente a ratón (IgG rabbit-antimouse Dako Co. USA) a dilución de 1/50 durante una hora a temperatura ambiente. Tras tres lavados consecutivos con PBS, la membrana fué incubada con el complejo peroxidasa-

antiperoxidasa de ratón (PAP mouse Dako Co. USA) a una dilución de 1/50 durante una hora a temperatura ambiente.

Finalizado este proceso, se efectuaron tres lavados consecutivos con PBS y uno con PBS conteniendo 0'1% de Triton X-100.

El revelado de la reacción se realizó con una solución de 60 mgr 4-cloro-1-naftol (Bio-Rad USA), 20 ml metanol absoluto, 100 ml PBS y 60 µl de agua oxigenada durante 5 minutos y a temperatura ambiente.

### 3.10.- ESTUDIO DE EXPRESION DE ONCOGENES.

#### 3.10.1.- OBTENCION DE RNA TOTAL A PARTIR DE LINEAS CELULARES:

El método utilizado es el del isotiocianato de guanidina (Maniatis y cols.) que consiste en:

##### a) Preparación de material, utensilios y soluciones:

Todo el material ha de estar autoclavado y esteril y todos los pasos técnicos se realizan con guantes para prevenir la contaminación por RNAasa.

##### b) Solución de guanidina-isitiocianato:

Se prepara una solución de 250 ml a partir de:

\* Guanidina-isotiocianato (Fluka Ag. Suiza): 118 gr (4N) disueltos en 90 ml de agua destilada esteril y posteriormente en 200 ml de agua. Esta solución se realiza con protección de luz y calor.

- \* 5 mM citrato sódico pH 7: 1'25 ml de una solución madre 1 M.
- \* 0'5% sarcosil (N-lauril-sarcosine BRL USA): 6'25 ml de una solución madre 20% sarcosil.
- \* 0'1 N mercaptoetanol: 1'78 ml de una solución madre 14 N.
- \* Cloruro de cesio (BRL USA): se disuelven 96 gr de  $CsCl$  en 0'1 N EDTA pH 7'5 (70 ml).
- \* 3 M acetato de sodio pH 6.

Para la obtención de RNA total a partir de las líneas celulares estudiadas se sembraron  $2'5 \times 10^5$  cel/ml en discos de 150  $cm^2$ , utilizando medio RMPI 1640 + 20% FBS y fueron crecidas hasta la confluencia. En dicho momento fueron lavados los discos con PBS esteril a 4°C dos veces y se procedió a la homogenización de las células con 5 ml de guanidina isotiocianato. El homogenizado se traslado a tubos de pollyallomer (Beckman USA) que previamente contenían 15 ml de la solución de  $CsCl$ . Una vez vertido el homogenizado, se llenaron los tubos con guanidina y fueron pesados para equilibrar exactamente el rotor de la centrífuga. Los tubos, con pesos equilibrados fueron adaptados a un rotor de ultracentrífuga tipo SW-27 (Beckman). Posteriormente se realizó una ultracentrifugación con centrífuga Beckman, modelo L265D a 25.000 rpm durante 24 horas a 15°C.

El sedimento obtenido fué disuelto en 400  $\mu$ l de agua destilada esteril y precipitado en 40  $\mu$ l de 3 M acetato sódico y 1 ml de alcohol etílico almacenandolo durante unas horas a - 70°C. Seguidamente cada sedimento fué sometido a microcentrifugación y redisolución en agua destilada,

tomandose una alícuota de 1-2  $\mu$ l para la medida de la densidad óptica, utilizando un espectofotómetro Gilford (Gilford instrumets Laboratories Inc. USA). Una vez realizada esta medida, la cantidad total de RNA fué alicuotada en partes de 30 $\mu$ gr.

### 3.10.2.- ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA. NORTHERN BLOT:

#### a) Preparación del gel:

Se utilizó un gel de agarosa al 1% cuya composición es:

1% agarosa: 1gr

10 X MOPS: 10 ml

2'2 M formaldehido: 1'8 ml formaldehido  
(37%)

d H<sub>2</sub>O: 87 ml

1  $\mu$ gr/ml bromuro etídio: 5 $\mu$ l

La solución 10 X MOPS (buffer o tampón de electroforesis) consiste en :

\* 1 X: 20 mM MOPS (Sigma Co. USA)

5 Mm acetato de sodio

1 mM EDTA

pH 7

\* 10 X (1 L): 44'86 gr MOPS

6'8 gr acetato de sodio

3'8 gr EDTA

Una vez preparado el gel se vierte en el portageles del aparato de electroforesis horizontal (BRL modelo H1-H3).

b) Preparación de las muestras:

30 µgr de RNA total se disolvieron en una solución consistente en: 500 µl formamida, 180 µl formaldehído, 100 µl 10 X MOPS, con una proporción de 2'2 µl de RNA y 7'8 µl de dicha solución. Una vez finalizado esto, las muestras fueron calentadas a 65°C durante 5 minutos y posteriormente depositados en una cubeta con hielo. Acto seguido se añadieron 2 µl de una solución colorante compuesta por: 0'25% azul bromofenol, 0'25% xileno-cianol, 15% ficol tipo 400.

Las muestras fueron introducidas en el gel y se procedió a electroforesis con voltaje de 60 V 4-10 horas utilizando una fuente de alimentación LKB (Bromma USA).

Una vez finalizada la electroforesis, el gel fué sumergido en una solución 20 X SSC (175'3 gr ClNa, 88'2 gr citrato de sodio, para 1 L pH 7) y fotografiado con una cámara polaroid dotada de un sistema de rayos ultravioleta. La fotografía resultante sirvió de control del estado del RNA (normal o degradado) y de la situación de las bandas ribosomales (1'4 Kb y 4'7 Kb) utilizadas como marcadores.

c) Transferencia del RNA:

Una vez fotografiado el gel, se sumergió en agua destilada durante 15 minutos y se adhirió a una membrana de nylon (Gene. Screen Plus. Du Pont Co. USA), poniendo estos entre dos papeles de filtro humedecidos en 10 X SSC. Sobre todo este conjunto, apilamos 10 papeles de filtro secos y realizamos así la transferencia por capilaridad durante 6-8

horas, utilizando como buffer 10 X SSC a partir de una solución madre 20 X SSC, compuesta por: 175'3 g NaCl, 88'2 g Na citrato, 800 ml de agua a pH 7.

Posteriormente se colocó la membrana entre dos papeles de filtro y se introdujo en una estufa con vacío a 80°C durante 2 horas.

#### d) Hibridación del RNA:

El primer paso consistió en el tratamiento de la membrana con la mezcla prehibridadora consistente en: 50% formamida desionizada, 1% SDS, 1 M ClNa, 10% dextran sulfato.

Esta solución se introdujo junto con la membrana en una bolsa de plástico que posteriormente fué sellada, realizándose una incubación a 42 °C durante 30 minutos con agitación constante.

El siguiente paso fué añadir a la mezcla de prehibridación 100 µl de una solución de DNA desnaturizado de esperma de salmón (Sigma Co. USA) (10 mgr/ml) y la sonda radiactiva marcada con P<sub>32</sub> (c-myc, n-myc, Ha-ras. Lofstrand Lab. USA). La concentración final de la sonda fué ≤10 ng/ml (1-4 x 10<sup>5</sup> dpm/ml). Se selló la bolsa y se incubó a 42°C durante 6-24 horas con agitación constante.

Una vez realizada la hibridación se lavó la membrana de la siguiente forma:

\* Dos veces con 2 X SSC, 5 minutos a temperatura ambiente con agitación constante.

\* Dos veces con 2 X SSC + 1% SDS a 60°C, durante 30 minutos con agitación constante.

\* Dos veces con 0'1 X SSC a temperatura ambiente durante 30

minutos con agitación constante.

Posteriormente se secó la membrana entre dos papeles de filtro y se realizó la autoradiografía, con un film Kodak XAR-2 (Eastman Kodak Co. USA) y una exposición de 6-72 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 4. RESULTADOS

#### 4.1.- MICROSCOPIA OPTICA POR CONTRASTE DE FASE.

##### 4.1.1.- SARCOMA DE EWING:

##### 4.1.1.1.- Línea celular A 4573:

Dicha línea se caracterizó por formar una sólo población celular estando constituida por elementos redondeados de pequeño tamaño, que durante la fase de crecimiento inicial se agrupaban en pequeños nidos morulares. Se producía una tendencia a confluir en grandes placas a partir de las 24 horas, observandose una entera confluencia a las 72 horas posteriores a la realización del subcultivo. Las células tumorales entonces, adoptaban una disposición de tipo epitelioides, con margenes citoplásmicos bien definidos.

Morfológicamente eran células de pequeño tamaño, con nucleo redondeado, finos grumos cromatínicos, y nucleolo redondeado central. El citoplasma era escaso y no se evidenció ningun signo de diferenciación.

El indice mitótico en la fase de crecimiento fué de dos mitosis por campo a gran aumento (Figura 1.).

#### 4.1.1.2.- Línea celular Tc 71:

Morfologicamente esta línea se caracterizaba por poseer una sólo población celular a partir de elementos redondeados de pequeño tamaño. En la fase expansiva de crecimiento, dichas células se agrupaban en estructuras globulares, permaneciendo en suspensión las primeras 18 horas. A partir de las 24 horas, las células tumorales, tendían a la formación de placas adheridas al suelo del frasco, detectandose una confluencia completa a las 72 horas. En ese momento, las células tumorales adoptaban una disposición epitelioides, con margenes celulares bien definidos.

Se trataba de células de pequeño tamaño, nucleo redondeado, finos grumos cromatínicos, y nucleolo evidente. El citoplasma era escaso y presentaba proyecciones intercelulares cortas, con escasas varicosidades.

El indice mitótico en la fase expansiva fué de una a dos mitosis por campo a gran aumento.

#### 4.1.1.3.- Línea celular 5838:

Dicha línea celular se caracterizó por tener una población monomorfa, constituida por células de pequeño tamaño, y forma redondeada, que crecían agrupadas en estructuras globulares durante la fase expansiva. A partir de las 24 horas, las células formaban placas adheridas, experimentando notable tendencia a la confluencia, la cual llegaba a ser completa a las 90 horas. Con el cultivo confluyente la morfología celular era epitelioides.

Se trataba de células de pequeño tamaño, núcleo redondeado, grumos cromatínicos finos, nucleolo central, y bordes citoplásmicos bien definidos, sin ningún signo de diferenciación.

El índice mitótico durante la fase expansiva fue de una mitosis por campo a gran aumento.

4.1.1.4.- Línea celular Tc 106:

Caracterizada por una población celular monomorfa, constituida por células redondas de pequeño tamaño, que tendían a agruparse en estructuras globulares durante la fase expansiva y la mayor parte de la fase de estabilización, evidenciándose confluencia a partir de las 72 horas. El crecimiento predominante fue de tipo suspensión.

Morfológicamente eran células de núcleo redondeado, cromatina fina, nucleolo central, y citoplasma escaso sin signos de diferenciación.

El índice mitótico durante la fase expansiva fue de una a dos mitosis por campo a gran aumento (Figura 2.).

En resumen, la morfología óptica por contraste de fase, de las líneas celulares de sarcoma de Ewing, presentaba unos signos comunes en cuanto a velocidad de crecimiento, tendencia a la confluencia, índice mitótico, tamaño y forma celular. Tan sólo una de las líneas celulares (Tc 71), presentó un fenotipo neural caracterizado por la existencia de proyecciones celulares cortas sin varicosidades.

#### 4.1.2.-NEUROEPITELIOMA PERIFERICO:

##### 4.1.2.1.- Línea celular Tc 32:

Caracterizada por una población monomorfa de células redondas, de mediano tamaño, que durante la fase expansiva se agrupaban en formaciones globulares con un crecimiento en suspensión durante las primeras 12 horas. A partir de las 24 horas, dichas células se agrupaban en placas epitelioides, apreciándose confluencia a las 72 horas.

En este momento, las células presentaban un tamaño mayor, con bordes citoplásmicos netos, núcleo redondeado o ligeramente elongado, y nucleolo evidente. El citoplasma era escaso y no se observó ningún signo de diferenciación neural.

El índice mitótico durante la fase expansiva fué de dos mitosis por campo a gran aumento.

##### 4.1.2.2.- Línea celular Tc 248:

Esta línea se caracterizó durante la fase inicial de explante, por estar constituida por grupos de células pequeñas redondas, con tendencia a la emisión de largas prolongaciones citoplásmicas de aspecto neural.

Tras los primeros pases, se produjo un cambio en la morfología celular, apreciándose placas epitelioides que confluían a las 72 horas.

En la fase de estabilización, la morfología celular era a partir de elementos de pequeño tamaño, bordes bien definidos, núcleo elongado, cromatina grumosa y nucleolo

evidente. En esta fase no fueron visibles las prolongaciones celulares.

El índice mitótico en la fase expansiva fué de dos mitosis por campo a gran aumento (Figura 4.).

#### 4.1.2.3.- Línea celular Tc 135:

Línea celular caracterizada por una población monomorfa, constituida por células redondas de pequeño tamaño, agrupadas en placas con tendencia a la emisión de proyecciones citoplásmicas de tipo neural, evidentes tanto en la fase expansiva como en la de estabilización. Se observó confluencia total a partir de las 90 horas.

En la fase de estabilización, la morfología era redondeada, los límites citoplásmicos netos, el núcleo redondeado con cromatina granular y el nucleolo evidente.

El índice mitótico en la fase expansiva fué de una mitosis por campo a gran aumento (Figura 3.).

En resumen, la morfología óptica por contraste de fase en las líneas celulares de neuroepitelioma periférico, se caracterizaba por conformar poblaciones celulares monomorfas, con elementos de mayor tamaño que los observados en el sarcoma de Ewing, con una tendencia a la emisión de proyecciones neurales, al menos en dos de las tres líneas analizadas, y un índice de crecimiento rápido.

#### 4.1.3.- NEURCEBLASTOMA:

##### 4.1.3.1.- Línea celular KCNR:

Dicha línea se caracterizó por células redondas de pequeño tamaño, que crecían en suspensión las primeras 12 horas, observándose una tendencia al crecimiento monocapa a partir de este momento, alcanzándose la confluencia en el transcurso de 5-6 días.

Las células tumorales en la fase de estabilización eran de pequeño tamaño, morfología redondeada, núcleo redondo de cromatina fina y nucleolo poco evidente. El citoplasma era escaso, y presentaba abundantes procesos de tipo neural.

El índice mitótico en la fase expansiva fue de una mitosis por campo a gran aumento (Figura 5.).

##### 4.1.3.2.- Línea celular IMR-32:

Caracterizada morfológicamente por células redondas de pequeño tamaño que se agrupaban en la fase expansiva en estructuras globoides, con crecimiento en suspensión adoptando a partir de las 24 horas una morfología de cultivo monocapa. La confluencia se alcanzaba a las 72 horas.

Las células tumorales eran redondeadas, de pequeño tamaño, con el núcleo elongado sin nucleolo evidente. El citoplasma presentaba prolongaciones de tipo neural que no desaparecían en la fase de estabilización.

El índice mitótico en la fase expansiva fue de una mitosis por campo a gran aumento (Figura 6.).

En resumen, la morfología óptica por contraste de fase en las dos líneas de neuroblastoma, se caracterizaba por elementos celulares de menor tamaño al observado en el sarcoma de Ewing y el neuropitelioma periférico. El fenotipo neural fué evidente.

#### 4.1.4.- RABDOMIOSARCOMA:

##### 4.1.4.1.- Línea celular Tc 212:

Esta línea se caracterizó por una población celular polimorfa, constituida por células pequeñas, redondeadas, de núcleo elongado, células fusiformes de aspecto fibroblástico, pero dotadas de núcleo voluminoso y nucleolo evidente, y células gigantes multinucleadas. Este polimorfismo celular fué evidente en la fase expansiva y en la de estabilización.

El crecimiento fué rápido, en cultivo monocapa, con tendencia a la confluencia total a las 72 horas.

El índice mitótico en la fase expansiva fué de dos mitosis por campo a gran aumento (Figura 7.).

#### 4.1.5.- OSTEOSARCOMA:

##### 4.1.5.1.- Línea celular HOS:

Caracterizada por una población polimorfa a partir de elementos celulares fusiformes, células redondas y células gigantes multinucleadas. Este polimorfismo fué evidente

durante las fases expansiva y de estabilización.

El crecimiento del cultivo fué de tipo monocapa observandose confluencia a las 72 horas.

El índice mitótico durante la fase expansiva fué de tres mitosis por campo a gran aumento (figura 8.).

#### 4.1.6.- CARCINOMA DE COLON:

##### 4.1.6.1.- Línea celular CC:

Caracterizada por una población celular monomorfa, constituida por elementos de mediano tamaño, morfología poliedrica, núcleo redondo central, nucleolo evidente y citoplasma amplio en ocasiones vacuolado. Dichas células se agrupaban formando estructuras glandulares, con unaseudoluz central, ocupada por material de secreción.

El crecimiento del cultivo fué de tipo monocapa, apreciandose confluencia a los 5-6 días.

El índice mitótico en la fase expansiva fué de una mitosis por campo a gran aumento (Figura 9.).

#### 4.1.7.- FIBROBLASTOS NORMALES:

##### 4.1.7.1.- Línea celular NF:

Caracterizada por una población polimorfa, predominando células fusiformes de núcleo oval. Junto a ellas se podían observar células redondeadas de pequeño tamaño y células gigantes mononucleadas, de amplio citoplasma.

El crecimiento del cultivo fué lento, de tipo monocapa alcanzandose la confluencia en el transcurso de 3-4 semanas (Figura 10.).

Los aspectos diferenciales de las líneas celulares analizadas en base a su morfología óptica, aparecen esquematizados en la tabla número 1.

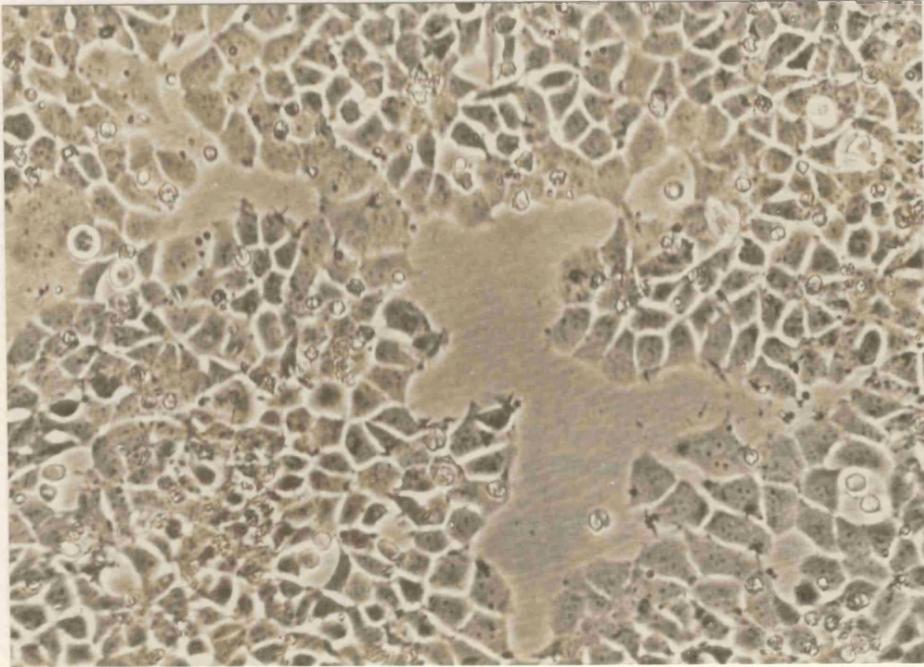
## MICROSCOPIA OPTICA POR CONTRASTE DE FASE

Lineas celulares	S. EWING	NEUROEPITELIOMA	NEUROBLASTOMA	RABDOMIOSARCOMA
<b>Tipo de crecimiento</b>	monocapa suspensión	monocapa	suspension monocapa	monocapa
<b>Tiempo de crecimiento</b>	rápido	rápido	rápido	rápido
<b>Tamaño celular</b>	pequeño	mediano	pequeño	variable
<b>Forma celular</b>	redonda	redonda	redonda	polimorfa
<b>Mitosis</b>	evidentes	evidentes	evidentes	numerosas
<b>Procesos de tipo neural</b>	aislados	presentes	numerosos	ausentes

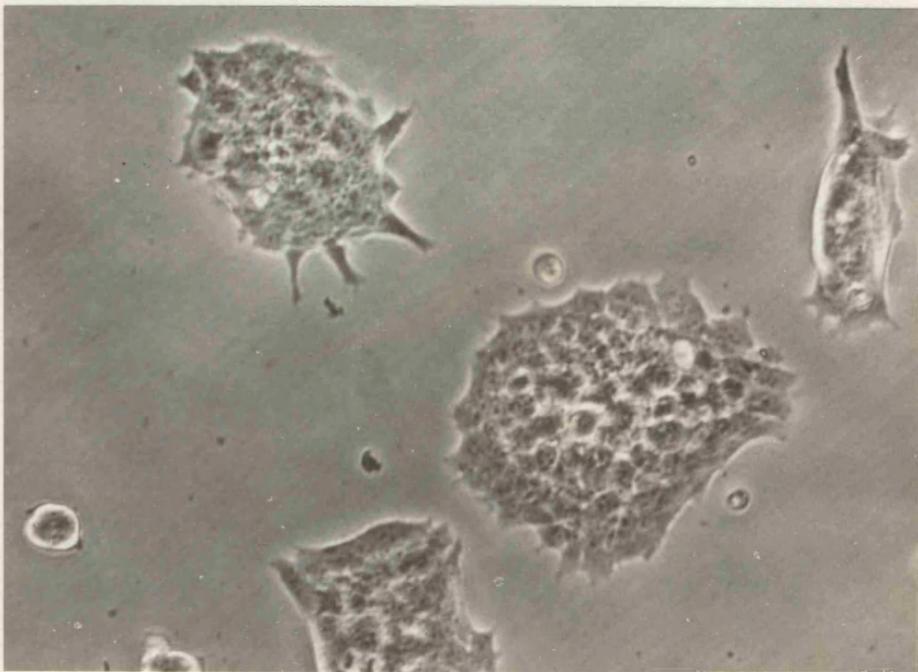
**TABLA 1.-** Cuadro-resumen de las principales características morfológicas por microscopía de contraste de fase.

Figura 1. Sarcoma de Ewing (línea celular 5838).  
Organización del cultivo en placas "epiteloides" confluentes.  
Contraste de fase 10 X.

Figura 2. Sarcoma de Ewing (línea celular Tc 106).  
Típico crecimiento en suspensión. Las células tumorales, de  
pequeño tamaño, se agrupan en estructuras morulares.  
Contraste de fase 20 X.



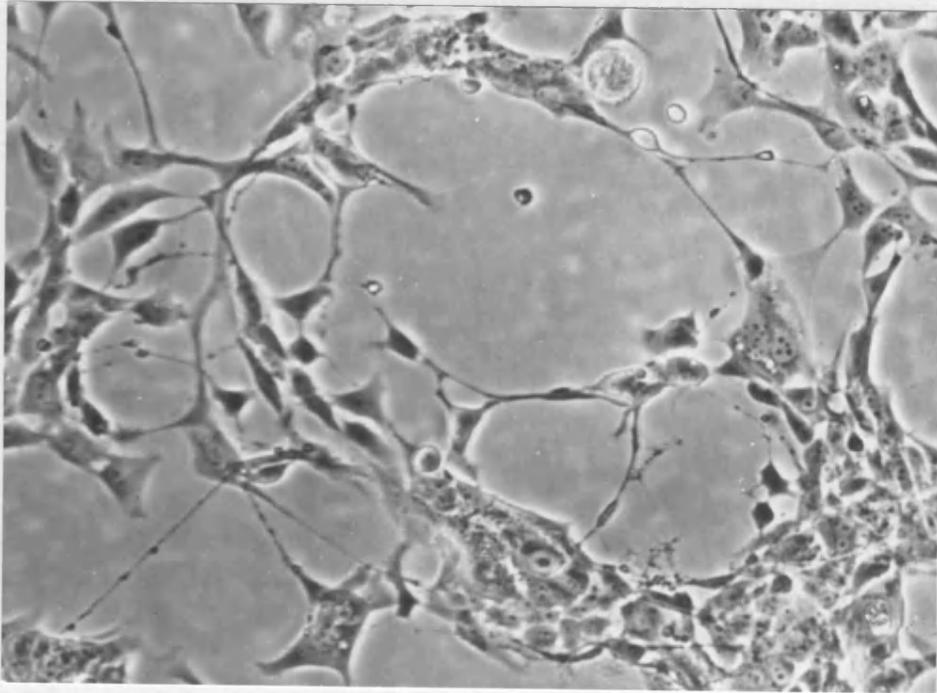
1



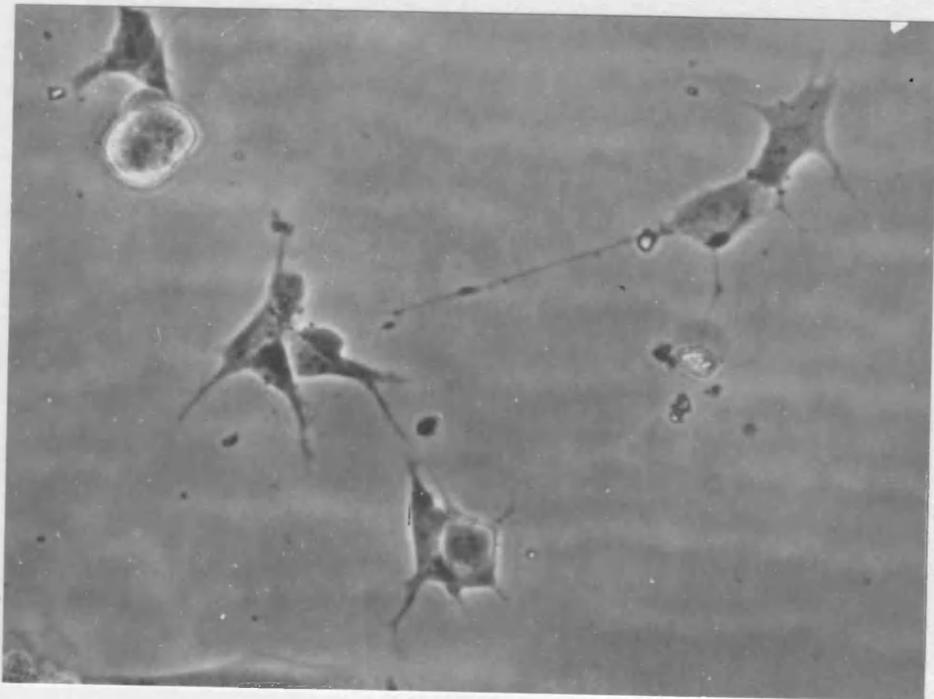
2

Figura 3. Neuroepitelioma periférico (línea celular Tc 135)  
Las células tumorales se disponen en pequeños grupos, con  
emisión de largos procesos de tipo neural. Contraste de fase  
20 X.

Figura 4. Neuroepitelioma periférico (línea celular Tc 248)  
Explante inicial. Vease la presencia de procesos  
citoplásmicos de tipo neural. Contraste de fase 20 X.



3



4

Figura 5. Neuroblastoma (línea celular KCNR).

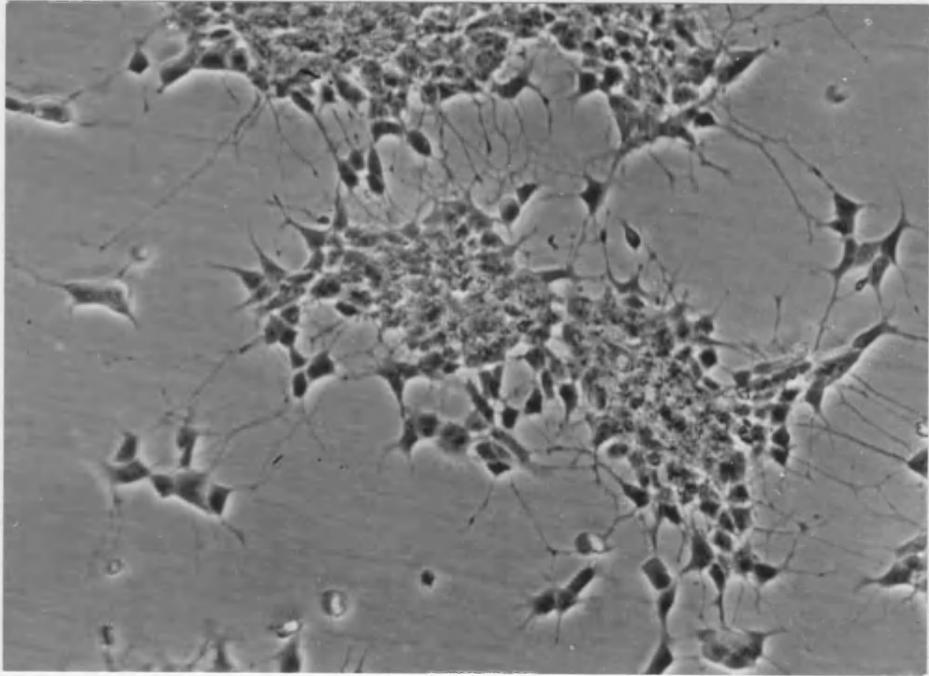
Organización del cultivo en placas, con presencia de numerosas proyecciones intercelulares de aspecto neural.

Contraste de fase 10 X.

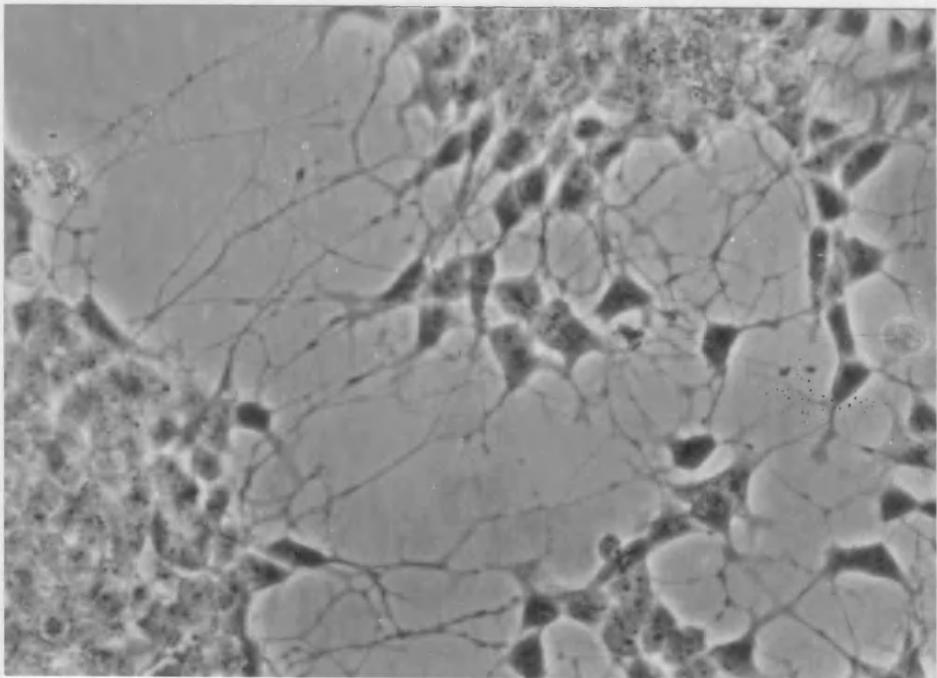
Figura 6. Neuroblastoma (línea celular IMR-32).

Detalle de un grupo de células tumorales, exhibiendo una compleja trama de procesos de tipo neural. Contraste de fase

20 X.



5

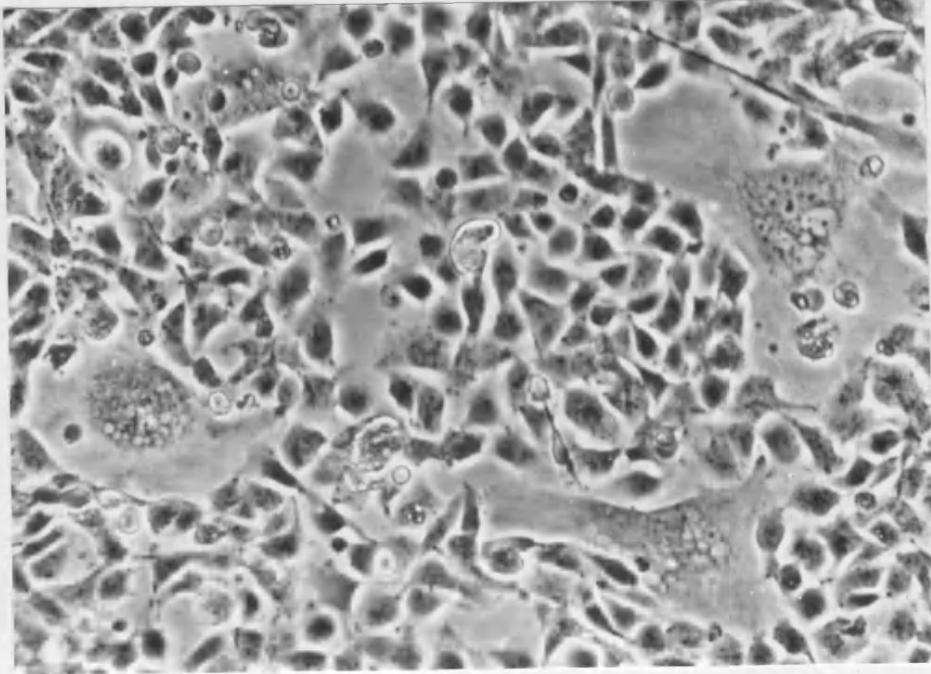


6

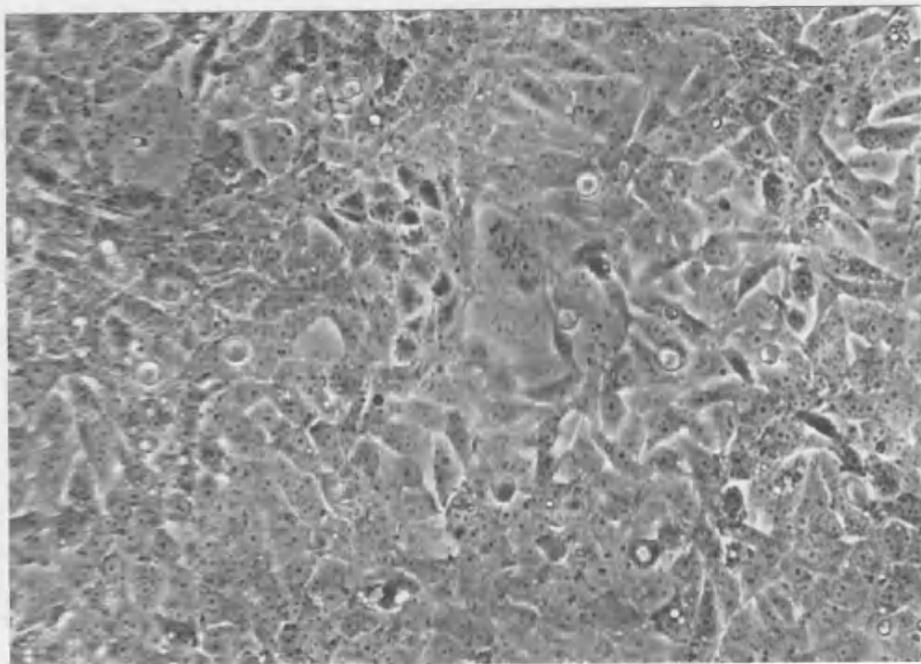
1

Figura 7. Rbdomiosarcoma (línea celular Tc 212).  
Población celular polimorfa, con células redondeadas,  
fusiformes y gigantes multinucleadas. Contraste de fase 10 X.

Figura 8. Osteosarcoma (línea celular HOS).  
Aspecto confluyente del cultivo, con una población celular  
heterogénea a base de células redondeadas y células gigantes.  
Contraste de fase 10 X.



7



8

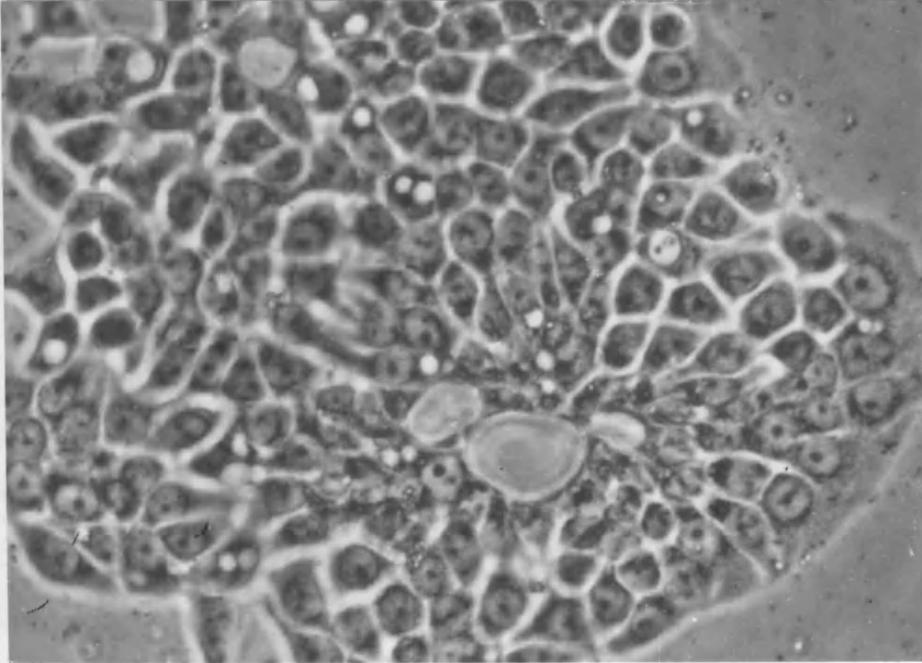
1

Figura 9. Carcinoma de colon (línea celular CC).

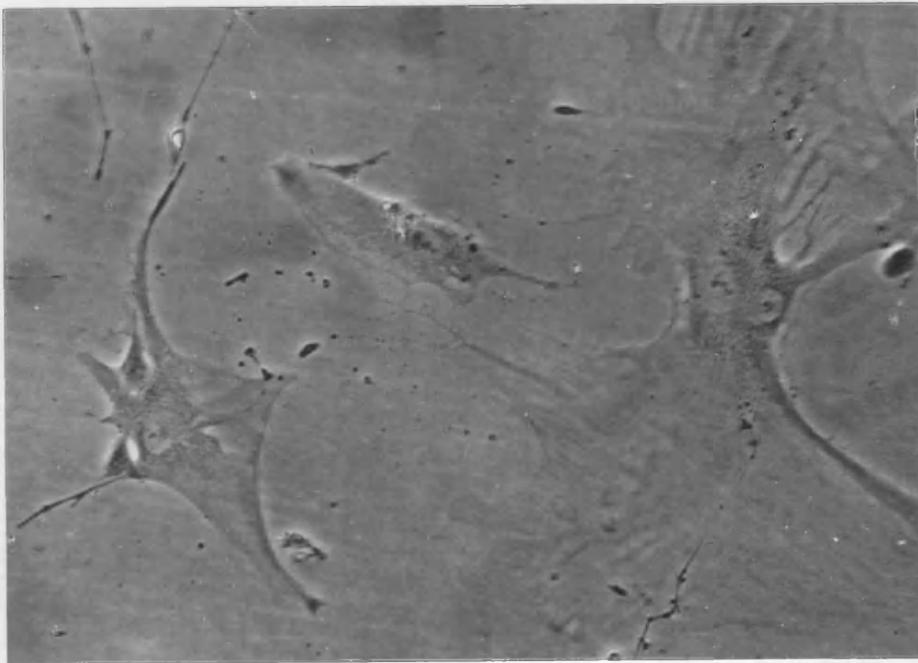
Estructura de tipo glandular constituida por células de morfología epitelial, con material de secreción. Contraste de fase 20 X.

Figura 10. Fibroblastos normales (línea celular NF).

Células mononucleadas de citoplasma amplio con prolongaciones citoplasmicas discontinuas. Contraste de fase 20 X.



9



10

## 4.2.- MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

### 4.2.1.- SARCOMA DE EWING:

#### 4.2.1.1.- Línea celular A 4573:

Esta línea celular se caracterizó ultraestructuralmente por la presencia de células tumorales principales, redondeadas, de pequeño tamaño, con un núcleo irregular, dotado de cromatina fina dispersa y uno o dos nucleolos irregulares. El citoplasma era pobre en orgánulos y tan sólo eran evidenciables algunas mitocondrias y ribosomas libres.

Junto a estas células principales, fueron detectadas células degenerativas, secundarias, y células en lisis.

No apreciamos estructuras de tipo unión intercelular ni prolongaciones de tipo neural (Figura 14.).

#### 4.2.1.2.- Línea celular Tc 71:

El examen ultraestructural de esta línea celular, se caracterizó por la presencia de células principales redondeadas, pequeñas con núcleo redondo, de cromatina dispersa y uno o dos nucleolos. El citoplasma presentaba escasas mitocondrias y ribosomas libres, así como depósitos

perinucleares de glucógeno. También se observaron células secundarias y células en lisis.

Se evidenciaron aisladas proyecciones celulares, no apreciándose gránulos neurosecretorios en su interior (Figuras 11. y 12.).

#### 4.2.1.3.- Línea celular 5838:

Caracterizada ultraestructuralmente, por células principales de núcleo elongado, con un refuerzo de la membrana nuclear, cromatina dispersa y nucleolo irregular. El citoplasma presentaba escasez de orgánulos con mitocondrias y ribosomas libres, así como amplios depósitos de glucógeno. También se observaron células degenerativas y en lisis.

Se evidenciaron prolongaciones citoplásmicas, sin gránulos ni neurofilamentos (Figura 13.).

#### 4.2.1.4.- Línea celular Tc 106:

Caracterizada por células tumorales principales, redondeadas, de pequeño tamaño, núcleo elongado de cromatina fina y nucleolo evidente. El citoplasma presentaba escasos orgánulos y no se evidenciaron prolongaciones de tipo neural.

En resumen, el estudio ultraestructural de las cuatro líneas celulares de sarcoma de Ewing, reveló una población tumoral de carácter inmaduro con escasez de orgánulos, sin ningún signo de diferenciación en sentido vascular o neural.

#### 4.2.2.- NEUROEPITELIOMA PERIFERICO:

##### 4.2.2.1.- Línea celular Tc 32:

El estudio ultraestructural demostró la presencia de células tumorales, de mayor tamaño a las observadas en el sarcoma de Ewing, de morfología redondeada o ligeramente elongada. El núcleo era más irregular, con escotaduras e invaginaciones de la membrana. La cromatina era grumosa, apreciándose uno o dos nucleolos irregulares de localización central. El citoplasma era más rico en orgánulos, con ribosomas libres, mitocondrias y cisternas de REI.

Se observaron algunas prolongaciones citoplasmicas de caracter abortivo sin gránulos neurosecretores (Figuras 15. y 17.).

##### 4.2.2.2.- Línea celular Tc 248:

Ultraestructuralmente caracterizada por células tumorales de mediano tamaño, núcleo irregular, cromatina grumosa y nucleolo evidente. El citoplasma contenía abundantes orgánulos del tipo mitocondria, ribosomas libres y REI.

Se observaron proyecciones citoplasmicas, en cuyo interior eran visibles aislados gránulos electrodensos de tamaños comprendidos entre 50-200 nM. tipificables como gránulos neurosecretores (Figura 18.).

#### 4.2.2.3.- Línea celular Tc 135:

El estudio ultraestructural demostró la presencia de células tumorales de mediano tamaño, núcleo irregular indentado, con invaginaciones de la membrana nuclear, cromatina grumosa y uno o dos nucleolos. El citoplasma era rico en orgánulos, con mitocondrias, REI, ribosomas y lisosomas. Se observaron aislados filamentos intermedios así como proyecciones citoplásmicas con gránulos electrodensos (Figura 16.).

En resumen, en los tres casos analizados observamos células de mayor tamaño que las descritas en el sarcoma de Ewing, con irregularidades nucleares, mayor riqueza en orgánulos y signos de carácter neural.

#### 4.2.3.- NEUROBLASTOMA:

##### 4.2.3.1.- Línea celular KCNR:

El estudio ultraestructural de esta línea, se caracterizó por células de pequeño y mediano tamaño, morfología redondeada o elongada, núcleo redondo con cromatina dispersa sin nucleolo aparente. El citoplasma presentaba mitocondrias, ribosomas, REI, y lisosomas.

Se detectaron procesos citoplasmicos con gránulos electrodensos de tipo neurosecretor ( 50-200 nM.) (Figuras 19.y 20.).

#### 4.2.3.2.- Línea celular IMR-32:

Ultraestructuralmente caracterizada por células de pequeño tamaño, núcleo redondeado, cromatina dispersa y nucleolo poco aparente. El citoplasma presentaba mitocondrias, ribosomas y lisosomas.

Se apreciaron proyecciones celulares, con gránulos electrodensos de tipo neurosecretor.

En resumen, se trataba de células de menor tamaño que las observadas en las líneas de neuroepitelioma periférico con un núcleo más regular, sin nucleolo aparente, y un citoplasma con proyecciones dotadas de gránulos neurosecretorios.

#### 4.2.4.- RABDOMIOSARCOMA:

##### 4.2.4.1.- Línea celular Tc 212:

Caracterizado ultraestructuralmente por células redondeadas y elongadas, de núcleo irregular, cromatina grumosa y nucleolo central. El citoplasma era rico en orgánulos de tipo mitocondria, ribosomas, lisosomas, REI y RER.

Se evidenciaron abundantes filamentos así como material característico del tipo banda Z (figuras 21.,22,23.

#### 4.2.5.- OSTEOSARCOMA:

##### 4.2.5.1.- Línea celular HOS:

La ultraestructura demostró células tumorales de distintos tamaños, con núcleo irregular de cromatina rugosa y nucleolo evidente. El citoplasma era rico en ribosomas, RER, lisosomas y material fibrilar intracelular.

#### 4.2.6.- CARCINOMA DE COLON:

##### 4.2.6.1.- Línea celular CC:

Caracterizado ultraestructuralmente por células de mediano tamaño, contornos afacetados, proyecciones digitiformes de la membrana plasmática, núcleo redondeado de cromatina grumosa, nucleolo poco evidente y citoplasma rico en mitocondrias, REL, RER, lisosomas, ribosomas y material de secreción dispuesto en vacuolas.

Se observaron uniones estrechas intercelulares, así como pseudoluces inter e intracelulares (Figura 24.).

#### 4.2.7.- FIBROBLASTOS NORMALES:

##### 4.2.7.1.- Línea celular NF:

El estudio ultraestructural demostró una población celular predominante constituida por elementos fusiformes, de

núcleo oval, cromatina fina y nucleolo redondeado central. El citoplasma era elongado con mitocondrias, ribosomas, y REI.

Se observó la presencia de material fibrilar intracitoplasmico aunque en nuestro caso no detectamos colágeno organizado.

En la tabla número 2 aparecen remarcadas las principales características ultraestructurales de las distintas líneas analizadas.

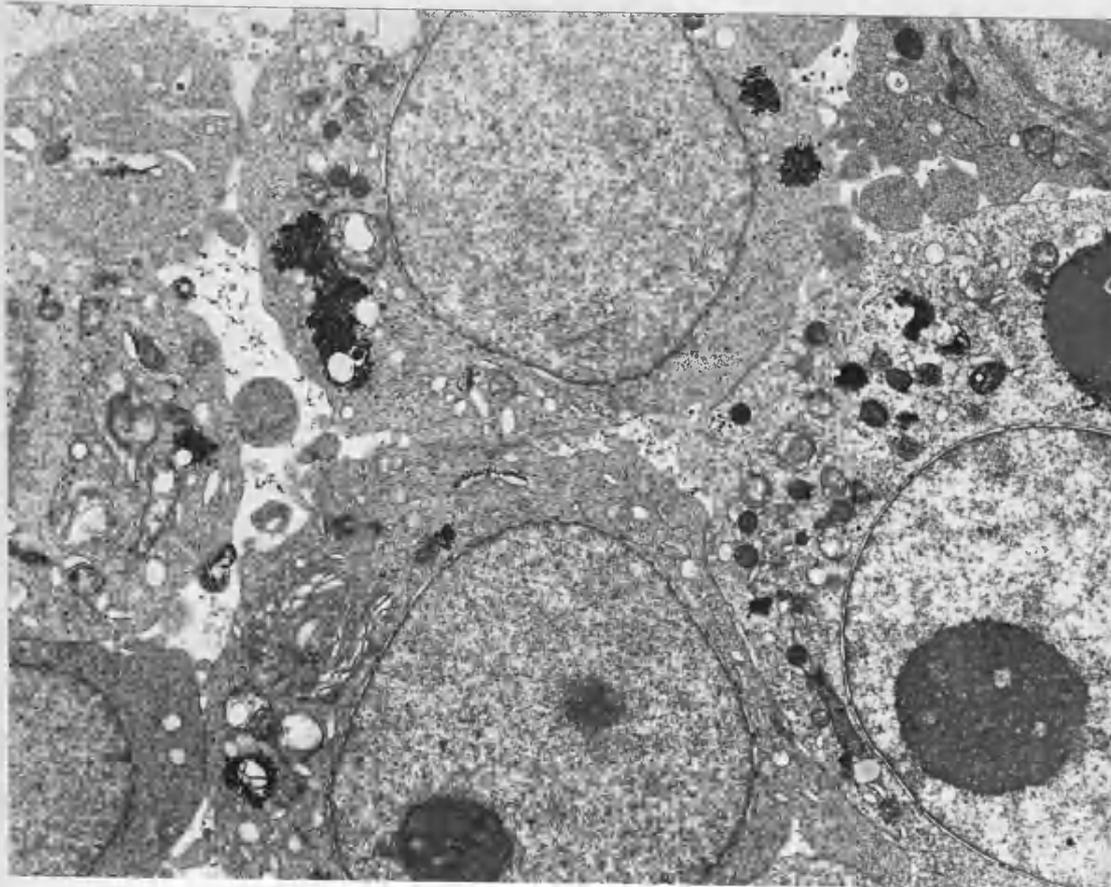
## MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION

Lineas celulares	S. EWING	NEUROEPITELIOMA	NEUROBLASTOMA	RABDOMIOSARCOMA
<b>Nucleo</b>	redondeado	elongado	redondeado	irregular
<b>Orgánulos</b>	escasos	abundantes	abundantes	abundantes
<b>Glucógeno</b>	abundante	escaso	ausente	ausente
<b>Filamentos</b>	ausentes	escasos	escasos	abundantes
<b>Gránulos neurosecretorios</b>	ausentes	escasos	abundantes	ausentes
<b>Banda Z</b>	ausente	ausente	ausente	abundante

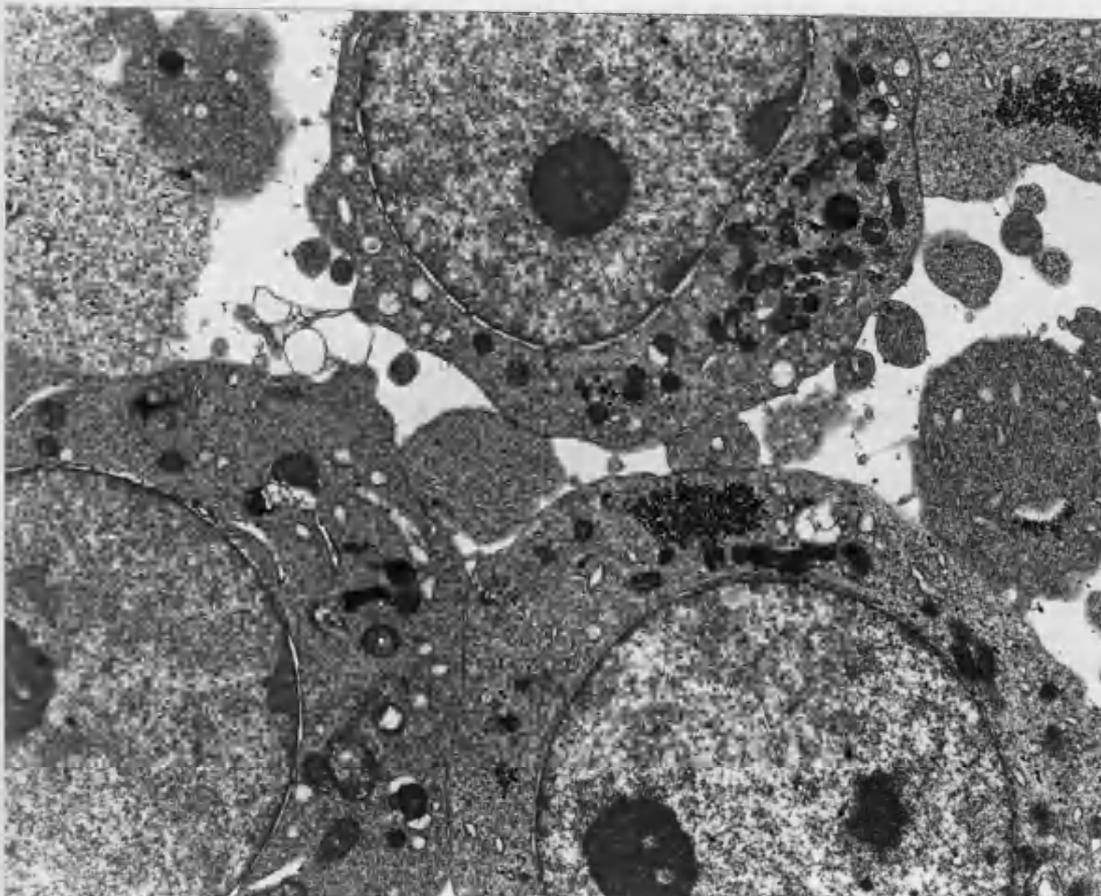
TABLA 2.- Cuadro-resumen de las principales características ultraestructurales.

Figura 11. Sarcoma de Ewing (línea celular Tc 71).  
Células tumorales inmaduras, redondeadas con escasos orgánulos y aislados acúmulos de glucógeno. M.E. 11.700 X.

Figura 12. Sarcoma de Ewing (línea celular Tc 71).  
Imagen similar a la anterior: Celulas tumorales inmaduras. Observe la presencia de proyecciones abortivas sin gránulos, cortadas transversalmente. M.E. 11.700 X.



11



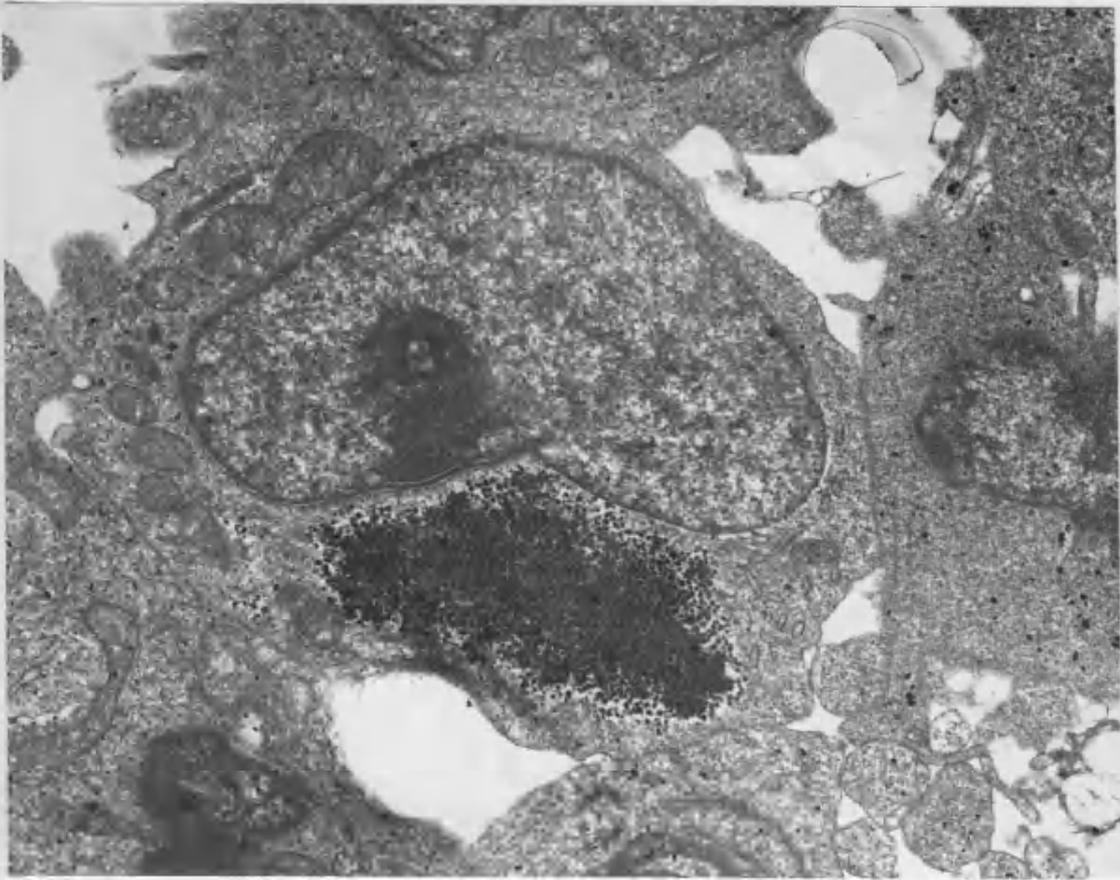
12

Figura 13. Sarcoma de Ewing (línea celular 5838).

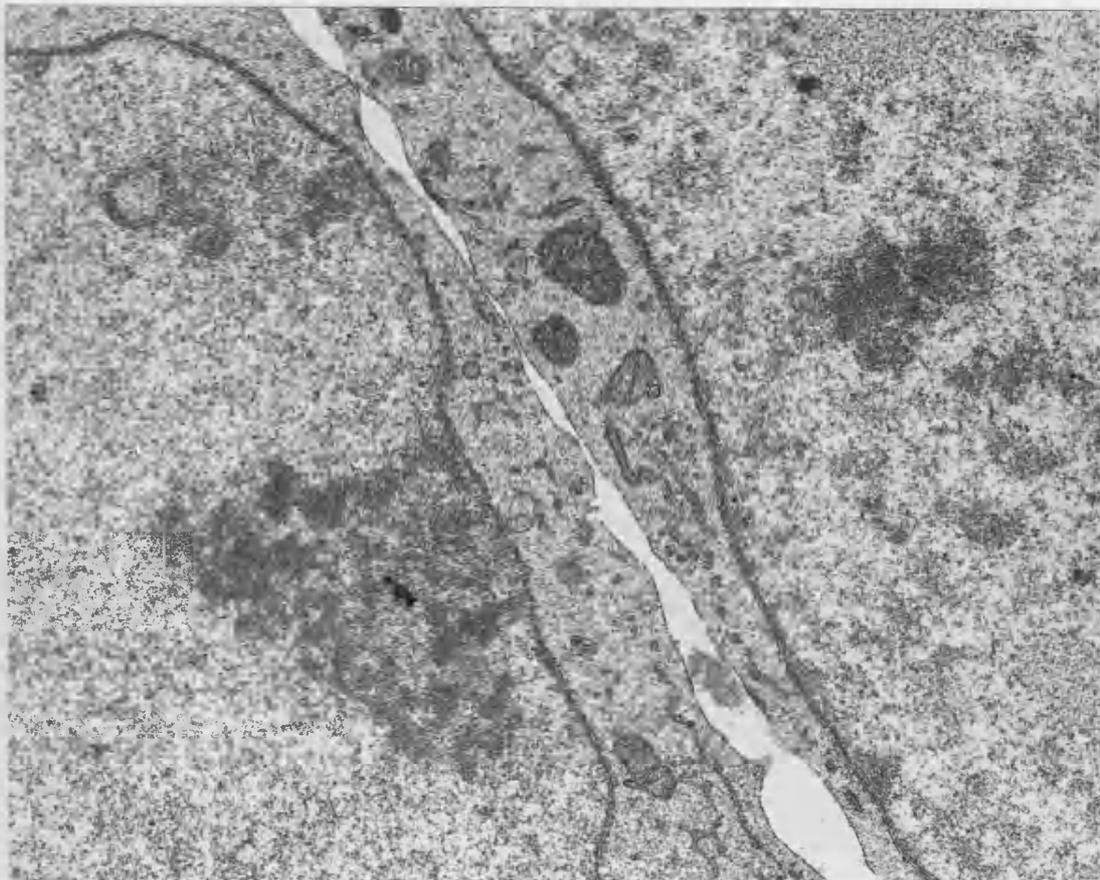
Célula principal inmadura cargada de glucógeno, con escasos orgánulos y refuerzo de la membrana nuclear, junto a células degenerativas. M.E. 11.700 X.

Figura 14. Sarcoma de Ewing (línea celular 4573).

Detalle citoplásmico con presencia de escasos orgánulos.  
M.E. 20.000 X.



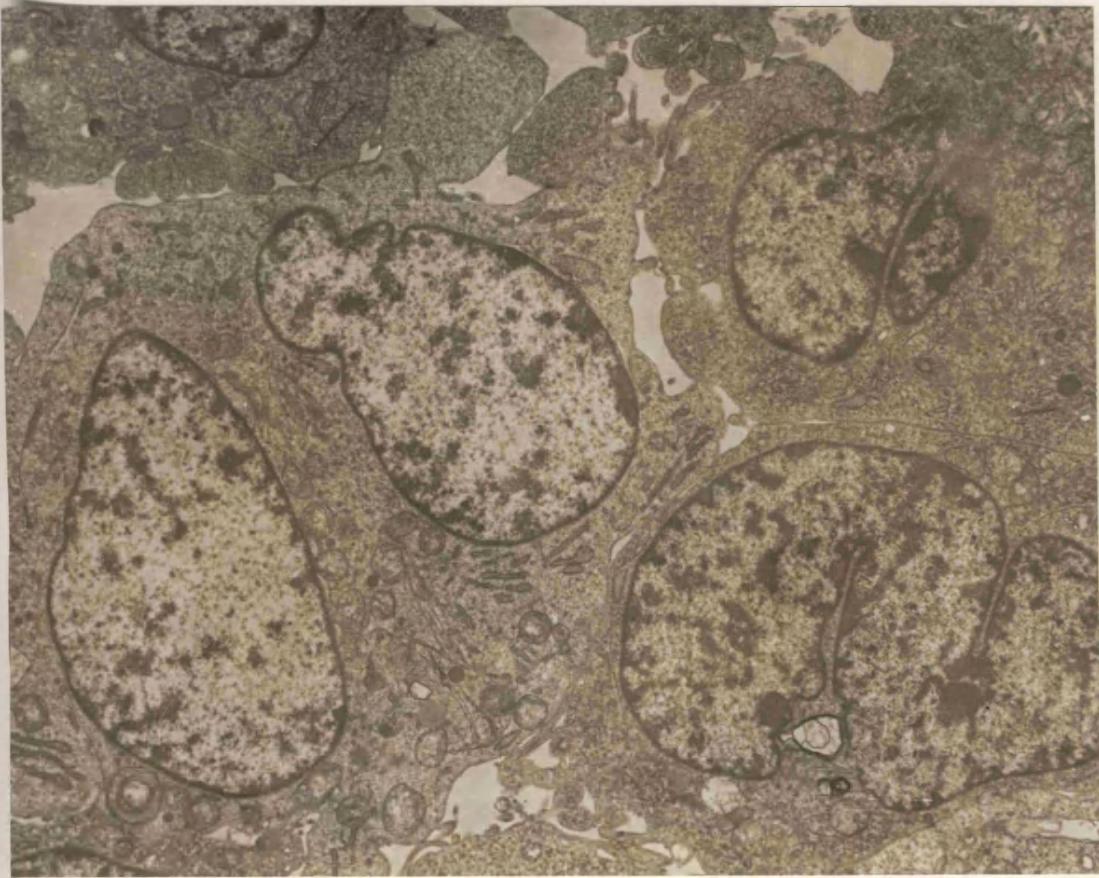
13



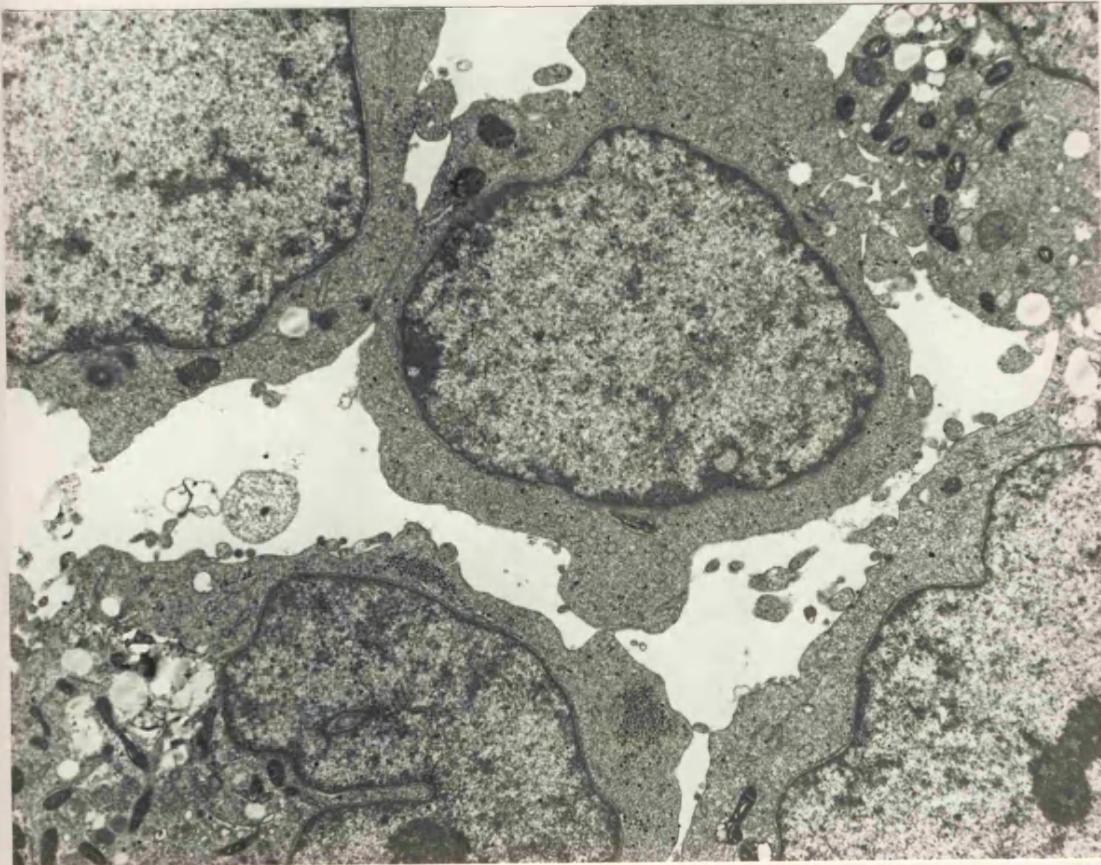
14

Figura 15. Neuroepitelioma periférico (línea celular Tc 32)  
Células tumorales de núcleo elongado con escotaduras y  
cromatina grumosa. M.E. 12.480 X.

Figura 16. Neuroepitelioma periférico (línea celular Tc 135)  
Células tumorales dotadas de núcleo irregular y nucleolo  
evidente. M.E. 7.800 X.



15

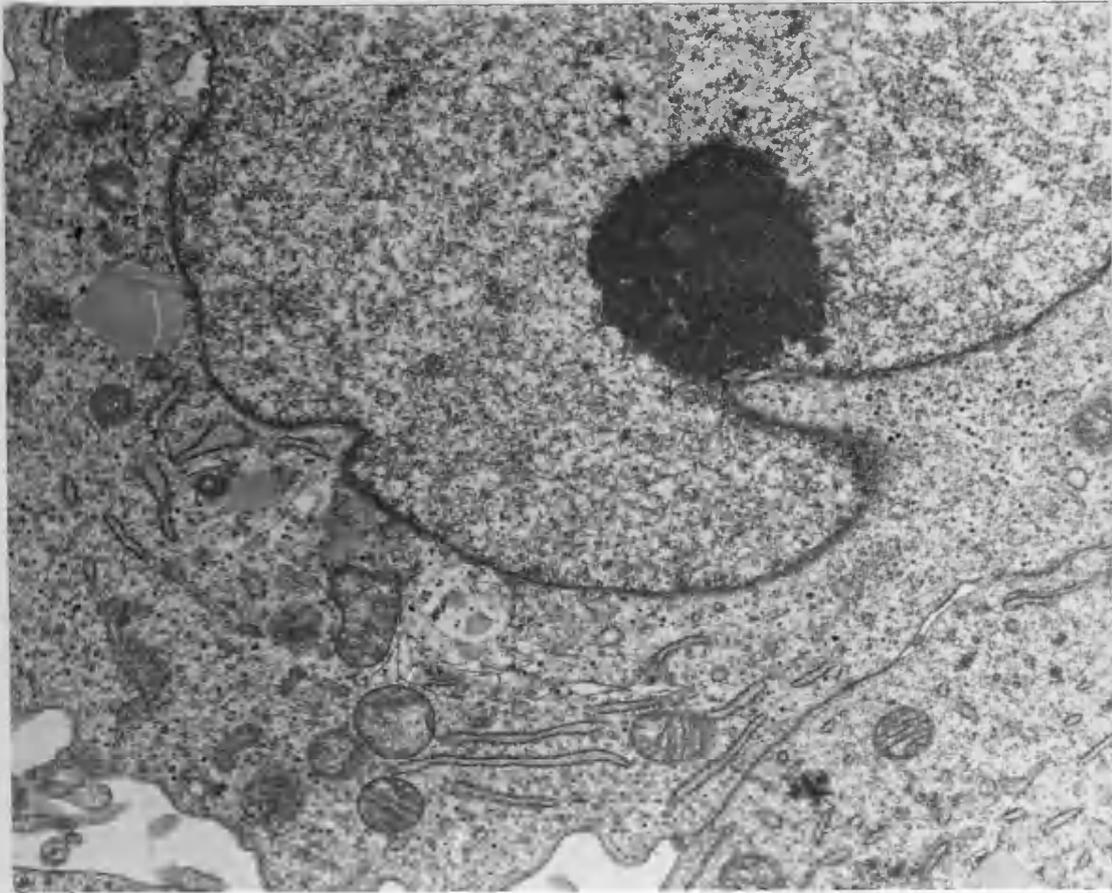


16

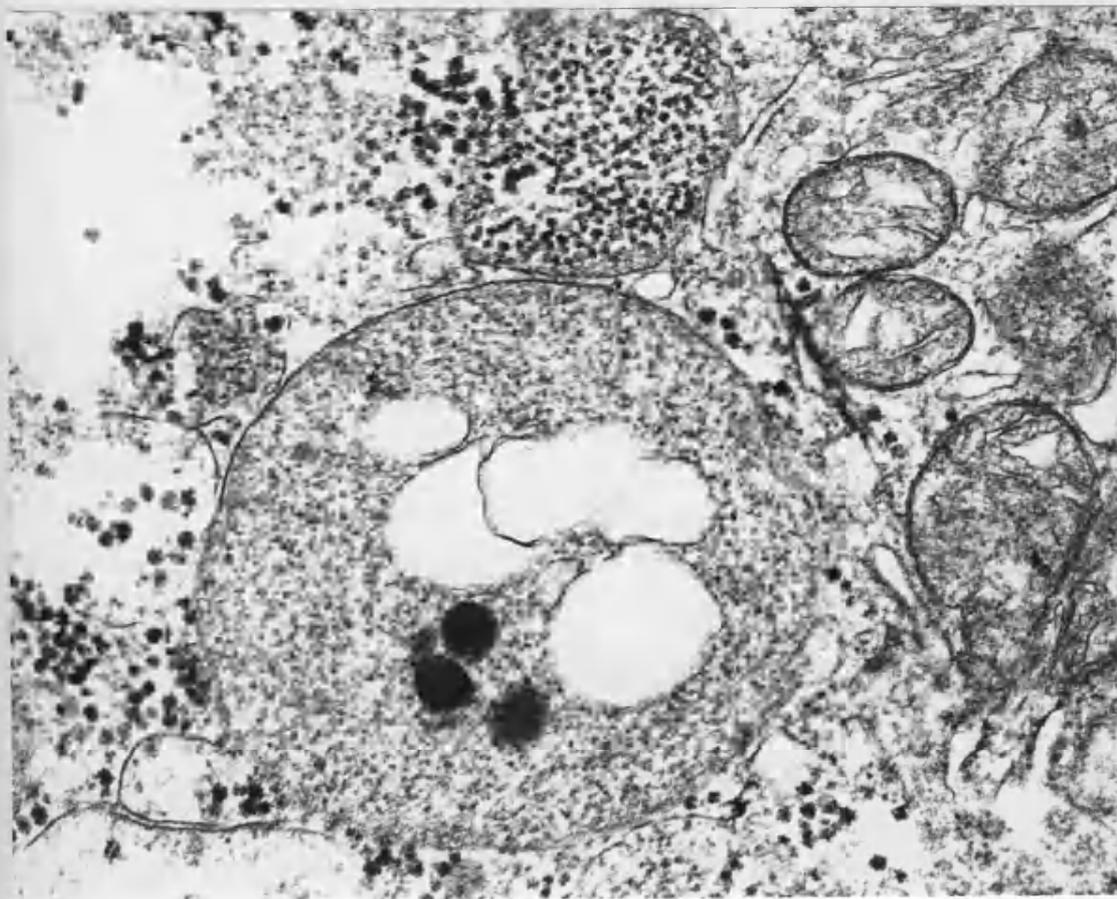
1

Figura 17. Neuroepitelioma periférico (línea celular Tc 32).  
Célula tumoral con núcleo irregular, nucleolo evidente y  
citoplasma con mitocondrias y REI. M.E. 15.600 X.

Figura 18. Neuroepitelioma periférico (línea Tc 248).  
Magnificación de un proceso citoplasmico cortado  
transversalmente con presencia de gránulos electrodensos.  
M.E. 39.000 X.



17



18

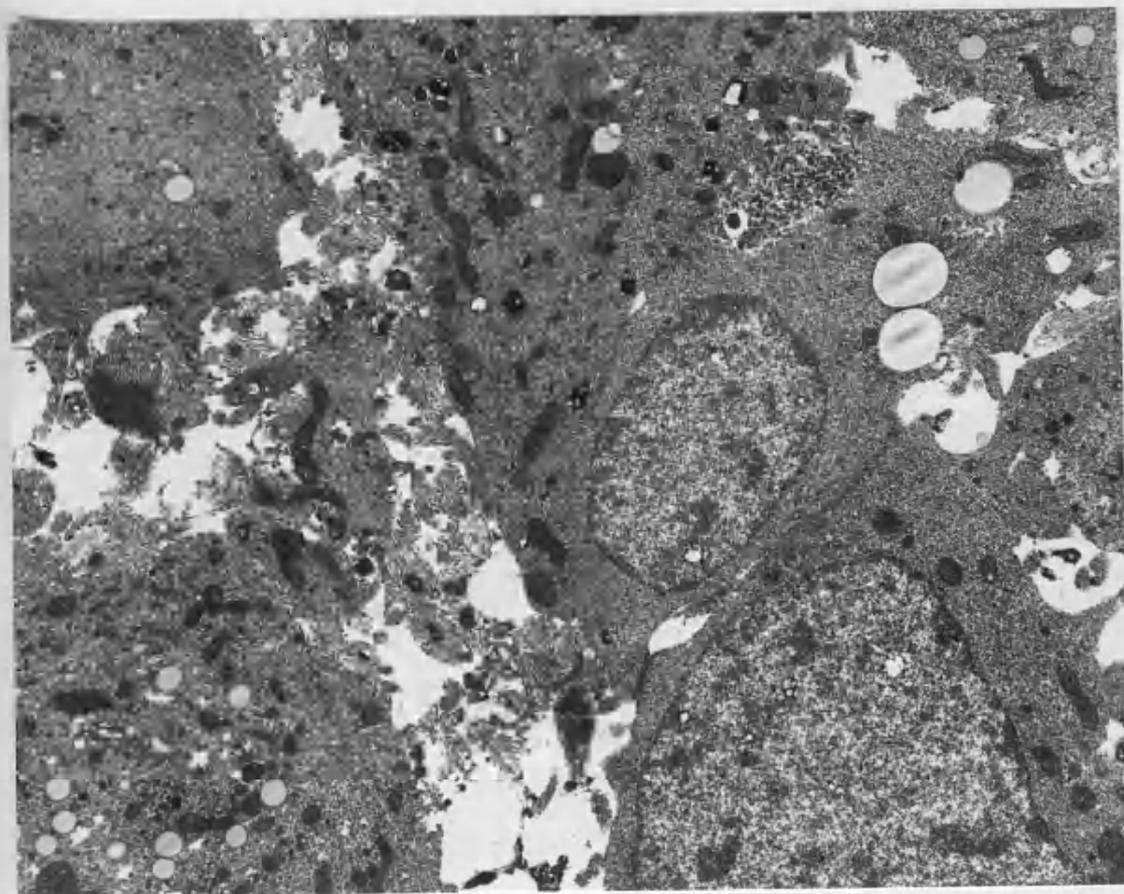
1

Figura 19. Neuroblastoma (línea celular KCNR).

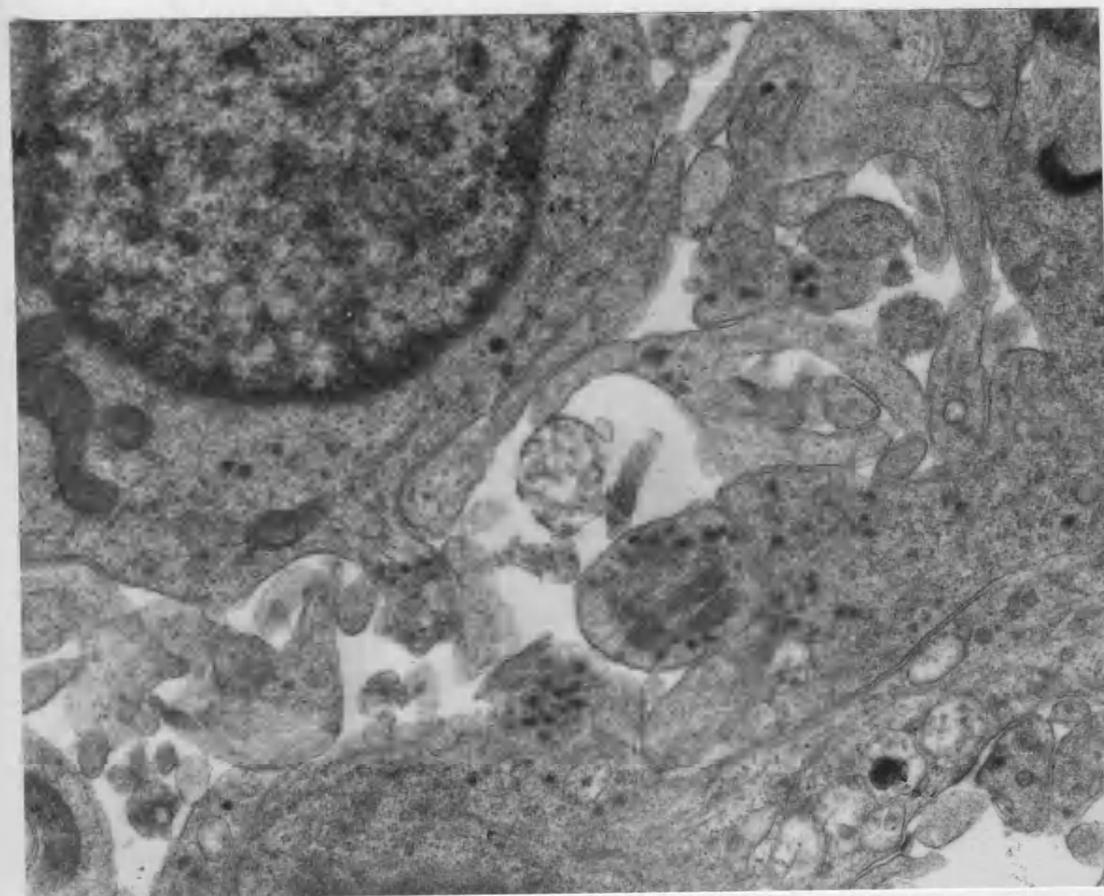
Células tumorales de núcleo oval, y citoplasma con prolongaciones y gran riqueza en mitocondrias. M.E. 9.250 X.

Figura 20. Neuroblastoma (línea celular KCNR).

Detalle de prolongaciones citoplasmicas dotadas de gránulos electrodensos. M.E. 26.000 X.



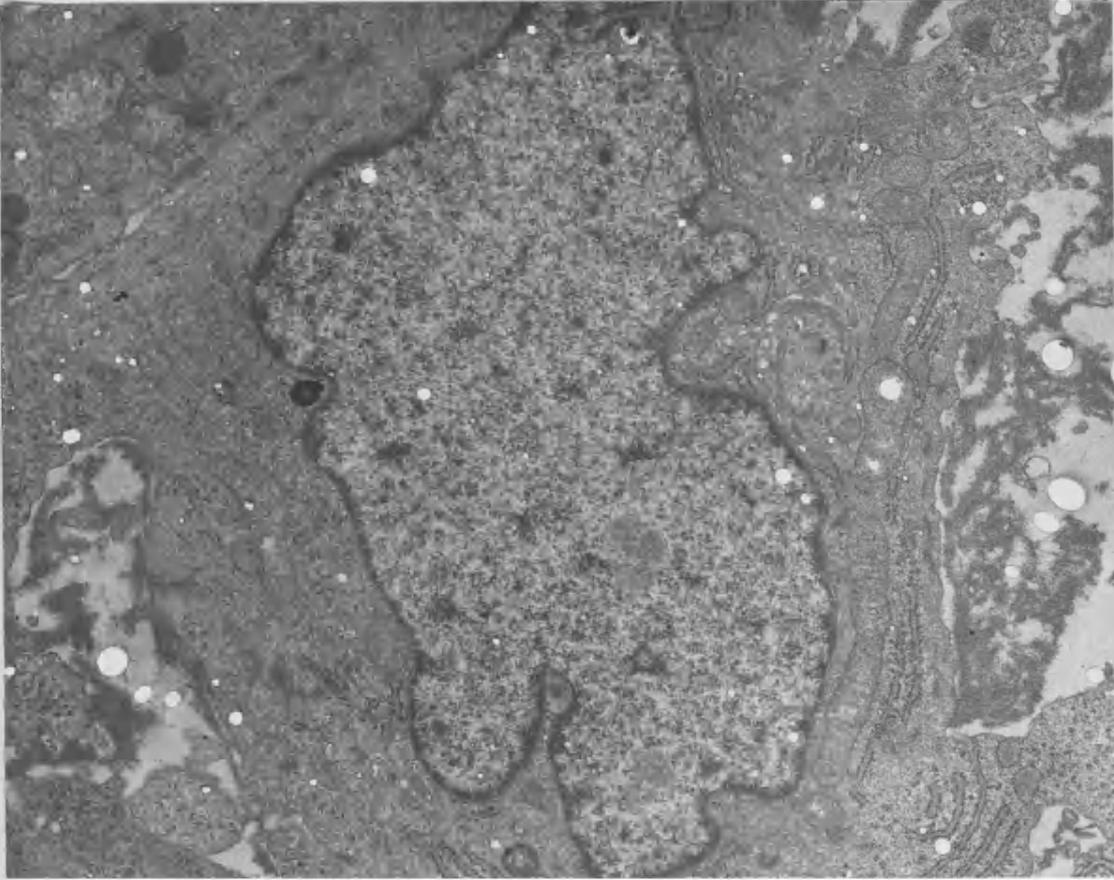
19



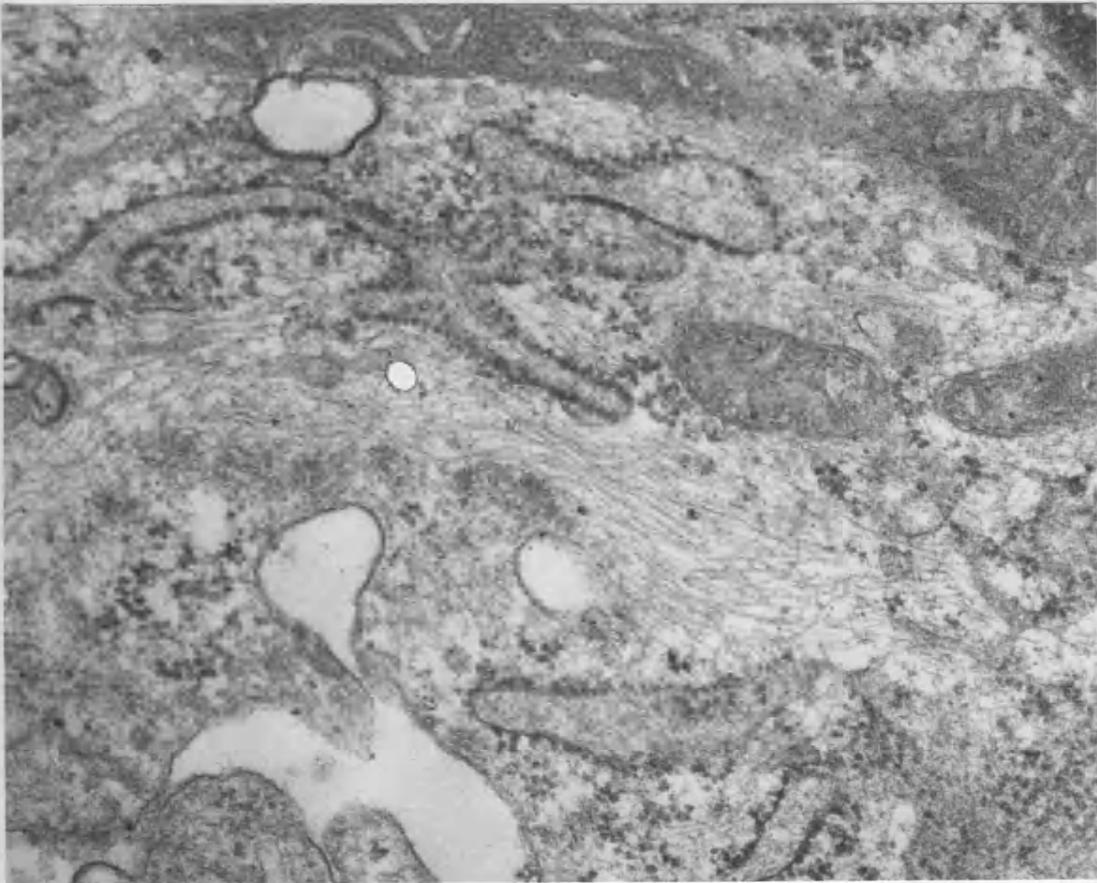
20

Figura 21. Rabdomiosarcoma (línea celular Tc 212).  
Célula tumoral de núcleo irregular y citoplasma rico en  
orgánulos. M.E. 15.600 X.

Figura 22. Rabdomiosarcoma (línea celular Tc 212).  
Detalle citoplasmico observandose una amplia red de  
filamentos. M.E. 26.000 X.



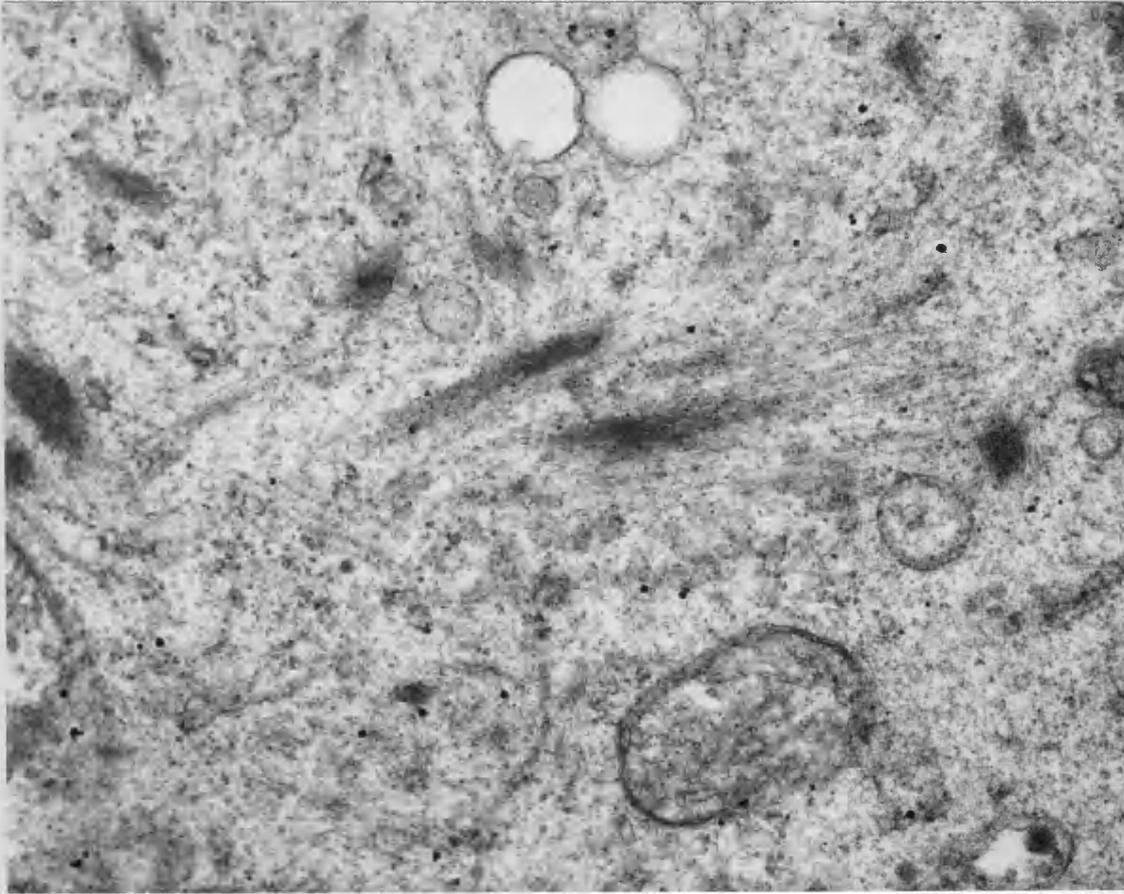
21



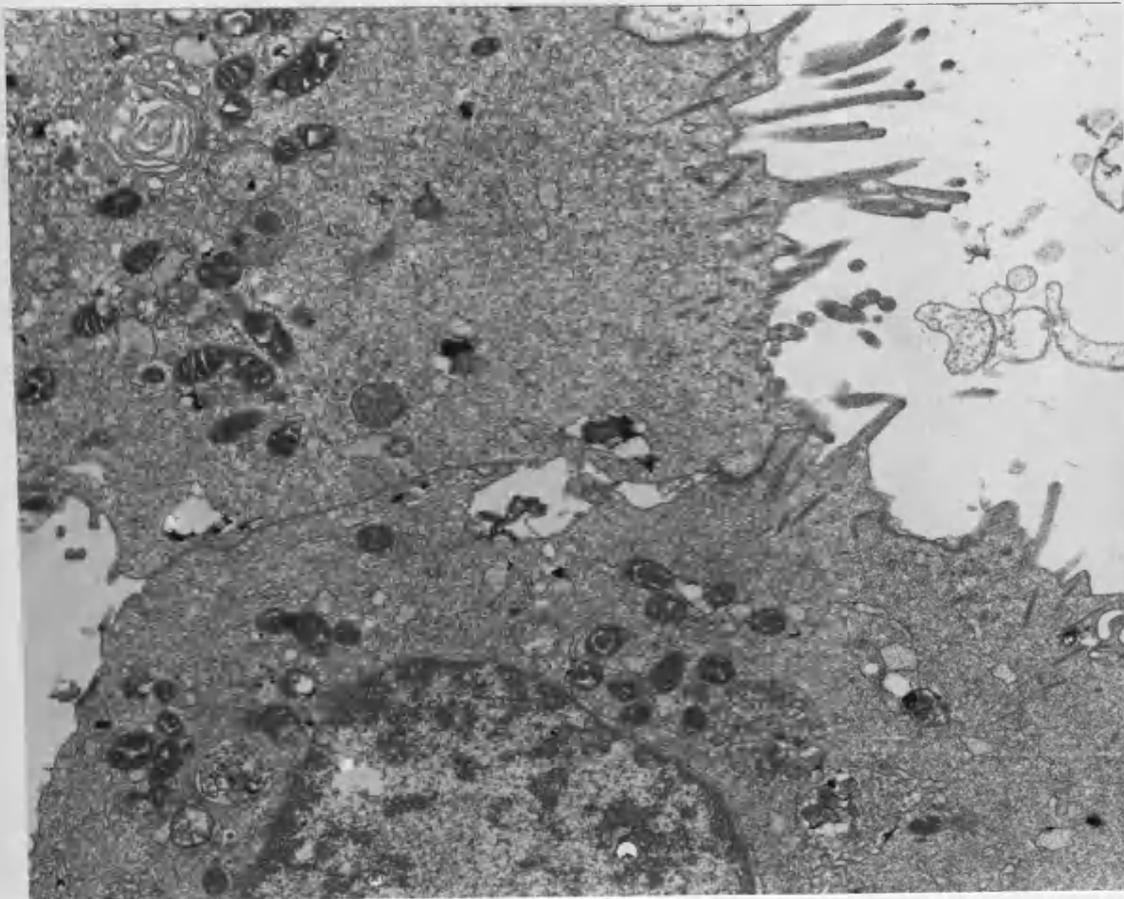
22

Figura 23. Rbdomiosarcoma (línea celular Tc 212).  
Detalle citoplasmico. Presencia de material fibrilar  
organizado tipo banda Z. M.E. 30.000 X.

Figura 24. Carcinoma de colon (línea celular CC).  
Células tumorales de amplio citoplasma con material de  
secreción, pseudoluces intercelulares y proyecciones  
digitiformes de la membrana plasmatica. M.E. 18.200 X.



23



24

#### 4.3.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Para realizar este estudio, utilizamos antisueros para detectar queratina, vimentina, HNK-1 y neurofilamentos 160 y 200 Kd.

Cuando el antígeno a demostrar fué la queratina, usamos como control positivo la línea de carcinoma de colon y como control negativo la línea de osteosarcoma.

En el caso de la vimentina, el control positivo fué el cultivo celular de fibroblastos normales y como control negativo usamos la línea de carcinoma de colon.

Respecto a los neurofilamentos y HNK-1, prescindimos de controles positivos y utilizamos unicamente controles negativos a partir de las líneas de rhabdomyosarcoma y osteosarcoma.

##### 4.3.1.- SARCOMA DE EWING:

##### 4.3.1.1.- Línea celular A 4573:

La reactividad de dicha línea frente a la antiqueratina EA1-EA3, fué focal. Aisladas células tumorales, mostraban una positividad citoplasmica perinuclear de tipo granular menos

intensa que la detectada a nivel del control positivo; No obstante, la mayor parte de células fueron negativas a dicho marcador.

Frente a la antivimentina, se observó intensa reactividad en la mayoría de células tumorales. La fluorescencia era intensa y localizada a nivel citoplasmico.

Cuando el marcador utilizado fué HNK-1, la positividad fué focal con localización citoplasmica y membranosa.

Frente a neurofilamentos, la reactividad fué focal, citoplasmica y granular. En ningun campo observamos fluorescencia nuclear (Figura 27.).

#### 4.3.1.2.- Línea celular Tc 71:

Cuando el marcador utilizado fué la queratina, no detectamos fluorescencia en las células tumorales, siendo comparable el resultado al obtenido con el control negativo (HOS).

Observamos una clara positividad con la vimentina. La fluorescencia se localizaba a nivel citoplasmico, con una intensidad menor a la detectada en el control positivo (NF).

Frente a HNK-1, la mayoría de las células tumorales presentaron fluorescencia tanto a nivel citoplasmico como en las prolongaciones celulares.

Cuando el antígeno a demostrar fué la subunidad 200 Kd. de los neurofilamentos, observamos fluorescencia moderada a nivel citoplasmico y de las prolongaciones. En el caso de la subunidad 160 Kd, la intensidad fué superior, localizandose a nivel citoplasmico, siendo también cierta impregnación

nuclear (Figuras 25., 28.y 29).

#### 4.3.1.3.- Línea celular 5838:

La reactividad inmunohistoquímica frente a la queratina, fué debil y de localización citoplasmica en aisladas células tumorales.

Frente a vimentina, detectamos fluorescencia citoplasmica difusa en la mayoría de las células neoplasicas.

La detección de HNK-1, fué focal, y frente a neurofilamentos 160 Kd, observamos débil positividad citoplasmica en aisladas células. Frente a la subunidad 200 Kd, no detectamos ninguna reactividad (Figura 26.).

#### 4.3.1.4.- Línea celular Tc 106:

Con esta línea no detectamos positividad frente a queratina.

La reactividad frente a vimentina, fué débil y difusa a nivel citoplasmico.

Aisladas células tumorales presentaron reactividad frente al HNK-1.

Frente a neurofilamentos, observamos focal fluorescencia citoplasmica cuando estudiamos la subunidad 160 Kd. No detectamos reactividad cuando el antígeno a demostrar fué la subunidad 200 Kd.

#### 4.3.2.- NEUROEPITELIOMA PERIFERICO:

##### 4.3.2.1.- Línea celular Tc 32:

Quando utilizamos el anticuerpo monoclonal antiqueratina EA1-EA3, observamos una fluorescencia focal a nivel citoplasmico de tipo granular.

La vimentina fué facilmente detectada, debido a la intensa fluorescencia citoplasmica en la mayoría de las células tumorales.

Con HNK-1, observamos focal fluorescencia citoplasmica y de membrana.

El estudio inmunohistoquímico de las dos subunidades de los neurofilamentos, demostró una fluorescencia focal de localización citoplasmica (Figuras 31.y 33.).

##### 4.3.2.2.- Línea celular Tc 248:

La reactividad frente a la queratina, fué detectada por una fluorescencia focal y citoplasmica, presente en aisladas células.

Quando utilizamos antivimentina, también detectamos algunas células positivas.

Frente a HNK-1, observamos una fluorescencia citoplasmica y membranosa con caracter focal.

En el caso de los neurofilamentos, también se detectó una reactividad focal en aislados grupos celulares (Figuras 30. y 34.).

#### 4.3.2.3.- Línea celular Tc 135:

Los resultados fueron superponibles a las dos líneas anteriores. Es decir, reactividad citoplasmica focal frente a queratina, vimentina, y neurofilamentos. HNK-1 fué demostrado a nivel citoplasmico y de membrana celular (Figura 32.).

#### 4.3.3.- NEUROBLASTOMA:

##### 4.3.3.1.- Línea celular KCNR:

En dicha línea celular, no detectamos reactividad inmunohistoquímica frente a la queratina, sin embargo, la fluorescencia citoplasmica fué intensa y difusa cuando el antígeno a demostrar fué la vimentina.

Fué evidente la reactividad citoplasmica y membranosa cuando utilizamos HNK-1. Dicho marcador fué también positivo a nivel de las prolongaciones neurales.

Las dos subunidades de los neurofilamentos, fueron puestas de manifiesto gracias a una intensa fluorescencia presente en el citoplasma y en las prolongaciones neurales (Figuras 36., 37., 38.).

##### 4.3.3.2.- Línea celular IMR-32:

Esta línea celular se caracterizó inmunohistoquímicamente por la ausencia de reactividad frente a queratina y al igual que en el caso anterior por la

presencia de una intensa fluorescencia citoplasmica frente a vimentina.

Los resultados frente a HNK-1 y neurofilamentos, fueron superponibles a los de la línea celular KCNR (Figura 35.).

#### 4.3.4.- RABDOMIOSARCOMA:

##### 4.3.4.1.- Línea celular Tc 212:

Esta línea sólo fué utilizada como control negativo en el caso de la demostración de neurofilamentos, no detectandose reactividad celular.

#### 4.3.5.- OSTEOSARCOMA:

##### 4.3.5.1.- Línea celular HOS:

Esta línea fué utilizada como control negativo cuando tratamos de demostrar queratina y HNK-1. En estos casos fué evidente la ausencia de reactividad celular (Figura 39.).

#### 4.3.6.- CARCINOMA DE COLON:

##### 4.3.6.1.- Línea celular CC:

Utilizada como control positivo para la demostración de queratina. En este caso, se detectó una fluorescencia intensa perinuclear en la mayor parte de células tumorales.

Esta línea celular también nos sirvió como control

negativo cuando estudiamos la vimentina, no apreciándose reactividad celular.

#### 4.3.7.- FIBROBLASTOS NORMALES:

##### 4.3.7.1.- Línea celular NF:

Utilizada como control positivo para la demostración de vimentina, observándose intensa fluorescencia citoplasmica en la mayoría de las células del cultivo (Figura 40.).

En la tabla número 3 podemos observar un resumen de los resultados inmunohistoquímicos.

## INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Lineas celulares	S. EWING	NEUROEPITELIOMA	NEUROBLASTOMA	RABDOMIOSARCOMA
<b>Citoqueratina EA1-EA3</b>	+	+	-	-
<b>Vimentina</b>	+++	++	++	+
<b>NF 160 Kd</b>	+	+	+++	-
<b>NF 200 Kd</b>	+	+	+++	-
<b>HNK-1</b>	+	+	+++	-

**TABLA 3.-** Cuadro-resumen de las principales características inmunohistoquímicas.

1

Figura 25. Sarcoma de Ewing (línea celular Tc 71).

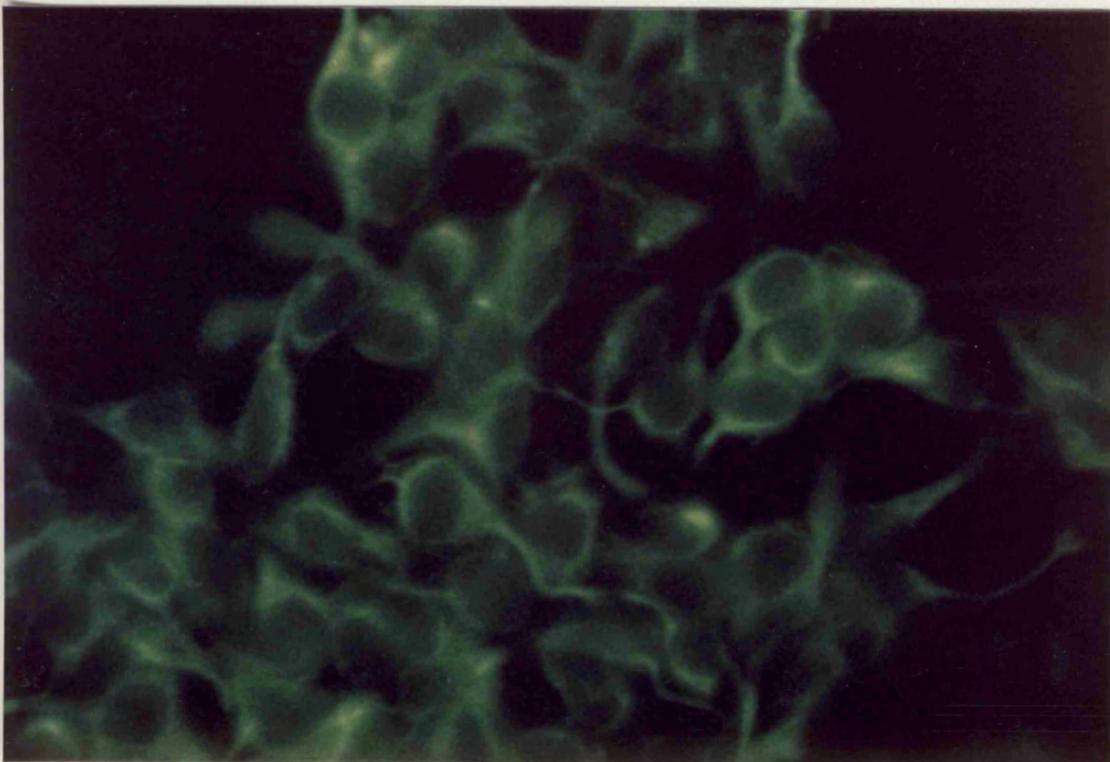
Inmunofluorescencia indirecta frente a queratina. Observese la focal fluorescencia citoplasmica de caracter granular. 40 X.

Figura 26. Sarcoma de Ewing (línea celular 5838).

Inmunofluorescencia frente a vimentina. Vease la reactividad difusa citoplasmica de las células tumorales. 40 X.



25



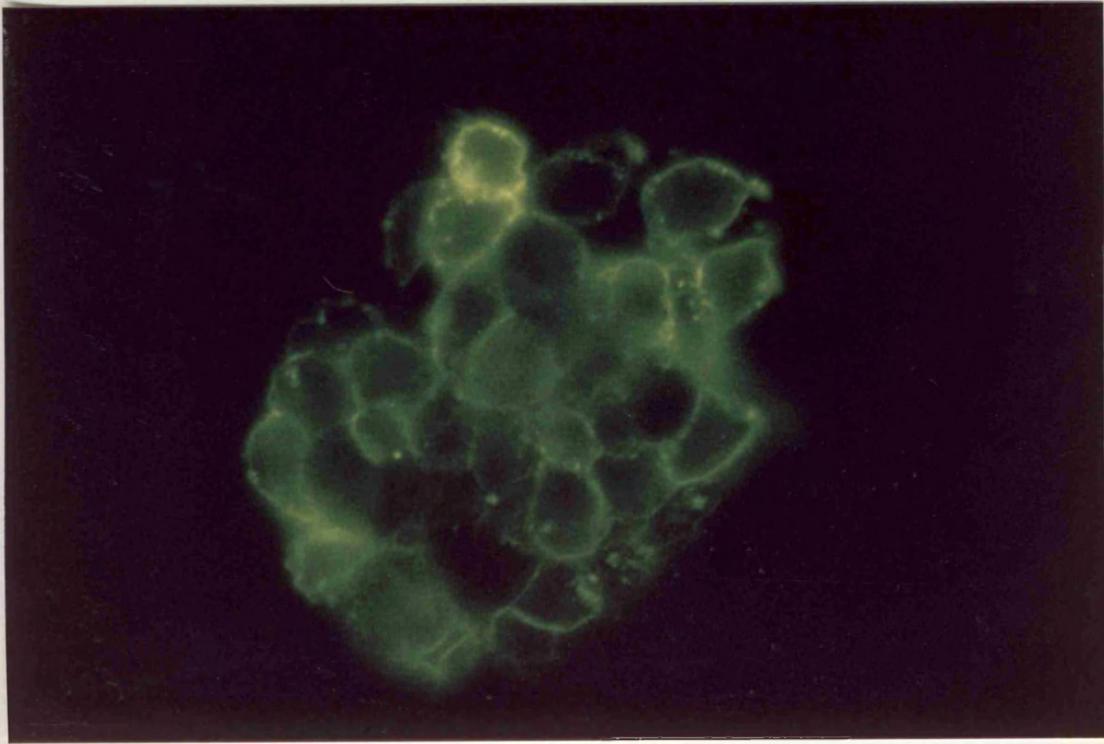
26

Figura 27. Sarcoma de Ewing (línea celular A 4573).

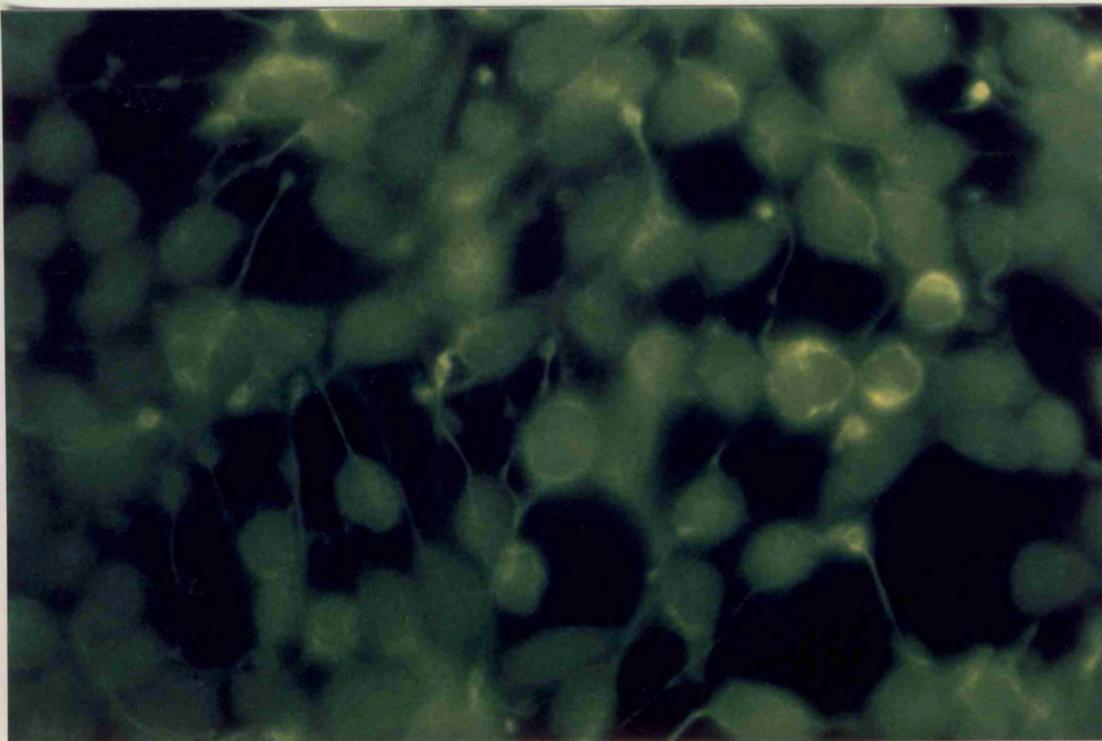
Estudio inmunohistoquímico con HNK-1. La fluorescencia es intensa y de localización citoplasmica y membranosa. 40 X.

Figura 28. Sarcoma de Ewing (línea celular Tc 71).

Inmunofluorescencia frente a neurofilamentos 200 Kd. La reactividad se aprecia a nivel citoplasmico y de las prolongaciones. 40 X.



27



28

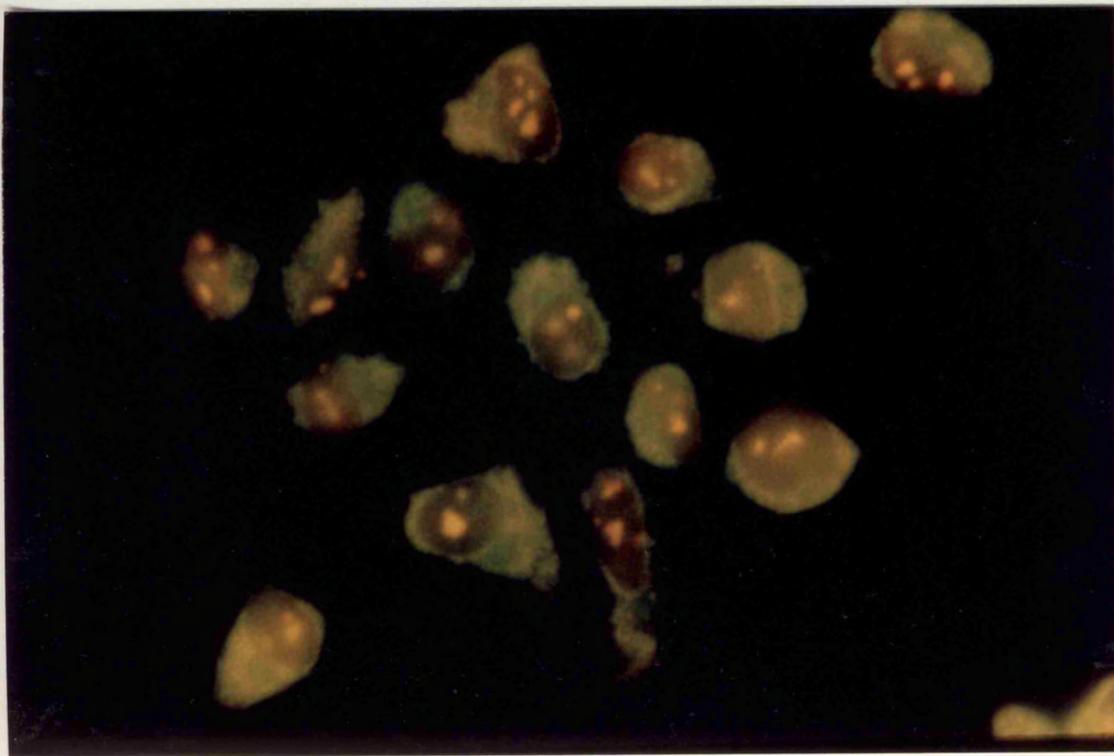
1

Figura 29. Sarcoma de Ewing (línea celular Tc 71).

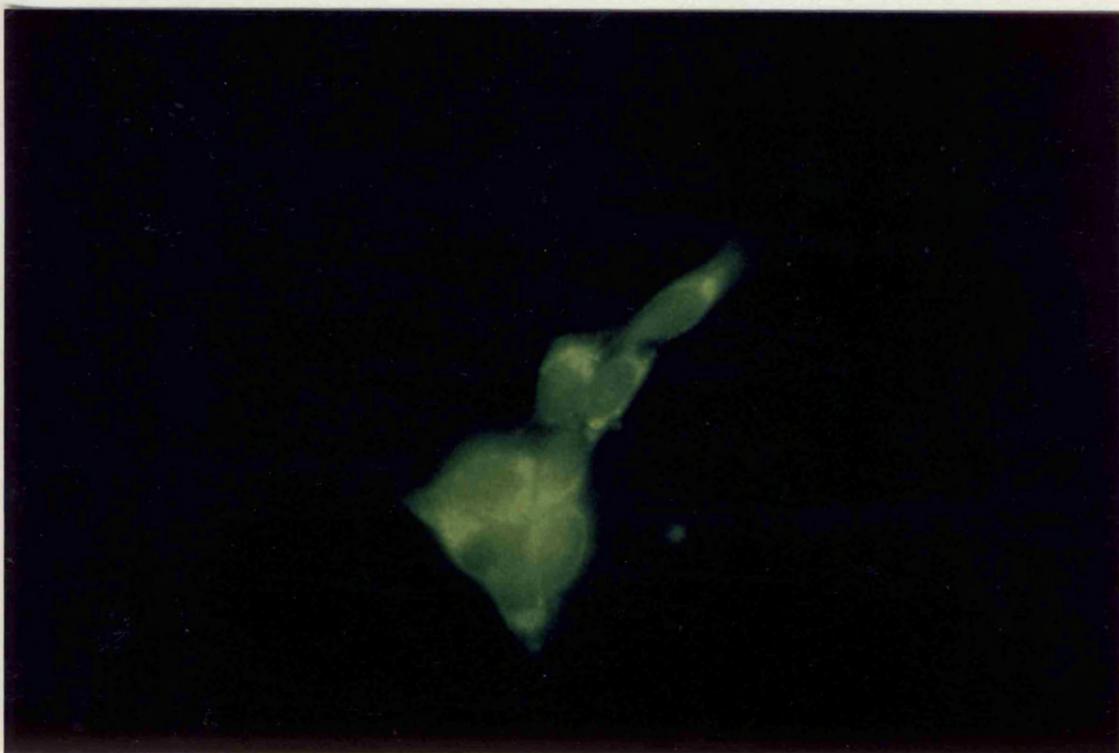
Inmunofluorescencia frente a neurofilamentos 160 Kd.  
Reactividad citoplasmica intensa con cierta impregnación  
nuclear. 40 X.

Figura 30. Neuroepitelioma periférico (línea celular Tc 248)

Demostración de queratina con fluorescencia citoplasmica  
focal perinuclear. 40 X.



29

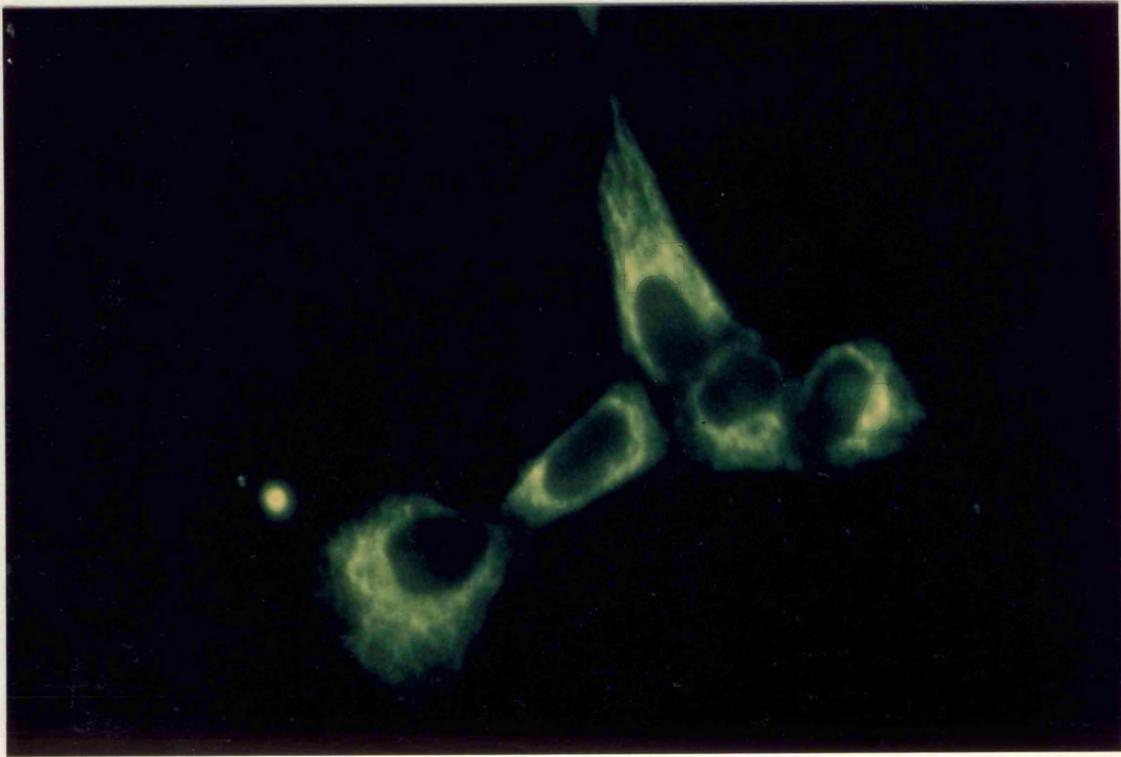


30

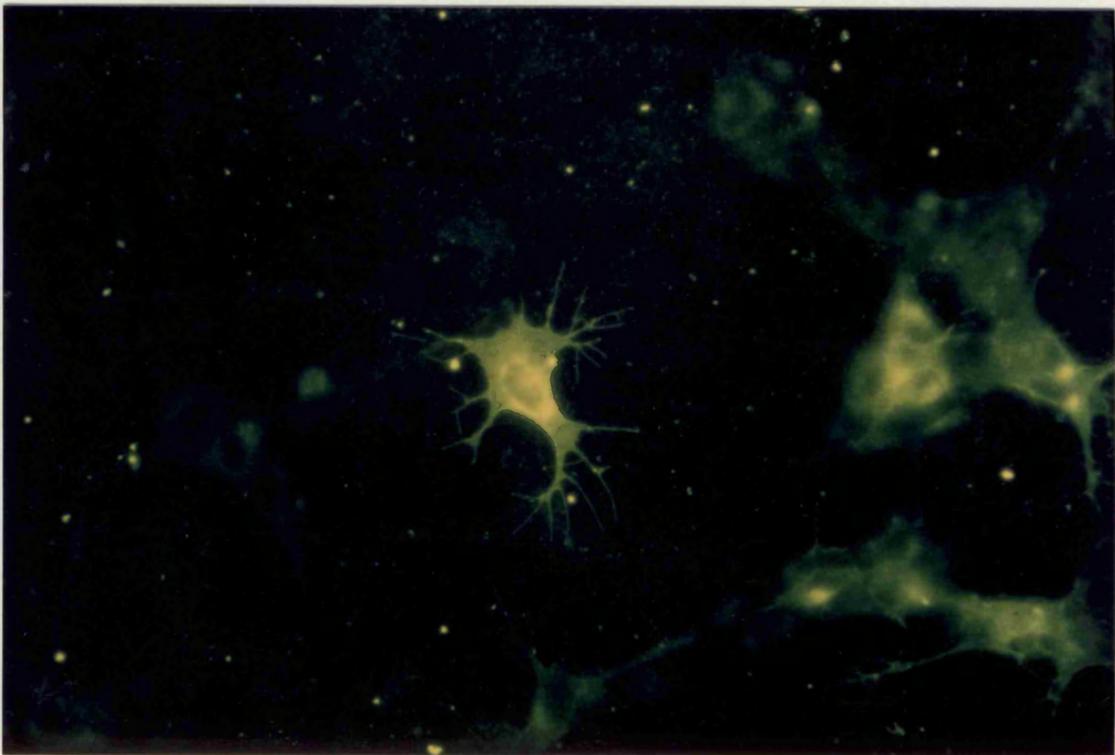
1

Figura 31. Neuroepitelioma periférico (línea celular Tc 32).  
Inmunofluorescencia frente a vimentina. Observese la marcada  
reactividad citoplasmica. 60 X.

Figura 32. Neuroepitelioma periférico (línea celular Tc 135)  
Estudio correspondiente a HNK-1. La positividad se evidencia  
a nivel citoplasmico, de la membrana y de las prolongaciones.  
40 X.



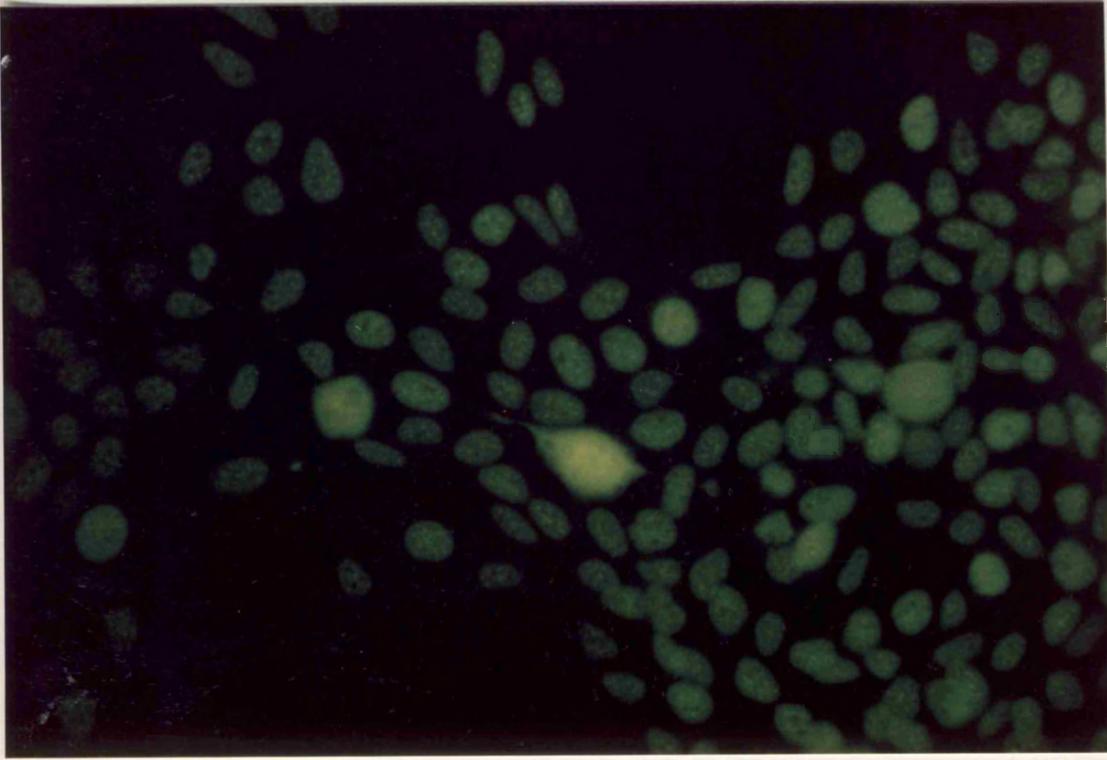
31



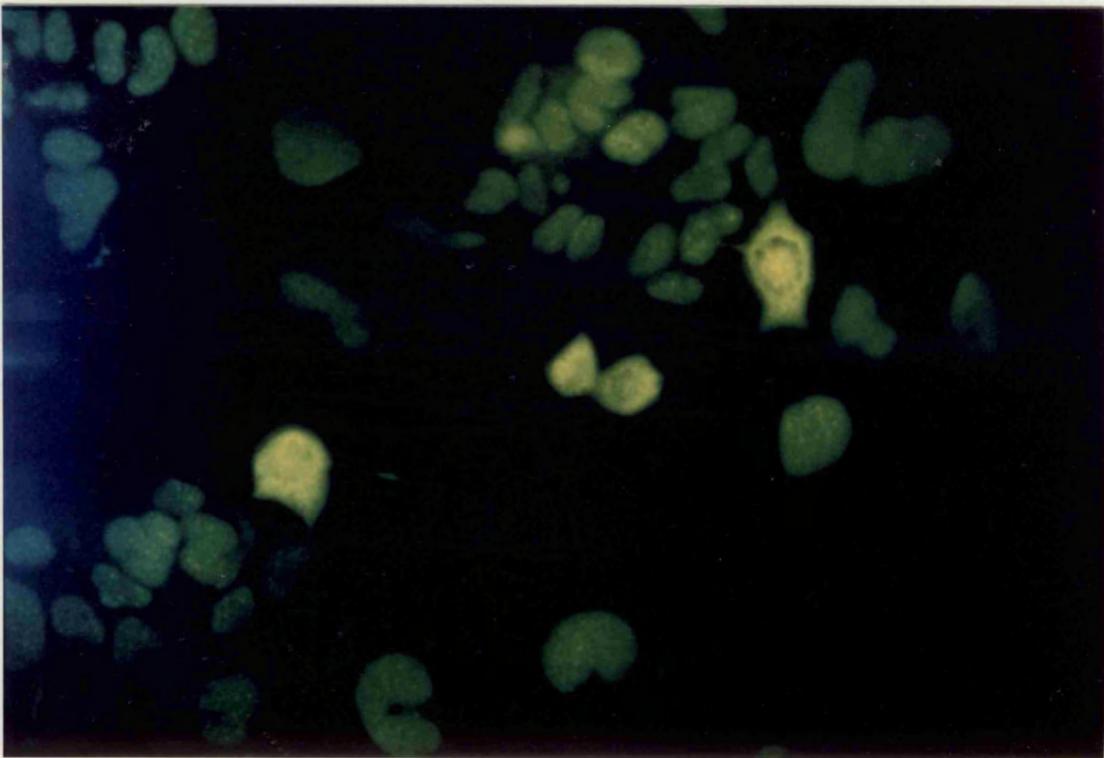
32

Figura 33. Neuroepitelioma periférico (línea celular Tc 32)  
Demostración de neurofilamentos 200 Kd. Aisladas células  
positivas a dicho marcador. 40 X.

Figura 34. Neuroepitelioma periférico (línea celular Tc 248)  
Inmunofluorescencia frente a neurofilamentos 160 Kd. Aisladas  
células presentan reactividad citoplasmica. 40 X.



33



34

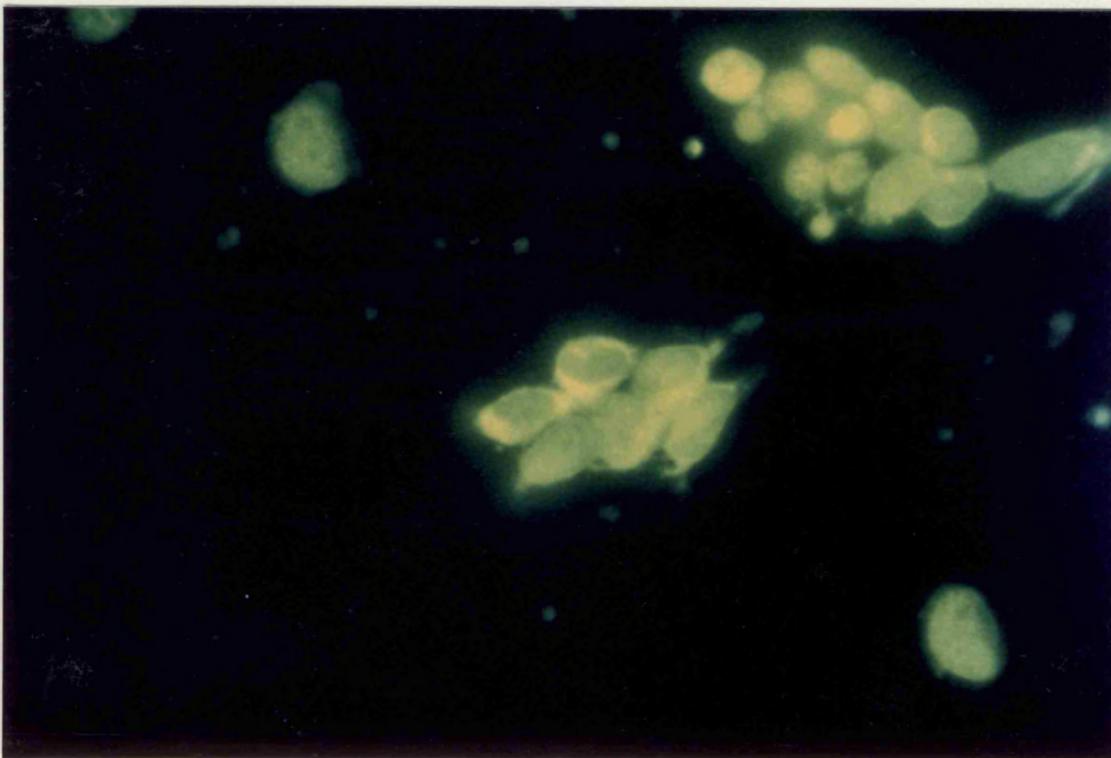
1

Figura 35. Neuroblastoma (línea celular IMR-32).  
Demostración de vimentina. Reactividad citoplasmica difusa.  
40 X.

Figura 36. Neuroblastoma (línea celular KCNR).  
Inmunofluorescencia frente a HNK-1. Observese la intensa  
reactividad citoplasmica. 40 X.



35



36

Figura 37. Neuroblastoma (línea celular KCNR).

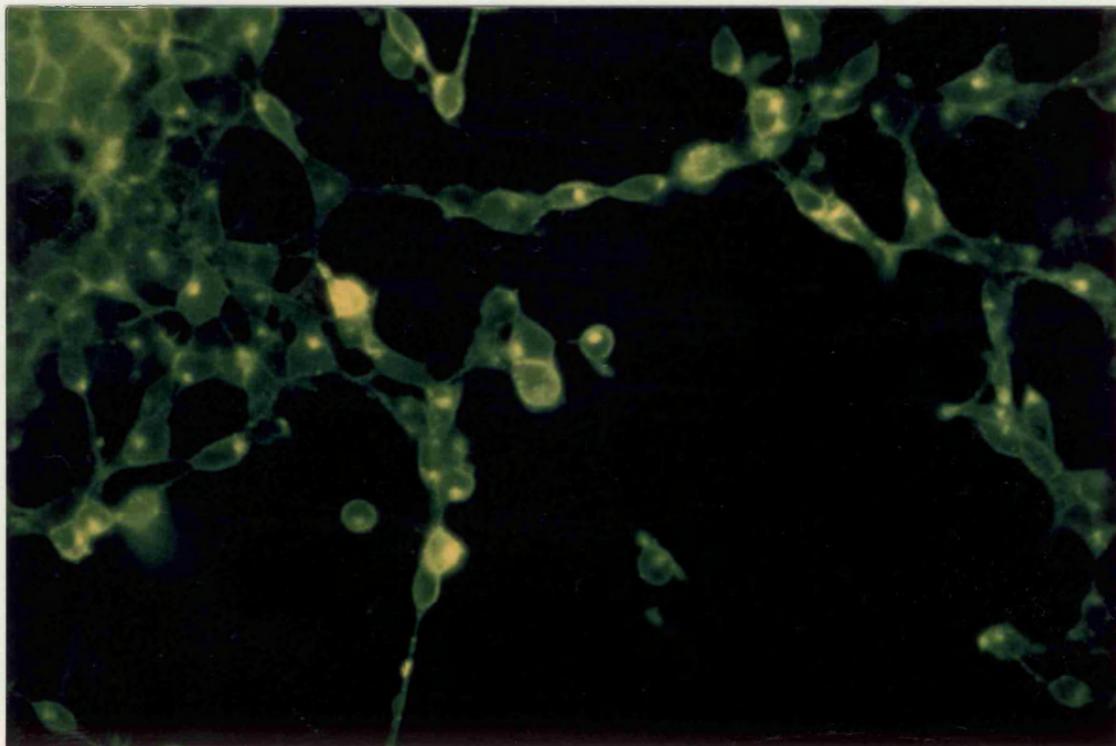
Demostración de neurofilamentos 200 Kd, en el citoplasma y en las prolongaciones celulares. 40 X.

Figura 38. Neuroblastoma (línea KCNR).

Inmunofluorescencia frente a neurofilamentos 160 Kd. Reactividad intensa a nivel del citoplasma y de las prolongaciones celulares. 20 X.



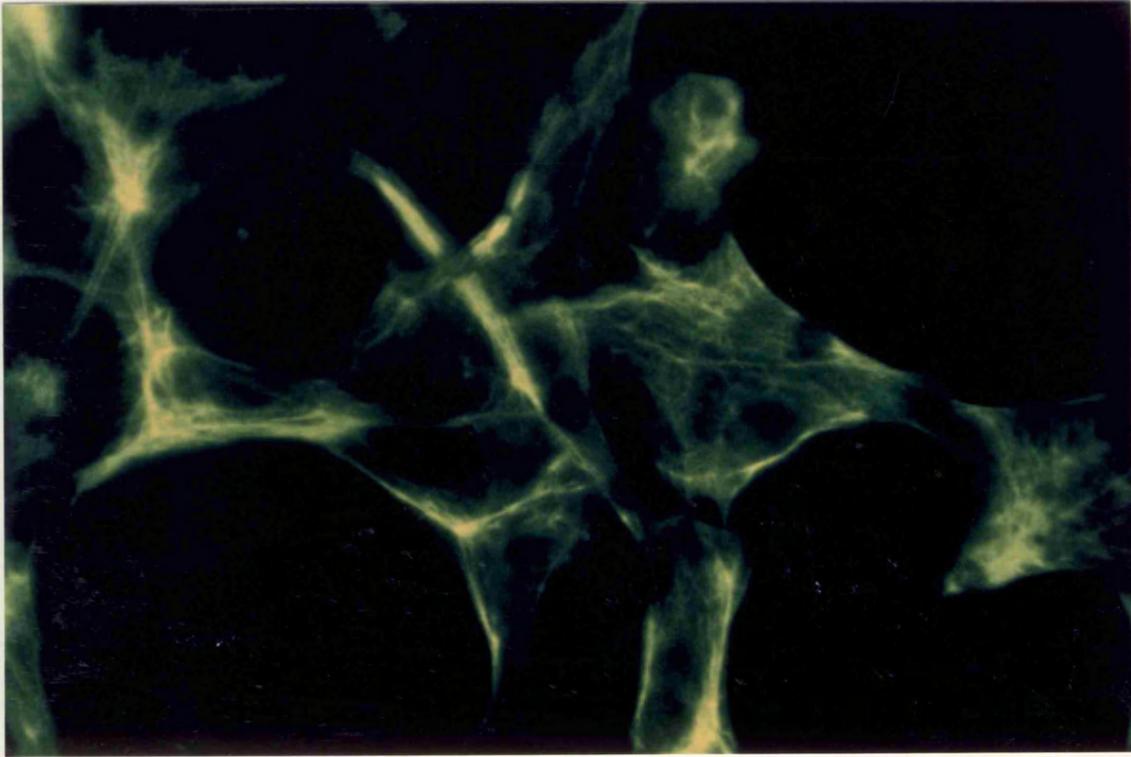
37



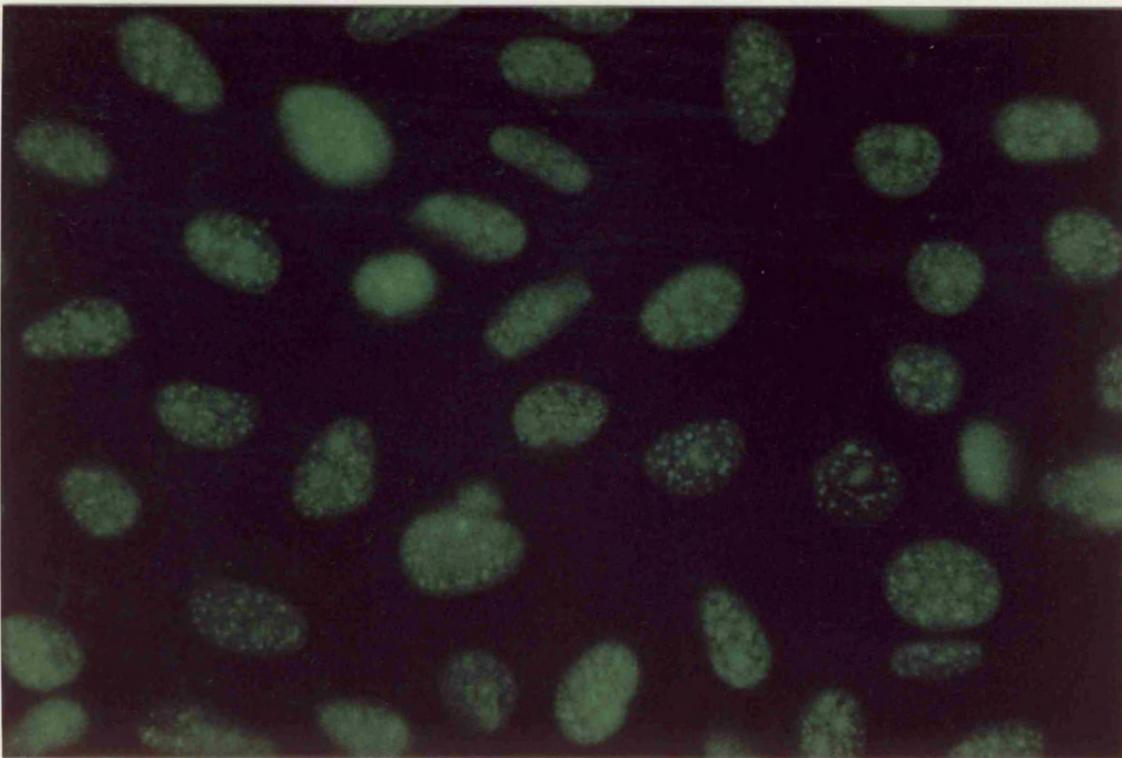
38

Figura 39. Fibroblastos normales (línea celular NF).  
INmunofluorescencia frente a vimentina. Observese la intensa  
y difusa reactividad citoplasmica. 40 X.

Figura 40. Osteosarcoma (línea celular HOS).  
Observese la falta de fluorescencia celular en la  
demostración de neurofilamentos. 40 X.



39



40

#### 4.4.- ANALISIS DEL CITOESQUELETO Y GRANULOS NEUROSECRETORES MEDIANTE WESTERN BLOT.

Para la determinación de los distintos filamentos intermedios utilizamos los siguientes controles:

Para la queratina, el control positivo fué la línea celular del carcinoma de colon, y el control negativo la línea de fibroblastos normales.

En el caso de la vimentina, el control positivo fué la línea de fibroblastos, en tanto que para el control negativo utilizamos el cultivo del carcinoma de colon.

Para la detección de neurofilamentos, el control positivo siempre fué médula espinal humana, procedente de autopsias clínicas. Como controles negativos utilizamos alternativamente las líneas celulares HOS y Tc 212 (osteosarcoma y rabdomyosarcoma).

Para la demostración de cromogranina prescindimos de controles positivos, y utilizamos controles negativos conocidos, como el osteosarcoma y el rabdomyosarcoma.

#### 4.4.1.- SARCOMA DE EWING:

##### 4.4.1.1.- Línea celular A 4573:

Con nuestro método de extracción y utilizando electroforesis monodimensional, no detectamos en esta línea la presencia de queratina, caracterizada por la aparición de una doble banda a nivel de 43 y 68 Kd., tal como fué apreciable en el caso del carcinoma de colon utilizado como control.

La vimentina, sin embargo, fué claramente evidenciable como una fuerte banda localizada a nivel del Pm 52 Kd (Figura 41.).

La subunidad 160 Kd de los neurofilamentos, fué también detectada por la presencia de una banda, localizada a nivel de dicho Pm. Esta banda era menos intensa que la observada en el control positivo (Figura 43.).

No observamos reactividad frente a la subunidad 200 Kd, en los extractos protéicos de esta línea celular (Figura 44).

La demostración de cromogranina A, objetivable por la aparición de una banda a nivel del Pm 68 Kd, fué negativa en esta línea celular (Figura 42.).

##### 4.4.1.2.- Línea celular Tc 71:

Con el material procedente de este cultivo, no detectamos la presencia de las bandas características de la queratina; Al contrario, cuando el filamento intermedio a demostrar fué la vimentina, sí apreciamos la presencia de una

banda a nivel del Pm 52 Kd (Figura 41.).

También fueron detectadas las dos subunidades de los neurofilamentos, por la aparición de bandas a nivel de 160 y 200 Kd (Figuras 43.y 44.).

No se objetivó la presencia de cromogranina en los extractos protéicos (Figura 42.).

#### 4.4.1.3.- Línea celular 5838:

En los distintos experimentos realizados siempre fué evidente la aparición de una débil banda a nivel del Pm 43 Kd. cuando la proteína a demostrar fué la queratina.

También fué detectada una banda a nivel del Pm 52 Kd, característica de la vimentina (Figura 41.).

La subunidad 160 Kd de los neurofilamentos, fué evidenciada por la aparición de una banda a nivel de dicho Pm (figura 43.).

No detectamos sin embargo, la presencia de la subunidad 200 Kd ni de la cromogranina (Figuras 44. y 42.).

#### 4.4.1.4.- Línea celular Tc 106:

En los extractos celulares, no detectamos la presencia de queratina, siendo característica la presencia de una banda a nivel de 52 Kd, cuando sometimos la membrana de nitrocelulosa a la acción de la antivimentina (Figura 41.).

Por otra parte, no fueron detectadas la subunidad 200 Kd de los neurofilamentos ni la cromogranina (Figura 44. y 42.).

La presencia de la otra subunidad de neurofilamentos,

fué claramente objetivable por la aparición de una banda a nivel del Pm 160 Kd (Figura 43.).

#### 4.4.2.- NEUROEPITELIOMA PERIFERICO:

##### 4.4.2.1.- Línea celular Tc 32:

Los resultados de nuestro estudio revelaron la ausencia de queratina así como la presencia de vimentina (Figura 41.).

Siempre fué detectada la subunidad 160 Kd de los neurofilamentos (Figura 43.).

No obtuvimos resultados positivos frente a la subunidad 200 Kd ni frente a la cromogranina (Figuras 44. y 42.).

##### 4.4.2.2.- Línea celular Tc 248:

La queratina no fué detectada en los extractos celulares. Lo mismo ocurrió con la subunidad 200 Kd de los neurofilamentos y con la cromogranina (Figuras 44. y 42.).

Por el contrario, objetivamos la presencia de vimentina, y de la subunidad 160 Kd (Figuras 41. y 43.).

##### 4.4.2.3.- Línea celular Tc 135:

Dicha línea se caracterizó bioquímicamente, por la ausencia de marcaje en las membranas incubadas con antiqueratina. Lo mismo ocurrió cuando la proteína a demostrar fué la cromogranina y la subunidad 200 Kd de los neurofilamentos (Figuras 42. y 44.).

Por el contrario, evidenciamos claras bandas en los Pm 52 Kd y 160 Kd, cuando tratamos de demostrar la vimentina y la subunidad intermedia de los neurofilamentos (Figuras 41. y 43.).

#### 4.4.3. NEUROBLASTOMA:

##### 4.4.3.1.- Línea celular KCNR:

Frente a la queratina, no detectamos la presencia de banda alguna. Tampoco observamos la característica banda 52 Kd, cuando utilizamos la antivimentina (Figura 41.).

Detectamos la presencia de fuertes bandas a nivel de 160 Kd, 200 Kd y 68 Kd, características de los neurofilamentos y la cromogranina (Figuras 43., 44., y 42.).

##### 4.4.3.2.- Línea celular IMR-32:

Caracterizada por la ausencia de detección de vimentina y queratina (Figura 41.).

Como en el caso anterior, demostramos cromogranina y las subunidades 200 Kd y 160 Kd de los neurofilamentos (Figuras 42., 44., y 43.).

#### 4.4.4.- RABDOMIOSARCOMA:

##### 4.4.4.1.- Línea celular Tc 212:

Los extractos celulares fueron utilizados como control negativo para la demostración de neurofilamentos y cromogranina. No detectamos en ningún caso la aparición de bandas a nivel de los Pm de las proteínas descritas (Figuras 43.,44., y 42.).

#### 4.4.5.- OSTEOSARCOMA:

##### 4.4.5.1.- Línea celular HOS:

Utilizada como control negativo, en los casos en que tratamos de detectar neurofilamentos y cromogranina. No observamos la presencia de banda alguna, en los distintos experimentos realizados (Figuras 43.,44., y 42.) .

#### 4.4.6.- CARCINOMA DE COLON:

##### 4.4.6.1.- Línea celular CC:

Utilizada como control positivo para la demostración de queratina. Siempre fueron evidentes dos fuertes bandas, localizadas entre los niveles de Pm 43 y 68 Kd.

Cuando esta línea fué utilizada como control negativo para la demostración de vimentina, no detectamos la presencia de ninguna banda (Figura 41.).

#### 4.4.7.- FIBROBLASTOS NORMALES:

##### 4.4.7.1.- Línea celular NF:

Utilizada como control positivo para la demostración de vimentina, evidenciándose una banda a nivel de 52 Kd (Figura 41.).

Cuando el marcador a demostrar fué la queratina, utilizamos extractos celulares de fibroblastos como control negativo, no detectándose logicamente ningún signo de actividad en la membrana de nitrocelulosa.

En la tabla número 4, podemos apreciar un resumen de nuestros resultados en cuando al analisis del citoesqueleto y de la cromogranina.

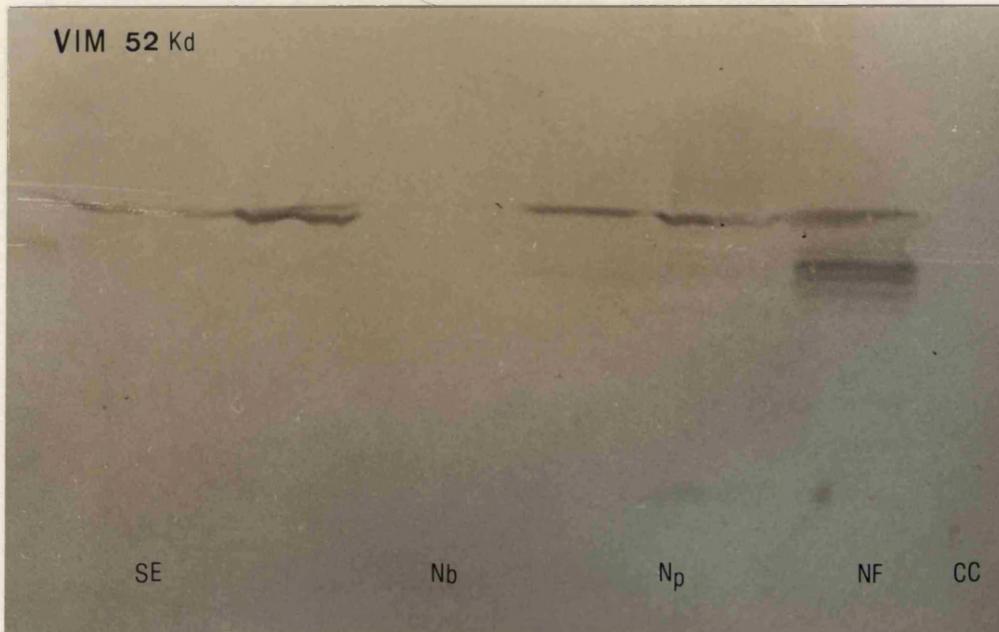
## WESTERN BLOT

Lineas celulares	S. EWING	NEUROEPITELIOMA	NEUROBLASTOMA	RABDOMIOSARCOMA
<b>Citoqueratina EA1-EA3</b>	+/-	?	-	-
<b>Vimentina</b>	+++	+++	-	+
<b>NF 160 Kd</b>	++	++	+++	-
<b>NF 200 Kd</b>	+/-	-	+++	-
<b>Crom.</b>	-	-	+++	-

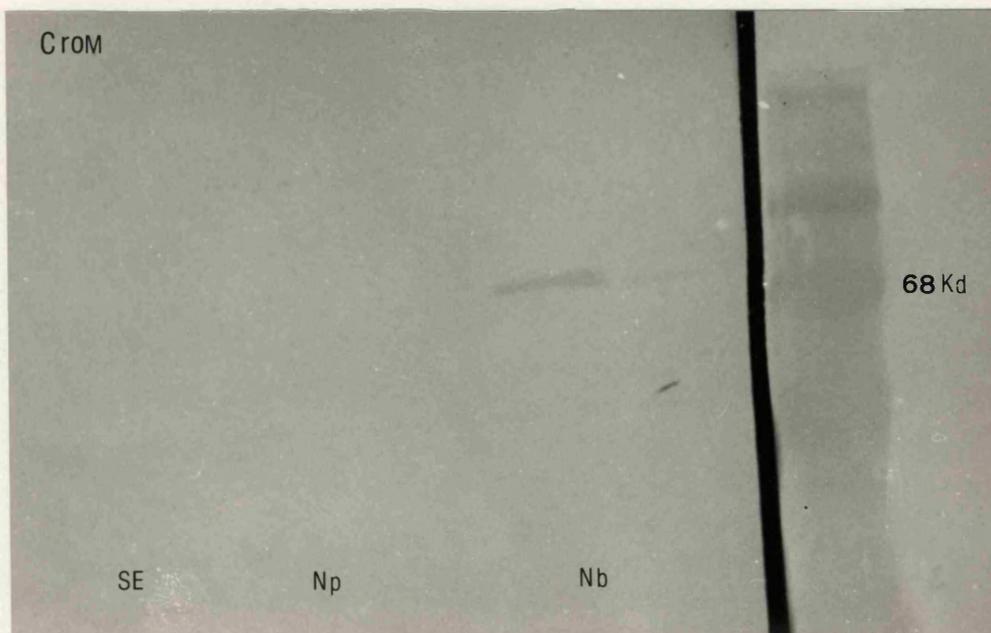
**TABLA 4.-** Cuadro-resumen del estudio del citoesqueleto y de los gránulos neurosecretorios.

Figura 41. Membrana de nitrocelulosa teñida con antivimentina. Destaca la presencia de marcas a nivel del Pm 52 Kd en las líneas de fibroblastos (control, NF), sarcoma de Ewing (SE) y neuroepitelioma (Np), y su ausencia en las líneas de neuroblastoma (Nb) y carcinoma de colon (CC).

Figura 42. Membrana de nitrocelulosa teñida con anticromogranina. Observese la presencia de dos marcas a nivel del Pm 68 Kd., en las dos líneas de neuroblastoma (Nb), contrastando con la negatividad del sarcoma de Ewing (SE) y del neuroepitelioma periférico (Np).



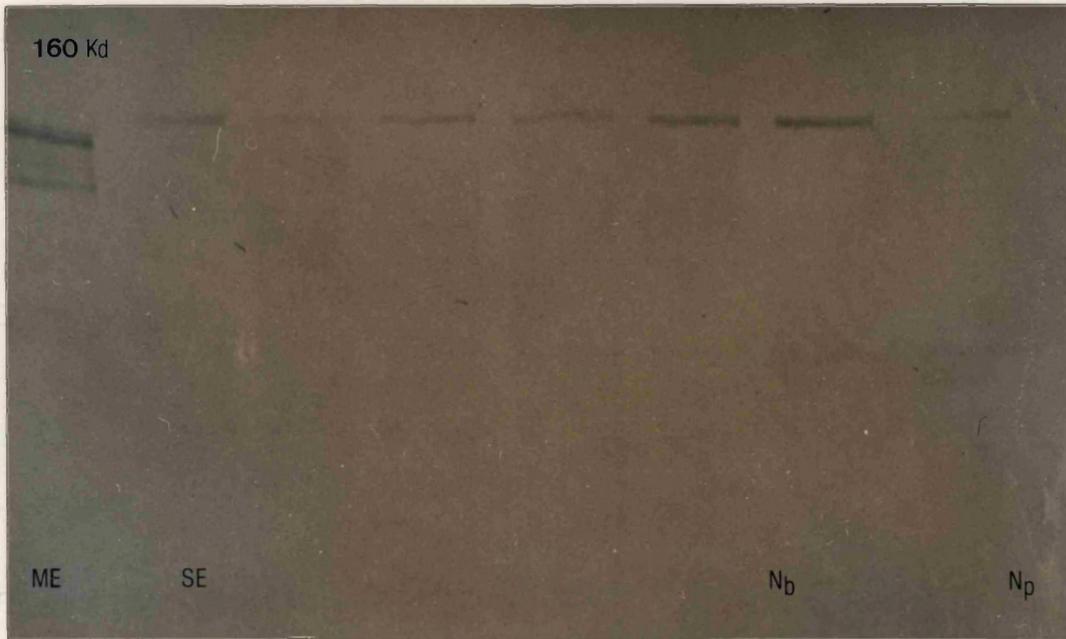
41



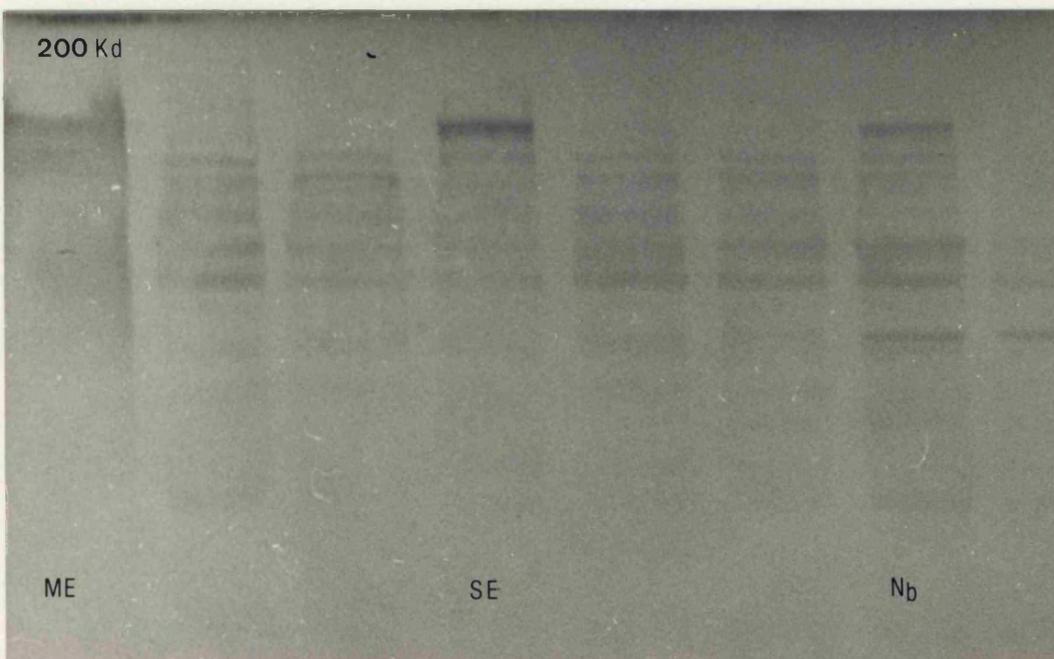
42

Figura 43. Membrana de nitrocelulosa teñida con antineurofilamentos 160 Kd. Observese la presencia de una fuerte marca a nivel de dicho Pm en la médula espinal (ME), neuroblastoma (Nb), neuroepitelioma periférico (Np) y sarcoma de Ewing (SE).

Figura 44. Membrana de nitrocelulosa tañida con antifilamentos 200 Kd. Observese la presencia de marcas a nivel de dicho Pm correspondientes a médula espinal (ME), sarcoma de Ewing (SE), y neuroblastoma (Nb).



43



44

#### 4.5.- EXPRESION DE ONCOGENES. NORTHERN BLOT.

En este estudio, la técnica realizada se basó en la electroforesis en gel de agarosa, del RNA total procedente de nuestra líneas celulares, y en la transferencia de este RNA a una membrana de nitrocelulosa o nylon.

La detección de los oncogenes estudiados en nuestro trabajo, se realizó mediante una técnica de hibridización de sondas de DNA marcadas con  $P^{32}$ , que presentan las cadenas homólogas típicas de los oncogenes a demostrar. La expresión, se evidencia, por la aparición de bandas radioopacas en la placa radiográfica, previa realización de una autoradiografía, con una localización correspondiente a la secuencia de kilobases, característica de cada sonda: 1.6 Kb para c-myc, 0.9 Kb para N-myc, y 2.9 kb para c-Ha-ras (Figuras 45.,46.,47.,y 48.).

Además, en este estudio sólo utilizamos el RNA total procedente de las líneas de sarcoma de Ewing, neuroepitelioma periférico, neuroblastoma y rabdiosarcoma, prescindiendo de las otras líneas empleadas como control en otro tipo de experimentos.

#### 4.5.1.- SARCOMA DE EWING:

##### 4.5.1.1.- Línea celular A 4573:

Con el RNA total procedente de esta línea, objetivamos una clara expresión de c-myc y c-Ha-ras. Por el contrario, cuando la membrana se hibridizó con la sonda N-myc, no detectamos ninguna banda radioopaca en la placa radiográfica.

##### 4.5.1.2.- Línea celular Tc 71:

En este caso, los resultados son superponibles al anterior. Es decir, marcada expresión de c-myc y de c-Ha-ras, y ausencia de expresión de N-myc.

##### 4.5.1.3.- Línea celular 5838:

La autoradiografía reveló la presencia de bandas radioopacas correspondientes a c-myc y c-Ha-ras. No detectamos expresión de N-myc.

##### 4.5.1.4.- Línea celular Tc 106:

Obtuvimos resultados superponibles a las tres líneas anteriores. Marcada expresión de los oncogenes c-myc y c-Ha-ras y ausencia de expresión de N-myc.

#### 4.5.2.- NEUROEPITELIOMA PERIFERICO:

##### 4.5.2.1.- Línea celular Tc 32:

En el RNA total procedente de esta línea, detectamos marcada expresión de c-myc y c-Ha-ras. no se observó expresión de N-myc.

##### 4.5.2.2.- Línea celular Tc 248:

En este caso obtuvimos el mismo resultado: expresión acentuada de c-myc y c-Ha-ras y ausencia de N-myc.

##### 4.5.2.3.- Línea celular Tc 135:

Como en los otros dos casos de neuroepitelioma periférico, fueron evidentes la bandas radioopacas , cuando la hibridización se llevó a cabo con c-myc y c-Ha-ras. No detectamos N-myc en el RNA total procedente de esta línea celular.

#### 4.5.3.- NEUROBLASTOMA:

##### 4.5.3.1.- Línea celular KCNR:

Fué evidente la presencia de una banda radioopaca a nivel de 0.9 Kb en la placa radigráfica, cuando la membrana había sido hibridizada con la sonda N-myc. Por el contrario no encontramos expresión de c-myc.

Respecto a la demostración de c-Ha-ras fué objetivada la expresión de dicho oncogen por la aparición de una fuerte banda radioopaca.

#### 4.5.3.2.- Línea celular IMR-32:

En este caso obtuvimos los mismos resultados que en la línea KCNR: marcada expresión de N-myc y c-Ha-ras y ausencia de expresión de c-myc.

#### 4.5.4.- RABDOMIOSARCOMA:

##### 4.5.4.1.- Línea celular Tc 212:

Con el RNA total obtenido de esta línea, detectamos la acentuada expresión de c-myc, en contraposición a la ausencia de N-myc.

Esta línea no fué utilizada para la demostración de c-Ha-ras.

En la tabla número 5, resumimos nuestros resultados respecto a la expresión de oncogenes.

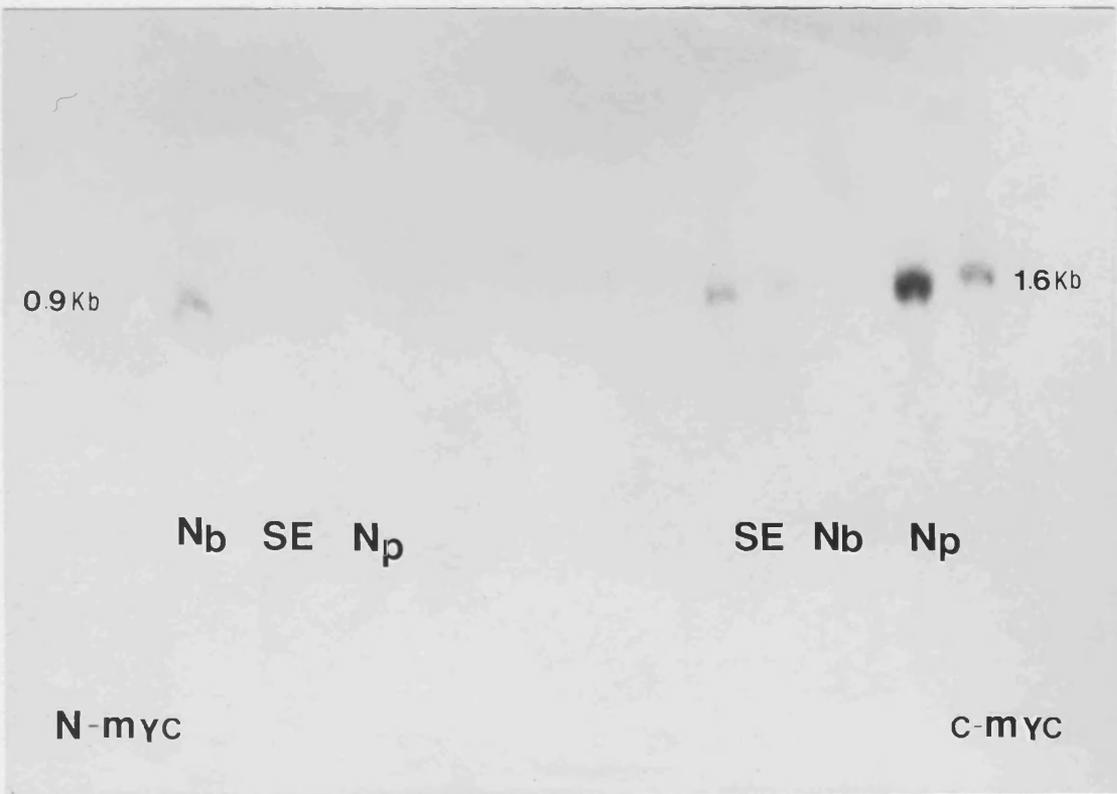
## EXPRESION DE ONCOGENES

Lineas celulares	S. EWING	NEUROEPITELIOMA	NEUROBLASTOMA	RABDOMIOSARCOMA
<b>c-myc</b>	+++	+++	-	+++
<b>N-myc</b>	-	-	+++	-
<b>c-Ha-ras</b>	++	++	++	?

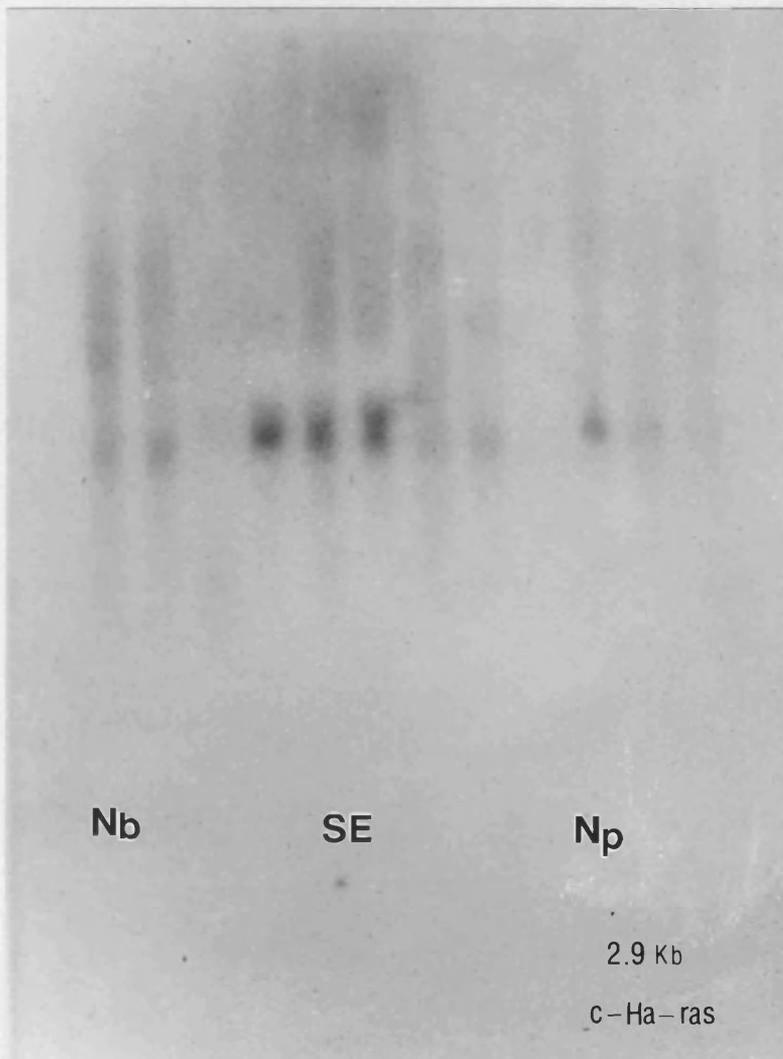
TABLA 5.- Cuadro-resumen de los resultados de la expresión de oncogenes.

Figura 45. Autorradiografía compuesta de dos membranas hibridizadas frente a c-myc y N-myc. A la derecha, podemos apreciar cuatro bandas radioopacas correspondientes a las líneas de sarcoma de Ewing (SE) y neuroepitelioma periférico (Np) positivas a c-myc. A la izquierda, apreciamos la expresión de N-myc por el neuroblastoma (Nb).

Figura 46. Autorradiografía de una membrana hibridizada con c-Ha-ras. Observese una banda presente en todas las líneas estudiadas.



45



46

Figura 47. Autorradiografía de una membrana hibridizada con c-myc. Observese la intensa banda radioopaca en las líneas correspondientes a sarcoma de Ewing (SE), neuroepitelioma periférico (Np), y rabadomiosarcoma (Rb). Destaca la negatividad de las dos líneas de neuroblastoma (Nb).

Figura 48. Autorradiografía de la misma membrana hibridizada con N-myc. Sólo se aprecia dos fuertes bandas radiopacas correspondientes a las líneas de Neuroblastoma (Nb).

c-myc



Np

Rb

SE

Nb

47

N-myc



Np

Rb

SE

Nb

48

## 5. DISCUSSION

En este trabajo hemos considerado como tumores de células redondas, a un grupo de neoplasias de carácter indiferenciado, que presentan patrones morfológicos muy similares, y que hoy en día, plantean problemas diagnósticos diferenciales cuando se utilizan las técnicas anatomopatológicas convencionales.

Estos tumores, que se presentan en edades tempranas de la vida, son un constante reto para el patólogo, quien necesariamente debe dar al clínico, toda la información posible y el diagnóstico preciso que conlleva la práctica de un protocolo terapéutico específico para cada tipo de tumor.

Algunos de estos tumores, como es el caso del sarcoma de Ewing, pese a los numerosos estudios de que ha sido objeto, posee todavía una histogénesis aún en parte no aclarada, siendo uno de los objetivos de nuestro trabajo el aportar nuevos datos que puedan ayudar al mejor conocimiento de esta neoplasia.

El sarcoma de Ewing, el neuroepitelioma periférico, el neuroblastoma, y el rhabdomyosarcoma, son por tanto, tumores malignos que comparten numerosas similitudes clínicas y morfológicas, siendo otro de los motivos de este trabajo, el valorar el empleo de técnicas de uso no convencional, pero no por ello menos abordables, y que pueden ayudar en los casos de difícil diagnóstico diferencial entre cualquiera de estos

tumores.

Quizas, de todos los tumores de células redondas de la infancia, el sarcoma de Ewing, es el que posee más carácter enigmático, a pesar de la cantidad de estudios realizados, encaminados a aclarar su histogénesis y su comportamiento biológico. Algunos de estos estudios, están basados en métodos de cultivo de tejidos. Utilizando esta técnica, Kadin y Bensch (1971), propusieron el supuesto origen mieloides del sarcoma de Ewing. El trabajo de estos dos autores ha sido motivo de polémica, y así, Yunis (1986), en una reciente revisión puntualiza como en el trabajo de Kadin y Bensch (1971), tan sólo, algunos clones celulares en un solo caso de sarcoma de Ewing, presentaban supuestos signos "mieloides" a M.E., consistentes en gránulos citoplasmáticos, que según Yunis (1986), podrían también parecer lisosomas.

También, un trabajo derivado de cultivo de tejidos, ha servido a Jaffe y cols. (1985), para defender la teoría neuroectodérmica en cuanto al origen del sarcoma de Ewing, basado en resultados obtenidos con cuatro tumores diagnosticados como sarcoma de Ewing y mantenidos en cultivo. Dichos autores, han conseguido encontrar un fenotipo neural en las células tumorales y poder así relacionar los conceptos de sarcoma de Ewing, con el neuroepitelioma periférico y el tumor primitivo neuroectodérmico.

En este estudio, hemos analizado cuatro líneas celulares de sarcoma de Ewing, siendo mantenidas en un medio

de cultivo suplementado con suero bovino fetal y tan sólo en una de ellas (Tc 71), encontramos, utilizando microscopía de contraste de fase, algún signo (proyecciones citoplasmáticas) de posible diferenciación neural. Cavazzana y cols. (1985, 1987), realizó un análisis sobre estas mismas líneas celulares, observando claros signos neurales en todas ellas, únicamente cuando el medio de cultivo carecía de suero bovino fetal y se sometían dichos cultivos a la acción de agentes que actúan en la diferenciación celular, como el dibutiril AMP cíclico.

Según esta experiencia, el análisis morfológico simple de los cultivos de sarcoma de Ewing mediante contraste de fase, no aporta claros signos diferenciales frente a otras neoplasias, cuando se utiliza un medio de cultivo "estándar". Sin embargo, creemos que la inducción neural mediante agentes como el descrito por Cavazzana y cols. (1985,1987), puede añadir nuevos datos que ayuden directamente a diferenciar el sarcoma de Ewing de otros tumores, como el rhabdomyosarcoma, y el osteosarcoma, neoplasias estas que no presentan ningún cambio morfológico en sentido neural, cuando son tratadas con AMP cíclico.

Por otra parte, en nuestro estudio, hemos detectado la presencia de claros signos neurales, a expensas de largas proyecciones neuríticas en nuestras dos líneas de neuroblastoma.

Sin embargo, hemos de tener presente que el valor del cultivo de tejidos, no termina sólo con la observación directa de las líneas celulares por microscopía de contraste

de fase; en efecto, nosotros con Cavazzana y cols. (1987) hemos defendido su utilidad en el diagnóstico diferencial de los tumores de células redondas, no sólo por la observación directa de los cultivos, sino porque, el mantenimiento de las citadas líneas celulares ofrece una fuente continua de células tumorales vivas, a partir de las cuales, se pueden relizar otros estudios tipo M.E., inmunofluorescencia, citogenética o expresión de oncogenes, como hemos podido desarrollar en este trabajo, cuyos resultados pasamos a comentar.

La ultraestructura del sarcoma de Ewing, ha sido ampliamente estudiada por numerosos autores: Llombart Bosch y cols. (1978,1980,1982,1983), Povysil y Matejovsky (1977), Friedman y Gold (1968), Mahoney y Alexander (1978), Navas Palacios y cols. (1984), etc..). Aunque en todos estos trabajos, se definen posturas de caracter histogenético distinto, la descripción de la morfología a M.E. de esta neoplasia es bastante uniforme. Así, todos estos autores, coinciden en el caracter inmaduro de la célula tumoral principal del sarcoma de Ewing y la presencia de células degenerativas o secundarias.

La célula principal, posee un citoplasma pobre en orgánulos, con depósitos de glucógeno, ribosomas, aisladas mitocondrias, escasos filamentos intermedios, y uniones estrechas intercelulares, y un nucleo con nucleolo inaparente y cromatina finamente dispersa. Un caracter más diferenciado, con un citoplásma más rico en orgánulos también ha sido descrito en la variedad de sarcoma de Ewing atípico (Llombart

Bosch y cols. 1978). Aisladamente, algunos autores han descrito signos de diferenciación en sentido vascular (Llombart Bosch y cols. 1980) o neural (Schmidt y cols. 1982, Perez Atayde y cols. 1985, Llombart Bosch y cols. 1987).

En el presente trabajo, el analisis ultraestructural efectuado a partir de las cuatro líneas de sarcoma de Ewing, ha confirmado el caracter inmaduro de las células neoplasicas principales estando formadas por elementos con citoplasma pobre en orgánulos y acúmulos de glucógeno. Al igual que ocurre en la morfología óptica por contraste de fase, nosotros no hemos encontrado ningun signo de diferenciación neural o vascular, en este material procedente de cultivos y mantenidos con medio "standard". Esto se encuentra en contraposición con los claros signos neurales descritos por Cavazzana y cols. (1987), en las mismas líneas celulares cuando fueron tratadas con AMP ciclico (estudio "in vitro"). También Cavazzana y cols. (1987) han observado signos neurales en el sarcoma de Ewing sobre material biópsico.

Otra de las ventajas del cultivo de tejidos, es la posibilidad de realizar estudios inmunohistoquimicos. En el caso del sarcoma de Ewing, se han realizado algunos trabajos en este sentido, aunque muchos de ellos han sido utilizando material biópsico y no líneas celulares (Llombart Bosch y cols. 1986, Kawaguchi y Koike 1986, Tsokos y cols. 1984, Cavazzana y cols. 1987, etc..).

Los resultados obtenidos por distintos autores, empleando técnicas de PAP o avidina-biotina son dispares. El marcador más comunmente encontrado ha sido la vimentina

(Miettinen y cols. 1982, Llombart Bosch y cols. 1986), filamento intermedio característico de las células de origen mesenquimal (Osborn y cols. 1984). Respecto a la presencia de marcadores neurales, los resultados son contradictorios. Así, Llombart Bosch y cols. 1986, Kawaguchi y Koike 1986, Yunis y cols. 1986, Cavazzana y cols 1987, etc., encuentran reactividad celular a la Enolasa neuronal específica en algunos sarcoma de Ewing, mientras que otros (Tsokos y cols. 1984), no coinciden en la detección de este marcador neural. Otro marcador neuroectodérmico, ha sido observado en sarcoma de Ewing, tanto en cultivos como en tumores, y se trata del HNK-1 (Caillaud y cols. 1984, Lipinski y cols. 1983,1984, 1987, Llombart Bosch y cols. 1986, etc..). Por otra parte, Moll y cols (1987), han descrito la presencia de queratina y neurofilamentos en células de sarcoma de Ewing.

Veamos que acontece cuando en lugar de usar tumores primarios se utilizan líneas celulares como ocurre en este trabajo. En nuestro estudio, hemos utilizado técnica de inmunofluorescencia y detectado la presencia de marcadores diversos tipo queratina, vimentina, HNK-1, y neurofilamentos en las células procedentes de las líneas de sarcoma de Ewing y comparativamente con otras neoplasias. La presencia de neurofilamentos en estas líneas, había sido descrita previamente por Cavazzana y cols. (1987), pero únicamente cuando se utilizaban líneas de Ewing tratadas con AMP ciclico.

En este trabajo, no hemos pretendido confirmar los resultados ya obtenidos, también a partir de cultivos de

tejidos de sarcoma de Ewing, por Dickman y cols. (1982), demostrando la producción de colágeno tipo I, III y IV; Modesti y cols. (1985), analizando la síntesis de laminina y fibronectina por dicho tumor, o Roessner y cols. (1982) con su detección de Factor VIII en las células tumorales del sarcoma de Ewing. Hemos esencialmente analizado marcadores de especificidad neural, buscando comparativamente tal origen para este sarcoma.

Además, la demostración de algunos de estos marcadores, no a nivel histoquímico, sino bioquímico, mediante técnicas de análisis proteico, como la electroforesis bidimensional o monodimensional, ha sido también realizada por algunos autores en el caso del sarcoma de Ewing (Moll y cols. 1987, Modesti y cols. 1985, Dickman y cols. 1982). En un reciente estudio, Moll y cols. (1987), describe la presencia de vimentina, queratina, y neurofilamentos en extractos proteicos realizados a partir de tumores de Ewing. En nuestro estudio también confirmamos la presencia de neurofilamentos (subunidad 160 Kd) y vimentina en los cuatro casos de sarcoma de Ewing analizados, si bien nosotros sólo hemos detectado la subunidad 200 Kd en una línea de sarcoma de Ewing.

Respecto a la presencia de queratina, que ha sido detectada en algunas células de sarcoma de Ewing, por inmunofluorescencia, no hemos podido confirmar tal resultado con nuestra técnica de electroforesis monodimensional y Western blot. La presencia de posibles contaminaciones, reacciones cruzadas, etc., nos impidió valorar con seguridad la positividad o negatividad de estas líneas celulares frente

a tal antígeno. Es probable que el análisis para la demostración de queratina en estos tumores requiera técnicas de electroforesis bidimensional, como han sido utilizadas por Moll y cols. (1987).

En este estudio, también hemos tratado de detectar bioquímicamente, la presencia de HNK-1 en nuestras líneas celulares, utilizando métodos de determinación proteica. Nuestros resultados encuentran justificación en el reciente trabajo de Lipinski y cols. (1987), al demostrar que HNK-1 no reconoce a una proteína sino a un glicolípido ácido y su determinación bioquímica se debe realizar utilizando técnicas de cromatografía en capa fina.

Pocos estudios han sido realizados hasta el presente con la aplicación de técnicas de biología molecular para la tipificación del sarcoma de Ewing. Como ya hemos señalado Mc Keon y cols. (1986) y Bechet y cols. (1984), demostraron la expresión aumentada del protooncogen c-myc en sarcoma de Ewing, hecho que también confirmamos en este estudio, así como por otro lado la falta de expresión del oncogen N-myc. Sin embargo, en este trabajo, describimos por primera vez la presencia de una expresión aumentada del protooncogen c-Ha-ras en todas las líneas celulares analizadas del sarcoma de Ewing.

El neuroepitelioma periférico , es un tumor menos frecuente que el sarcoma de Ewing, derivado de la cresta neural y que también está incluido dentro del grupo de tumores de células redondas de la infancia y adolescencia (

Triche y cols. 1986, Yunis y cols. 1986). En el capítulo de revisión bibliográfica ya resaltábamos, las dificultades de nomenclatura y clasificación que ha suscitado esta neoplasia, así como, insistíamos sobre las características anatomoclínicas y morfológicas más sobresalientes. Stout y Murray (1942) y Murray y Stout (1947), ya recalcaron la importancia diagnóstica del cultivo de tejidos en el estudio del neuroepitelioma periférico, describiendo perfectamente la presencia de prolongaciones tipo neurítico en las células tumorales cultivadas "in vitro".

En nuestros tres casos, la morfología por contraste de fase, ha sido muy similar a la observada en los casos de sarcoma de Ewing, adoptando una disposición "epitelioidea" en placas confluentes. Tan sólo, en uno de nuestros casos (Tc 135) hemos observado un fenotipo claramente neural, con presencia de prolongaciones celulares provistas de varicosidades tipo neuritas. También, otra de las líneas analizadas (Tc 248) presentó en el explante inicial, claros signos morfológicos de diferenciación neural, con netas prolongaciones citoplásmicas. Sin embargo, este cultivo celular en los siguientes pases, perdió dichas características, adoptando un patrón morfológico en placas "epitelioideas".

La ultraestructura del neuroepitelioma periférico, ha sido ampliamente identificada en estudios realizados sobre material biopsico (Nesland y cols. 1985, Schmidt y cols. 1985, Bolen y Thorning 1980, Mackay y cols. 1976). En general se trata de células que presentan un núcleo más irregular que

el del sarcoma de Ewing, con nucleolo evidente y cromatina más condensada, así como un citoplasma más rico en orgánulos, con presencia de filamentos intermedios, uniones estrechas intercelulares, mitocondrias y ribosomas abundantes. En todos estos estudios, se pone énfasis en la presencia de prolongaciones neurales y en la existencia de gránulos electrodensos (50-200 nm), tipificables como gránulos neurosecretorios.

En nuestro análisis ultraestructural del material procedente de las tres líneas celulares de neuroepitelioma periférico, hemos podido comprobar este patrón morfológico, aunque la presencia de elementos claramente neurales (procesos citoplasmáticos escasos, gránulos neurosecretorios), es esporádica y apreciable sólo tras un detallado análisis en dos de nuestras tres líneas de neuroepitelioma periférico.

Inmunohistoquímicamente, el neuroepitelioma periférico reacciona positivamente a la Enolasa neuronal específica, hecho que ha permitido a algunos autores (Schmidt y cols. 1985) a considerar esta reactividad como un claro signo diferencial con el sarcoma de Ewing. La presencia de NSE en esta última entidad, demostrada por nosotros junto con Cavazzana y cols. 1987 y otros autores (Llombart Bosch y cols. 1986, Kawaguchi y Koike 1986), lejos de diferenciar estas dos neoplasias, supone una serie de similitudes, no sólo morfológicas sino también inmunohistoquímicas entre sarcoma de Ewing y neuroepitelioma periférico.

Efectivamente, en nuestro análisis inmunohistoquímico, con técnica de inmunofluorescencia, hemos podido comprobar,

que al menos "in vitro", sarcoma de Ewing y neuroepitelioma periférico presentan la misma reactividad frente a los marcadores utilizados. Así, hemos detectado, al igual que ocurre en el sarcoma de Ewing, la presencia de células con queratina, vimentina, HNK-1, y neurofilamentos (160 y 200 Kd).

Estas similitudes en el comportamiento inmunohistoquímico, entre sarcoma de Ewing y neuroepitelioma periférico, han sido comprobadas a otro nivel por Donner y cols. (1985), utilizando un extenso panel de anticuerpos monoclonales. Dichos autores detectaron la reactividad de sarcoma de Ewing y neuroepitelioma ante los marcadores HLA-ABC y  $\beta_2$  microglobulina (negativos en neuroblastoma).

En nuestro estudio bioquímico realizado con extractos proteicos, hemos podido confirmar, mediante electroforesis monodimensional y Western blot, la presencia de vimentina y neurofilamentos (160 Kd) en las tres líneas celulares analizadas, al igual que ocurría con el sarcoma de Ewing. En este estudio, tan sólo hemos encontrado un signo diferencial frente al sarcoma de Ewing, y es la ausencia de reactividad a la subunidad 200 Kd de los neurofilamentos, en el caso del neuroepitelioma periférico, aunque bien es cierto que sólo en una de nuestra líneas celulares de sarcoma de Ewing, detectamos la presencia de dicha subunidad proteica.

Respecto al estudio de expresión de oncogenes, confirmamos las anteriores observaciones de Israel y cols (1985,1987), quienes demostraron la expresión de c-myc en el sarcoma de Ewing y en el neuroepitelioma periférico, así como

la falta de expresión y amplificación de N-myc por estos tumores, signo claramente diferenciador frente al neuroblastoma. En nuestro trabajo hemos podido comprobar este patrón de expresión de oncogenes, además de señalar por primera vez la expresión de c-Ha-ras por estos dos tipos de tumores. Confirmamos por tanto, que no sólo existen coincidencias morfológicas entre sarcoma de Ewing y neuroepitelioma periférico, sino también, inmunohistoquímicas, bioquímicas así como un comportamiento a nivel de genética molecular muy parejo.

La detección de una anomalía cromosómica en el neuroepitelioma periférico, como es la traslocación recíproca 11;22 (Whang-Peng y cols. 1984), y su presencia también en el sarcoma de Ewing (Aurias y cols. 1984, Turc-Carel y cols. 1984), refuerzan estos resultados en el sentido de que se trata de dos tumores estructuralmente e histogenéticamente relacionados entre sí y probablemente miembros de la misma familia de tumores neuroectodérmicos.

El neuroblastoma, es quizás de todos los tumores de células redondas de la infancia, el más estudiado tanto a nivel epidemiológico, clínico, así como también morfológico. Las características que describimos en el apartado de la revisión bibliográfica en referencia a la edad de aparición, localización anatómica, capacidad metastásica, potencialidad de regresión y diferenciación (Triche y cols. 1986), separan con bastante nitidez este tumor neural de los otros dos anteriormente mencionados (sarcoma de Ewing y neuroepitelioma

periférico).

El neuroblastoma, en sus variantes típicas cuando presenta signos de diferenciación, no plantea en realidad grandes problemas diagnósticos frente a los otros tumores de células redondas. El problema surge cuando se trata de formas inmaduras, de localización extraadrenal, o más aún cuando encontramos una neoplasia de este tipo metastásica en hueso. En estos casos, la ausencia de un tumor primario adrenal, plantea al patólogo serios problemas diagnósticos. En este sentido, basta recordar el famoso trabajo de Willis en 1940, negando la existencia del sarcoma de Ewing como entidad tumoral ósea y proponiendo que en realidad dicho tumor correspondía a metástasis de un neuroblastoma.

El valor del cultivo celular en el caso del neuroblastoma, es importante, como ya señalaron Murray y Stout en 1947, pues es un tumor, que en la mayor parte de casos cultivados tiende espontáneamente a la producción de largos procesos neuríticos. Efectivamente, nosotros en las dos líneas de neuroblastoma estudiadas, hemos podido apreciar mediante microscopía con contraste de fases, la presencia de estas prolongaciones neuríticas, largas y con escasas varicosidades. Las células en el cultivo crecen formando pequeños grupos siendo de menor tamaño que las observadas en el neuroepitelioma periférico y el sarcoma de Ewing.

Ultraestructuralmente, el neuroblastoma ha sido perfectamente definido por numerosos autores (Triche y cols. 1986, Yunis y cols. 1979, Misugi y cols. 1968, Luse y cols. 1964). La presencia de signos neurales es una constante

presente en todos los trabajos: gránulos electrodensos, del mismo tamaño, de tipo neurosecretor, procesos neuríticos y uniones tipo sinapsis, han sido descritos en todos ellos. En nuestro estudio ultraestructural del material procedente de cultivos, también hemos observado estos signos (gránulos neurosecretores y procesos neuríticos), la presencia de abundante glucógeno citoplásmico en neuroblastoma descrita por algunos autores (Triche y Ross 1978, Yunis y cols. 1979) y que pueden inducir a errores diagnósticos con el sarcoma de Ewing, no ha sido confirmada en nuestro estudio "in vitro".

Inmunohistoquímicamente, la detección de NSE en neuroblastomas (Herschman y Lerner 1973, Tsokos y cols. 1984), llevó a pensar en la utilización de este marcador neural, como un valioso signo diferencial con los otros tipos tumorales de células redondas. Su presencia demostrada en sarcoma de Ewing y neuroepitelioma periférico (Llombart Bosch y cols. 1986, Cavazzana y cols 1987, Kawaguchi y Koike 1986), minimiza dicho valor en el diagnóstico diferencial entre estas neoplasias.

Sí que es útil por el contrario, el empleo de anticuerpos monoclonales (HSAN 1.2) en la discriminación entre el neuroblastoma, neuroepitelioma periférico, y sarcoma de Ewing (Donner y cols. 1985).

Otros estudios inmunohistoquímicos, hacen referencia a la detección de neurofilamentos en el neuroblastoma (Osborn y cols. 1986, Trojanowsky y cols. 1984). En este trabajo, el estudio por inmunofluorescencia, demuestra una fuerte reactividad de las células tumorales a las dos subunidades

analizadas (160 Kd, 200 Kd) de los neurofilamentos. Asimismo, confirmamos la clara reactividad celular al HNK-1, y la presencia del filamento intermedio tipo vimentina.

En relación con el análisis protéico por electroforesis monodimensional y Western blot, llevado a cabo en este estudio hemos confirmado la presencia de neurofilamentos. Uno de nuestros resultados más sorprendentes, ha sido la falta de expresión y por tanto detección, del filamento intermedio vimentina. Interpretamos este hecho suponiendo que si estas células poseen "in vitro" esta proteína, será en muy pequeña cantidad no siendo posible detectarla por la metodología que hemos utilizado.

El carácter adrenérgico del neuroblastoma (Mason y cols. 1957), y la presencia de típicos gránulos neurosecretorios (Triche y cols. 1986), han dado paso a la caracterización bioquímica de estos signos con los estudios realizados mediante las cromograninas, en concreto el tipo A (O'Connor y cols. 1983, Wilson y Lloyd 1984). Esta proteína ha sido descrita por estudios inmunohistoquímicos en las células tumorales del neuroblastoma (Wilson y Lloyd 1984), así como en órganos neuroendocrinos y sus derivados tumorales (O'Connor y cols. 1983, 1986, Angeletti y cols. 1986).

En nuestro estudio con extractos proteicos celulares, hemos demostrado la presencia de cromogranina en los dos neuroblastomas analizados, así como constatado su ausencia en los otros tumores revisados. La cromogranina por tanto, puede ser utilizada como un auténtico marcador en el diagnóstico diferencial de estas neoplasias.

El neuroblastoma es uno de los tumores que más se han estudiado desde el punto de genética molecular. La inicial descripción de la expresión del proto-oncogen N-myc (Schwab y cols. 1983) por este tumor, y el valor que esta expresión y su posterior amplificación tienen en relación con los estadios avanzados, y por tanto con un mal pronóstico de la enfermedad (Seeger y cols. 1985, Rosen y cols. 1986, Brodeur y cols. 1984, Michitsch y cols. 1984), han sido verdaderos motores en la aplicación de técnicas de biología molecular al diagnóstico histopatológico.

En nuestro trabajo, hemos confirmado la expresión de N-myc en las dos líneas de neuroblastoma, así como la ausencia de expresión del proto-oncogen c-myc, y además, también señalamos la presencia de c-Ha-ras en nuestras dos líneas celulares.

Finalmente, queremos hacer unos breves comentarios acerca de otro tumor de células redondas, como es el rabdomiosarcoma. En nuestro trabajo hemos utilizado una sola línea celular de este tumor y siempre como control, fundamentalmente negativo, de los distintos experimentos, junto con otras líneas descritas en el apartado de material y métodos (osteosarcoma y carcinoma de colon).

La morfología del rabdomiosarcoma en cultivos, es claramente diferencial con los otros tumores analizados. La presencia de células redondas, fusiformes, y gigantes multinucleadas, diferencia al rabdomiosarcoma del neuroepitelioma periférico, neuroblastoma y sarcoma de Ewing. Sin embargo, esta morfología es común a otros sarcomas, como

el osteosarcoma (vease descripción de nuestro control HOS).

La ultraestructura del rabdomiosarcoma, también presenta claros signos diferenciales con los tipos de tumores de células redondas. La presencia de abundante material fibrilar, tipo banda Z en nuestro caso, confirmó los hallazgos logrados por otros autores (Gonzalez Crussi y Black-Schaffer 1979, Dickman y Triche 1986).

Los estudios inmunohistoquímicos descritos en rabdomiosarcomas (Tsokos y cols. 1983, Eusebi y cols. 1986), hacen referencia a marcadores como la miosina, desmina, CKMM, actina o mioglobina no utilizados en nuestro estudio.

Por otro lado, como era esperado, nuestra línea celular de rabdomiosarcoma, ha sido negativa en todos los estudios realizados con marcadores neurales, tanto en inmunofluorescencia como en Western blot.

Por contra, el comportamiento observado respecto al patrón de expresión de oncogenes, es semejante al visto en nuestros resultados con el sarcoma de Ewing y el neuroepitelioma periférico (expresión de c-myc y c-Ha-ras), y distinto al del neuroblastoma (ausencia de expresión de N-myc), por lo que a nivel molecular este tumor no está todavía deslindado de los otros dos.

Los otros controles utilizados en nuestro estudio, en realidad no plantean problemas de diagnóstico diferencial con los tumores de células redondas, desde el punto de vista morfológico. Conocido es que a nivel inmunohistoquímico, al igual que ocurre con el sarcoma de Ewing, el osteosarcoma produce vimentina (Löning y cols. 1985). En nuestro trabajo

hemos comprobado esta reactividad, aunque la utilización de la línea celular HOS, ha sido casi exclusivamente dirigida como control negativo conocido de los distintos marcadores neurales.

Finalmente, las líneas celulares de carcinoma de colon y fibroblastos normales, han sido utilizadas como controles positivos conocidos en la demostración de queratina y vimentina respectivamente. A nivel morfológico, no existen problemas de diagnóstico diferencial entre estas líneas y los tumores de células redondas.

## 6. CONCLUSIONES

1.- La morfología óptica por contraste de fase, de los cultivos celulares obtenidos a partir de tumores de células redondas de la infancia y adolescencia, aporta signos diferenciales útiles para el diagnóstico, como es la presencia de numerosos procesos citoplásmicos de tipo neural en el neuroblastoma y más ocasionales en el neuroepitelioma periférico.

2.- La ultraestructura de las células procedentes de los cultivos de los tumores estudiados, no sólo confirma las imágenes a microscopía electrónica de los tumores vistos "in vivo", sino que gracias al conocido fenómeno de diferenciación espontánea "in vitro", encontramos también algunos signos diagnósticos de maduración como por ejemplo la aparición de bandas Z en nuestra línea celular de rhabdomyosarcoma, no evidentes en el material biopsico original.

3.- Nuestro estudio inmunohistoquímico por inmunofluorescencia indirecta a partir del material procedente de cultivos celulares, aventaja a la inmunohistoquímica realizada sobre secciones en parafina, por cuanto en esta última, todos los pasos técnicos de fijación y de inclusión pueden enmascarar o destruir ciertos antígenos

celulares, situación que no se ha producido en nuestro trabajo.

4.- Mediante nuestro análisis inmunohistoquímico confirmamos el carácter neuroectodérmico del neuroblastoma y neuroepitelioma periférico por la detección de antígenos específicos como son los neurofilamentos y HNK-1.

5.- La detección focal de neurofilamentos, HNK-1, y queratina en células del sarcoma de Ewing nos permite también postular una diferenciación neuroectodérmica de este tumor "in vitro".

6.- Nuestros resultados sobre los mismos tumores pero utilizando el análisis protéico por electroforesis monodimensional y Western-blot, confirman los hallazgos obtenidos por inmunofluorescencia indirecta.

7.- La detección de la subunidad 160 Kd de los neurofilamentos en el sarcoma de Ewing, refuerza la teoría neural en la histogénesis de esta neoplasia.

8.- La detección de cromogranina A en el neuroblastoma por técnica de Western-blot, confirma el carácter neural y adrenérgico de este tipo tumoral.

9.- También la ausencia de cromogranina en el sarcoma de Ewing y en el neuroepitelioma periférico, descarta la naturaleza adrenérgica de dichos tumores.

10.- Nuestro estudio sobre la presencia de oncogenes confirma, la marcada expresión de N-myc por las líneas celulares de neuroblastoma, así como su falta de expresión en las líneas de neuroepitelioma periférico, sarcoma de Ewing y rhabdomyosarcoma.

11.- Mediante el análisis del RNA por Northern-blot, demostramos la expresión del oncogen c-myc en el sarcoma de Ewing, neuroepitelioma periférico y rhabdomyosarcoma, así como su ausencia en las líneas de neuroblastoma.

12.- Mediante el análisis del RNA, encontramos la expresión del oncogen c-Ha-ras en todas las líneas celulares estudiadas.

13.- El análisis morfológico, inmunohistoquímico, bioquímico y molecular que hemos efectuado en líneas celulares "in vitro", confirma el estrecho paralelismo existente entre el sarcoma de Ewing y el neuroepitelioma periférico, hasta el punto de que podemos considerar a ambos tumores como miembros de la misma familia de naturaleza neuroectodérmica.

14.- Nuestro estudio también confirma, la entidad biológica propia del neuroblastoma diferenciándola del sarcoma de Ewing y del neuroepitelioma periférico, en base no solo a signos morfológicos, sino también a factores inmunohistoquímicos, bioquímicos y de biología molecular.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Abell M.R., Hart W.R., y Olson J.R.  
Tumors of the peripheral nervous system.  
Hum. Pathol. 1: 503-551, 1970.

Alitalo K., Schwab M., Lin C.C., Varmus H.E., y Bishop J.P.  
Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified  
copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in  
malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 1707-1711, 1983.

Angeletti R.H.  
Chromogranins and neuroendocrine secretion.  
Lab. Invest. 55: 387-390, 1986.

Angeletti R.H., y Hickey W.F.  
A neuroendocrine marker in tissues of the immune system.  
Science 230: 89-90, 1985.

Angervall L., y Enzinger F.M.  
Extraskeletal neoplasm resembling Ewing's sarcoma.  
Cancer 36: 240-251, 1975.

Askin F.B., Rosai J., Sibley R.K., Dehner L.P., y Mc Alister  
W.H.  
Malignant small cell tumor of the thoracopulmonary region in  
childhood. A distinctive clinico-pathologic entity of  
uncertain histogenesis.  
Cancer 43: 2438-2451, 1979.

Aurias A., Rimbaut C., Buffe D., Zucker J.M., y Mazabraud A.  
Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma. A  
cytogenetic study of four fresh tumors.  
Cancer Genet. Cytogenet. 12: 21-25, 1984.

Bader M.F., Georges E., Mushynski W.E., y Trifaro J.M.  
Neurofilament proteins in cultured chromaffin cells.  
J. Neurochem. 43: 1180-1193, 1984.

Bator S.M., Bauer T.W., Marks K.E., y Norris D.G.  
Periosteal Ewing's sarcoma.  
Cancer 58: 1781-1784, 1986.

Bailey P., y Cushing H.  
A classification of the tumors of the glioma group on a  
histogenetic basis with a correlated study of prognosis.  
Philadelphia: J.B. Lipincott Co., 1926.

Bechet J.M., Bornkamm G., Freese U.K., y Lenoir G.M.

The c-sis oncogene is not activated in Ewing's sarcoma.  
N. Eng. J. Med. 310: 393, 1984.

Berthold F., Kracht J., Lampert F., Millar T.J., Müller T.H.,  
Reither M., y Unsieler K.  
Ultrastructural biochemical and cell culture studies of a  
presumed extraskeletal Ewing's sarcoma with special reference  
to differential diagnosis from neuroblastoma.  
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 103: 293-304, 1982.

Bishop J.M.  
Cellular oncogenes and retroviruses.  
Ann. Rev. Biochem. 52: 301-354, 1983.

Bolen J.W., y Thorning D.  
Peripheral neuroepithelioma: a light and electron microscopy  
study.  
Cancer 46: 2456-2462, 1980.

Brodeur G.M., Seeger R.C., Schwab M., Varmus H.E., y Bishop  
J.M.  
Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas  
correlates with advanced disease stage.  
Science 224: 1121-1124, 1984.

Caillaud J.M., Benjelloun S., Bosq J., Braham K., y Lipinski  
M.  
HNK-1 defined antigen detected in paraffin-embedded  
neuroectoderm tumors and those derived from cells of the  
amine precursor uptake and decarboxylation system.  
Cancer Res. 44: 4432-4439, 1984.

Cavazzana A.O., Mims S.J., Jefferson J.A., y Triche T.J.  
Ewing's sarcoma: inducible neural differentiation in four  
tumor cell lines.  
Proc. SIOP XVIII: 51-53, 1985.

Cavazzana A.O., Miser J.S., Jefferson J.A., y Triche T.J.  
Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma  
of bone.  
Am. J. Pathol. 1987. (en prensa).

Cavazzana A.O., Navarro S., Noguera R., Mims S.J., y Triche  
T.J.  
Short term tissue culture in the differential diagnosis of  
small round cell tumors of childhood.  
Lab. Invest. 56, 1 (abstract): 11 A, 1987.

Cavazzana A.O., Navarro S., Noguera R., y Triche T.J.  
Short term tissue culture in the differential diagnosis of  
small round cell tumors of childhood.  
Path. Res. Pract. 1987. (en prensa).

Cavazzana A.O., Navarro S., Triche T.J., y LLombart Bosch A.  
Ewing's sarcoma and Peripheral neuroepithelioma compared.  
Lab. Invest. 56, 1 (abstract): 12 A, 1987.

Ceccarelli V.E., Gorza L., Schiaffino S., y Bussolati G.  
Immunocytochemistry of Rhabdomyosarcoma. The use of four  
different marker.  
Am. J. Surg. Pathol. 10: 293-299, 1986.

Cerdá M., Navarro S., Broseta J., y Peydró Olaya A.  
Valor de la determinación de la proteína gliofibrilar ácida  
(GFA) en el diagnóstico de los tumores del sistema nervioso  
central.  
En Univ. Complutense Madrid (ed): Estudios sobre Histología y  
Anatomía Patológica. 1985. p.210-218.

Debus E., Weber K., y Osborn M.  
Monoclonal cytokeratin antibodies that distinguish simple  
from stratified squamous epithelia: characterization of human  
tissues.  
EMBO J. 1: 1641-1647, 1982.

Dehner L.P.  
Will the real Neuroblastoma please stand up?  
Arch. Pathol. Lab. Med. 109: 794, 1985.

Dehner L.P.  
Peripheral and central primitive neuroectodermal tumors.  
Arch. Pathol. Lab. Med. 110: 997-1005, 1986.

Dickman P.S., Liotta L.A., y Triche T.J.  
Ewing's sarcoma. Characterization in established cultures and  
evidence of its histogenesis.  
Lab. Invest. 47, 4: 375-382, 1982.

Dickman P.S., y Triche T.J.  
Extraosseous Ewing's sarcoma versus primitive  
Rhabdomyosarcoma: diagnostic criteria and clinical  
correlation.  
Hum. Pathol. 17, 9: 881-893, 1986.

Donner L., Triche T.J., Israel M.A., Seeger R.C., y Reynolds  
C.P.  
A panel of monoclonal antibodies which discriminate  
neuroblastoma from Ewing's sarcoma, rhabdomyosarcoma,  
neuroepithelioma and hematopoietic malignancies.  
En Evans A.E., D'Angio y Seeger R.C. (ed.): Advances in  
Neuroblastoma Research. New York, Alan R.Liss. 1985, p.347.

Enzinger F.M., y Weiss S.V.  
The C.V. Mosby Co. (ed): Soft tissue tumors. St. Louis-  
Toronto - London. 1983.

Eusebi V., Rilke F., Ceccarelli C., Fedeli F., Schiaffino S.  
y Bussolati G.  
Fetal heavy chain skeletal myosin. An oncofetal antigen  
expressed by rhabdomyosarcoma.  
Am. J. Surg. Pathol. 10: 680-686, 1986.

Evans A.E., D'Angio G.J., y Koop C.E.  
Diagnosis and treatment of neuroblastoma.  
Pediatr. Clin. N. Amer. 23: 161, 1976.

Ewing J.  
Diffuse endothelioma of bone  
Proc. NY Pathol. Soc. 21: 17-24, 1921.

Ewing J.  
Further report in endothelial myeloma of bone.  
Proc. NY Pathol. Soc 24: 93-101, 1924.

Falck B., Hillarp N.A., Thieme G., y Torp A.  
Fluorescence of catecholamines and related compounds  
condensed with formaldehyde.  
J. Histochem. Cytochem. 10: 348, 1962.

Fernbach D.J., Williams T.E., y Donaldson M.H.  
Neuroblastoma.  
En Sutow W.W., Viett T.J. y Fernbach D.J. (ed): Clinical  
Pediatric Oncology. St Louis C.V. Mosby Co. 1977, p.506-537.

Friedman B., y Gold H.  
Ultrastructure of Ewing's sarcoma of bone.  
Cancer 22: 307-322, 1968.

Friedman B., y Hanoaka H.  
Round cell sarcoma of bone. A light and electron microscopyc  
study.  
J. Bone Jt. Surg. 53: 1118-1136, 1971.

Gabbiani G., Kapanai Y., Barazzone P., y Franke W.  
Immunochemical identification of intermediate-sized filaments  
in human neoplastic cells. A diagnostic aid for the surgical  
pathologist.  
Am. J. Pathol. 104: 206-216, 1981.

Garre C.  
Ueber seckundare maligne neurome.  
Beitr. Z. Klin. Chir. 9: 465, 1892.

Gilbert F.  
Solid tumors in children: chromosome abnormalities and the  
development of cancer.  
J. Cell Physiol. 3 (suppl): 165-170, 1984.

Gillespie J.J., Roth L.M., Wills E.R., Einhorn L.H., y  
Willman J.  
Extraskeletal Ewing's sarcoma. Histological and  
ultrastructural observations in three cases.  
Am. J. Surg. Pathol. 3: 99-108, 1979.

Gonzalez-Crussi F., y Black-Schaffer S.  
Rhabdomyosarcoma of infancy and childhood. Problems of  
morphologic classification.  
Am. J. Surg. Pathol. 3: 157-171, 1979.

Gonzalez-Crussi F., Wolfson S.L., Misugi K., y Nakajima T.  
Peripheral neuroectodermal tumors of the chestwall in  
childhood.  
Cancer 54: 2519-2527, 1984.

Gore I.  
Primary malignant tumors of nerve.  
Cancer 5: 278, 1952.

Hadju S.I.  
En Lea y Febiger (ed): Pathology of soft tissue tumors.  
Philadelphia. 1979.

Hagn C., Schmid K.W., Fischer-Colbrie R., y Winkler H.  
Chromogranin A, B and C in human adrenal medulla and  
endocrine tissues.  
Lab. Invest. 55: 405-411, 1986.

Hartman K.R., Triche T.J., Kinsella T.J., y Miser J.S.  
Histopathology: A significant prognostic factor in Ewing's  
sarcoma. A review of 56 cases of distal extremity primary  
tumors.  
Am. J. Pathol. 1987, (en prensa).

Harvey W., Squier M.V., Duance V.C., y Pritchard J.  
A biochemical and immunohistological study of collagen  
synthesis in Ewing's tumour.  
Br. J. Cancer 46: 848-855, 1982.

Hashimoto H., Enjoji M., Nakajima T., Kiryu H., y Daimaru Y.  
Malignant neuroepithelioma (Peripheral neuroblastoma). A  
clinico-pathologic study of 15 cases.  
Am. J. Surg. Pathol. 7: 309-318, 1983.

Herschman H.R., y Lerner M.P.  
Production of a nervous system specific protein (14-3-2) by  
human neuroblastoma cells in culture.  
Nature New Biol. 241: 242, 1973.

Hunter T.  
The proteins of oncogenes.  
Scientific American 251: 70-79, 1984.

Israel M.A., Helman L.J., y Miser J.  
Patterns of proto-oncogene expression: A novel approach to  
the development of tumor marker.  
Imp. Adv. Oncol. 1987, (en prensa).

Israel M.A., Thiele C., Whang-Peng J., Triche T.J., Miser J.,  
y Kao-Shan Ch.S.  
Peripheral neuroepithelioma: Genetic analysis of tumor  
derived cell lines.  
En Evans A.E., D'Angio G.J., y Seeger R.C. (ed): Advances in  
neuroblastoma research. New York, Alan R.Liss. 1985, p.161.

Jaffe N.

Neuroblastoma: Review of the literature and an examination of factors contributing to its enigmatic character.  
Cancer Treat. Rev. 3: 61-82, 1976.

Jaffe R., Santamaria M., Yunis E.J., Tannery N.H., Agostini R.M., Medina J., y Goodman M.  
The neuroectodermal tumor of bone.  
Am. J. Surg. Pathol. 8: 885-898, 1984.

Jaffe R., y Yunis E.J.  
Neuron Specific Enolase is useful in the differential diagnosis of childhood round cell tumors.  
Lab. Invest. 48 (abstract): 87 A, 1983.

Kadin M.E., y Bensch K.G.  
On the origin of Ewing's tumor.  
Cancer 27: 257-273, 1971.

Kajanti M., y Holsti P.  
Prognostic factors in neuroblastoma.  
Ann. Clin. Res. 18: 129-133, 1986.

Kawaguchi K., y Koike M.  
Neuron-specific Enolase and Leu-7 immunoreactive small round cell neoplasm. The relationship to Ewing's sarcoma in bone and soft tissue.  
Am. J. Clin. Pathol. 86,1: 79-83, 1986.

Kim T.H., Zaatari G., Atkinson G.O., Mc Laren J.R., y Ragab A.H.  
Ewing's sarcoma of a lower extremity in an infant. A therapeutic dilemm.  
Cancer 58: 187-189, 1986.

Kinsella T.J., Triche T.J., Dickman P.S., Costa J., Tepper J.E., y Glaubiger D.  
Extraskeletal Ewing's sarcoma: Results of combined modality treatment.  
J. Clin. Oncol. 1: 489-495, 1983.

Kissane J.M., Askin F.B., Foulkes M., Stratton L.B., y Faulker Shirley S.  
Ewing's sarcoma of bone: Clinico-pathologic aspects of 303 cases from the Intergroup Ewing's sarcoma Study.  
Hum. Pathol. 14: 773-779, 1983.

Kissane J.M., Askin F.B., y Nesbitt M.E.  
Sarcomes of bone in childhood: Patogenic aspects.  
Natl. Cancer Inst. Monoqr. 56: 29-41, 1981.

Laemmli U.K.  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature 227:680-685, 1970.

Lazarides E.  
Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space.  
Nature 283: 249-256, 1980.

Lee W.H., Murphree A.L., y Benedict W.F.  
Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma.  
Nature 309: 458-460, 1984.

Lieberman P.H.  
Primitive neuroectodermal tumor.  
Proceedings of the forty fifth annual Anatomic Pathology slide seminar: American Society of Clinical Pathology. 1981. Case 21. p.100-105.

Lindvall O., Bjorklund A., y Falck B.  
Glyoxilic acid condensation: A new fluorescence method for sensitive and detailed tracing of central catecholamine neurons.  
Proceedings of the third International catecholamines Symposium. Strasbourg, May 1973. New York, Pergamon Press, 1974.

Linnoila R.I., Tsokos M., Triche T.J., Marangos P.J., y Chandra R.S.  
Evidence for neural origin and PAS-positive variants of the malignant small cell tumor of thoracopulmonary region (Askin tumor).  
Am. J. Surg. Pathol. 10: 124-133, 1986.

Lipinski M., Braham K., Caillaud J.M., Carlu C., y Tursz T.  
HNK-1 antibody detects an antigen expressed on neuroectodermal cells.  
J. Exp. Med. 158: 1775-1780, 1983.

Lipinski M., Braham K., Caillaud J.M., Philip I., Philip T., Lenoir G.M., y Tursz T.  
Analysis of Ewing's tumour with panels of monoclonal antibodies.  
Prot. Biol. Fluids Proc. Colloq. 32: 491-494, 1984.

Lipinski M., Braham K., Philip I., Wiels J., Philip T., Ghoridis C.H., Lenoir G., y Tursz T.  
Neuroectoderm associated antigens on Ewing's sarcoma cell lines.  
Cancer Res. 47: 183-187, 1987.

Lipinski M., Braham K., y Tursz T.  
Neuroectodermal traits in Ewing's sarcoma.  
Fed. Proc. 43: 1510, 1984.

Löning T.H., Liebsch J., y Delling G.  
Osteosarcomas and Ewing's sarcomas. Comparative immunocytochemical investigation of filamentous proteins and cell membrane determinants.

Virchows Arch. (Pathol. Anat.) 407: 323-336, 1985.

Luse S.A.

Synaptic structures occurring in a neuroblastoma.  
Arch. Neurol. 11: 185, 1964.

Llombart Bosch A.

Sobre la heterogeneidad del sarcoma de Ewing óseo.  
Caracterización ultraestructural de dos variantes  
morfológicas.

Rev. Esp. Cir. Ost. 13: 303-322, 1978.

Llombart Bosch A., y Blache R.

Über die morphologie und ultrastruktur des Ewing tumors.  
Vehr. Dtsch. Ges. Pathol. 58: 459-466, 1974.

Llombart Bosch A., Blache R., y Peydró Olaya A.

Ultrastructural study of 28 cases of Ewing's sarcoma: Typical  
and atypical forms.

Cancer 41: 1362-1373, 1978.

Llombart Bosch A., Blache R., y Peydró Olaya A.

Round cell sarcomas of bone and their differential diagnosis  
(with particular emphasis on Ewing's sarcoma and  
reticulosarcoma). A study of 233 tumors with optical and  
electron microscopic techniques.

Pathol. Ann. II: 113-145, 1982.

Llombart Bosch A., Contesso G., Henry-Amar M., Lacombe M.J.,  
Oberlin O., Dubouset J., Rouesse J., y Sarrazin D.

Histopathological predictive factors in Ewing's sarcoma of  
bone and clinicopathological correlations.

Virchows Arch. (Pathol. Anat.) 409: 627-640, 1986.

Llombart Bosch A., Perez Bacete M., y Triche T.J.

Immunohistochemische untersuchungen der Ewingsarkome und ihre  
differentialdiagnose gegenüber anderen "small round blue  
cell" Sarcomen des Kindesalters und der jugend.

Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 70: 321-324, 1986.

Llombart Bosch A., Peydró Olaya A., y Gomar F.

Ultrastructure of one Ewing's sarcoma of bone with  
endothelial character and a comparative review of the vessels  
in 27 cases of typical Ewing's sarcoma.

Path. Res. Pract. 167: 71-87, 1980.

Llombart Jr. A., Peydró A., Lopez-Fernandez A., y Zuzuarregui  
C.

Sur les sarcomes reticulaires de la moelle osseuse type  
Ewing. Etude optique, histochemique et electronique de deux  
cas.

Ann. Anat. Pathol. (Paris) 15: 431-452, 1970.

Llombart Bosch A., y Peydró Olaya A.

Scanning and transmission electron microscopy of Ewing's  
sarcoma of bone (typical and atypical variants). An analysis

of nine cases.

Virchows Arch. (Pathol. Anat.) 398: 329-346, 1983.

Llombart Bosch A.

Small round blue cell sarcoma of bone mimicking Atypical Ewing's sarcoma with neuroectodermal features. An analysis of five cases with immunohistochemical and electron microscopical support.

Cancer 1987 (en prensa).

Lloyd R.B., Sisson J.C., Shapiro B., y Verhofstad A.A.J.

Immunohistochemical localization of epinephrine, norepinephrine, catecholamine-synthesizing enzymes and chromogranin in neuroendocrine cells and tumors.

Am. J. Pathol. 125: 45-54, 1986.

Mackay B., Luna M.A., y Butler J.J.

Adult neuroblastoma. Electron microscopic observations in nine cases.

Cancer 37: 1334-1351, 1976.

Mahoney J.P., y Alexander R.W.

Ewing's sarcoma. A light and electron-microscopic study of 21 cases.

Am. J. Surg. Pathol. 2: 283-298, 1978.

Maletz N., Mc Morrow L.E., Alba Grecco M., y Wolman S.R.

Ewing's sarcoma. Pathology, tissue culture and cytogenetics.

Cancer 58: 252-257, 1986.

Maniatis T., Fritsch E.F., y Sambrook T.

Molecular cloning: A laboratory manual.

Cold Spring Harbor, New York, 1982.

Martin S.E., Dwyer A., Kissane J.M. y cols.

Small cell osteosarcoma.

Cancer 50: 990, 1982.

Mason G.A., Hartmercer J., Miller E.J., y Wynne N.A.

Adrenaline secreting neuroblastoma in an infant.

Lancet 2: 322, 1957.

Maurer H.M.

Rhabdomyosarcoma in childhood and adolescence.

En year book Medical Publishers. Chicago. 1978. p.1-36.

Mc Keon C., Thiele C.J., Triche T.J., Ross R.A., Miser J.S., e Israel M.A.

A molecular basis for tumor heterogeneity. New approaches to tumor classification.

Proc. Braunbury Cold Spring Harbor Conf. 1986. (en prensa).

Michitsch R.W., Montgomery K.T., y Melera P.W.

Expression of the amplified domain in human neuroblastoma cells.

Mol. Cell. Biol. 4: 2370-2380, 1984.

Mierau G.

Extraskeletal Ewing's sarcoma (Peripheral neuroepithelioma).  
Ultrastr. Pathol. 9: 91-98, 1985.

Mierau G. W., y Berry P.J.

Small round cell neoplasms: Can electron microscopy and immunohistochemical studies accurately classify them?  
Ultrastr. Pathol. 9: 99-111, 1985.

Miettinen M., Clark R., y Virtanen I.

Intermediate filament proteins in choroid plexus and ependyma and their tumors.  
Am. J. Pathol. 123: 231-240, 1986.

Miettinen M., Lehto V.P., Dahl D., y Virtanen I.

Varyng expression of cytokeratin and neurofilaments in neuroendocrine tumors of human gastrointestinal tract.  
Lab. Invest. 52: 429-436, 1985.

Miettinen M., Lehto V.P., y Virtanen I.

Histogenesis of Ewing's sarcoma. An evaluation of intermediate filaments and endothelial cell markers.  
Virchows Arch. (Cell Pathol.) 41: 277-284, 1982.

Miettinen M., Lehto V.P., y Virtanen I.

Antibodies to intermediate filament proteins in the diagnosis and classification of human tumors.  
Ultrastr. Pathol. 7: 83-107, 1984.

Miettinen M., Lehto V.P., y Virtanen I.

Immunofluorescence microscopic evaluation of the intermediate filament expression of the adrenal cortex and medulla and their tumors.  
Am. J. Pathol. 118: 360-366, 1985.

Misugi K., Misugi N., y Newton W.A.

Fine structural study of neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and pheocromocytoma.  
Arch. Pathol. 86: 160, 1968.

Modesti A., Scarpa S., D'Orazi G., Dominici C., Castello M.A., y Triche T.J.

Synthesis of laminin and fibronectin by Ewing's sarcoma lines.  
Proc. SIOP XVIII: 60, 1985.

Moll R., Lee I., Gould V.E., Berndt A., Roessner A., y Franke W.W.

Immunocytochemical analysis of Ewing's tumors: Patterns of expression of intermediate filaments and desmosomal proteins indicate cell type heterogeneity and pluripotential differentiation.  
Am. J. Pathol. 1987. (en prensa).

Murray M.R., y Stout A.P.

Sympathicoblastoma cultivated in vitro.  
Am. J. Pathol. 23: 429, 1947.

Nascimento A.G., Unni K., Pritchard A.J., Cooper K.L., y Dahlin D.C.

A clinico-pathologic study of 20 cases of large cell (atypical) Ewing's sarcoma of bone.  
Am. J. Surg. Pathol. 4: 29-36, 1980.

Navas Palacios J.J., Aparicio Duque R., y cols.  
On the histogenesis of Ewing's sarcoma. An ultrastructural, immunohistochemical and cytochemical study.  
Cancer 53: 1882-1901, 1984.

Nesland J.M., Sobrinho-Simoes M., Holm R., y Johannessen J.V.  
Primitive neuroectodermal tumor (Peripheral neuroblastoma).  
Ultrastr. Pathol. 9: 59-64, 1985.

O'Connor D.T., Burton D., y Deftos L.J.  
Immunoreactive human chromogranin A in diverse polypeptide hormone producing human tumors and normal endocrine tissues.  
J. Clin. Endocrinol. Met. 57: 1084-1089, 1983.

O'Connor D.T., Burton D., y Deftos L.J.  
Chromogranin A: Immunohistology reveals its universal occurrence in normal polypeptide hormone producing endocrine glands.  
Life Sci. 33: 1657-1663, 1983.

O'Connor D.T., y Deftos L.J.  
Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms.  
N. Engl. J. Med. 314: 1145-1151, 1986.

Osborn M., Altmannsberger M., Shaw G., Shauer A., y Weber K.  
Various sympathetic derived human tumors differ in neurofilament expression. Use in diagnosis of neuroblastoma, ganglioneuroblastoma and pheocromocytoma.  
Virchows Arch. (Cell Pathol. ) 40: 141-156, 1982.

Osborn M., Debus E., y Weber K.  
Monoclonal antibodies specific for vimentin.  
Eur. J. Cell Biol. 34: 137-143, 1984.

Osborn M., Dirk T., Kaser H., Weber K, y Altmannsberger M.  
Immunohistochemical localization of neurofilaments and Neuron Specific Enolase in 29 cases of neuroblastoma.  
Am. J. Pathol. 122: 433-442, 1986.

Osborn M., y Weber K.  
Tumor diagnosis by intermediate filament typing: A novel tool for Surgical Pathology.  
Lab Invest. 48: 372-394, 1983.

Parentes E., y Rubinstein L. J.  
Immunohistochemical recognition of human neuroepithelial

tumors by anti-Leu 7 (HNK-1) monoclonal antibody.  
Acta Neuropathol. (Berlin) 69: 227-233, 1986.

Penfield W.

Tumors of the sheaths of the nervous system.

En Paul B. Hoeber (ed). Cytology and cellular pathology of the nervous system. New York, 1932. p.980-984.

Perez Atayde A.R., Grier H., Weinstein H., Delorey M., Leslie N., y Vawter G.

Neuroectodermal differentiation in bone tumors presenting as Ewing's sarcoma.

Proc. SIOP XVIII: 61, 1985.

Perez Bacete M.J., y Llombart Bosch A.

Estudio inmunohistoquímico comparado de tres antígenos de diferenciación neural (Enolasa neuronal específica, proteína S-100, antígeno HNK-1) en secciones tisulares humanas normales y tumorales.

Hist. Med. II: 3-16, 1986.

Peters M.S., Reiman H.M., y Muller S.A.

Cutaneous extraskelatal Ewing's sarcoma.

J. Cut. Pathol. 12: 476-485, 1985.

Povysil C., y Matejovsky Z.

Ultrastructure of Ewing's tumour.

Virchows Arch. (Pathol. Anat.) 374: 303-316, 1977.

Reynolds C.P., Smith R.G., y Frenkel E.P.

The diagnostic dilemma of the small round cell neoplasm. Catecholamine fluorescence and tissue culture morphology as markers for neuroblastoma.

Cancer 48: 2088-2094, 1981.

Riopelle J.L., y Theriault J.P.

Le rhabdomyosarcome alvéolaire.

Ann. Anat. Path. (Paris) 1: 88-111, 1956.

Roessner A.

Cytogenesis and histogenesis of malignant and semimalignant bone tumors.

En G. Seifert (ed): Progress in Pathology.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 1984. p.81-101.

Roessner A., Voss B., Rauterberg J., Immenkamp M., y Grundmann E.

Biologic characterization of human bone tumors. Ewing's sarcoma. A comparative electron and immunofluorescence microscopic study.

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 104: 171-180, 1982.

Romansky S.G., Crocker D.W., y Shaw K.N.F.

Ultrastructural studies on neuroblastoma. Evaluation of cytodifferentiation and correlation of morphology and biochemical and survival data.

Cancer 42: 2392-2398, 1978.

Rosen N., Reynolds C.P., Thiele C.J., Biedler J.L., y Israel M.A.

Increased N-myc expression following progressive growth of human neuroblastoma.

Cancer Res. 46: 4139-4142, 1986.

Sandberg A.A., y Turc Carel C.

The cytogenetics of solid tumors. Relation to diagnosis, classification and pathology.

Cancer 59: 387-395, 1987.

Schajowicz F.

Ewing's sarcoma and reticulum-cell sarcoma of bone.

J. Bone. Jt. Surg. 41 A: 349-356, 1959.

Schajowicz F., Ackerman L.B., Sissons H.A., Sobin L.H., y Torloni H.

Histological typing of bone tumours: International histological classification tumours (No. 6). Ginebra: World Health Organization: 38. 1972.

Schmidt D., Harms D., y Burdach S.

Malignant peripheral neuroectodermal tumours of childhood and adolescence.

Virchows Arch. (Pathol. Anat.) 406: 351-365, 1985.

Schmidt D., Mackay B., y Ayala A.G.

Ewing's sarcoma with neuroblastoma-like features.

Ultrastr. Pathol. 3: 143-151, 1982.

Schwab M., Alitalo K., y cols.

Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour.

Nature 305: 245-248, 1983.

Seeger R.C., Siegel S.E., y Sidell N.

Neuroblastoma: clinical perspectives, monoclonal antibodies and retinoic acid.

Ann. Int. Med. 97: 873-884, 1982.

Seemayer T.A., Thelmo W.L., Volande R.P., y Wiglesworth F.W.

Peripheral neuroectodermal tumors.

Percept. Pediatr. Pathol. 2: 151-172, 1975.

Sherr Ch.J., y Douglass E.C.

Oncogenes and cytogenetic anomalies in tumor cells.

En Finegold M. (ed): Pathology of neoplasia in children and adolescents. W.B. Saunders Co. 1986. p.18-30.

Shibuya M., Yokota J., y Ueyama Y.

Amplification and expression of a cellular oncogene (c-myc) in human gastric adenocarcinoma cells.

Mol. Cell Biol. 5: 414-418, 1985.

Shimada H., Newton W.A., Soule E., Beltangady M.S., y Maurer H.

Pathology of fatal rhabdomyosarcoma. Report from Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS-I and IRS-II).

Cancer 59: 459-465, 1987.

Sim F.H., Unni K.K., y cols.

Osteosarcoma with small cells simulating Ewing's tumor.

J. Bone Jt. Surg. 61 A: 207, 1979.

Slamon D.J., Clark G.M. y cols.

Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.

Science 235: 177-182, 1987.

Stefani E., Carzoglio M., y cols.

Ewing's sarcoma: Value of tumor necrosis as a predictive factor.

Bull. Cancer (Paris) 71: 16-21, 1984.

Steinert P.M., Jones C.R., y Goldman R.D.

Intermediate filaments.

J. Cell Biol. 99: 22-27, 1984.

Stobbe G.D., y Dargeon H.W.

Embryonal rhabdomyosarcoma of the head and neck in children and adolescents.

Cancer 3: 826-836, 1950.

Stout A.P.

A tumor of the ulnar nerve.

Proc. NY Pathol. Soc. 18: 2-11, 1918.

Stout A.P.

Rhabdomyosarcoma of the skeletal muscles.

Ann, Surg. 123: 447-472, 1946.

Stout A.P., y Murray M. R.

Neuroepithelioma of the radial nerve with a study of its behavior in vitro.

Rev. Can. Biol. 1: 651-659, 1942.

Soule E.H., Newton Jr.W., Moon T., y Tefft M.

Extraskelatal Ewing's sarcoma. A preliminary review of 26 cases encountered in the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study.

Cancer 42: 259-264, 1978.

Takahashi K., Sato T., y Kojima M.

Cytological characterization and histogenesis of Ewing's sarcoma.

Acta Path. Japn. 26: 167-190, 1976.

Towbin H., Staehelin T., y Gordon J.

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354, 1979.

Triche T.J.  
Neuroblastoma. Biology confronts nosology.  
Arch. Pathol. Lab. Med. 110: 994-996, 1986.

Triche T.J., y Askin F.B.  
Neuroblastoma and the differential diagnosis of small round blue cell tumors.  
Hum. Pathol. 14: 596, 1983.

Triche T.J., Askin F.B., y Kissane J.M.  
Neuroblastoma, Ewing's sarcoma and the differential diagnosis of small round blue cell tumors.  
En Finegold M.(ed): Pathology of neoplasia in children and adolescents. W.B. Saunders Co. 1986. p.145-195.

Triche T.J., y Ross W.E.  
Glycogen-containing neuroblastoma with clinical and histopathologic features of Ewing's sarcoma.  
Cancer 41:1425-1432, 1978.

Trojanowski J.Q., Friedman H.S., Burger P.C., y Bigner D.D.  
A rapidly dividing human medulloblastoma cell line (D 283 Med) express all three neurofilament subunits.  
Am. J. Pathol. 126: 358-363, 1987.

Trojanowski J.Q., Lee V.M., y Schlaepfer W.W.  
An immunohistochemical study of human central and peripheral nervous system tumors using monoclonal antibodies against neurofilaments and glial filaments.  
Hum. Pathol. 15: 248-257, 1984.

Tsokos M.  
The role of immunocytochemistry in the diagnosis of rhabdomyosarcoma.  
Arch. Pathol. Lab. Med. 110: 776-778, 1986.

Tsokos M., Howard R., y Costa J.  
Immunohistochemical study of alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma.  
Lab. Invest. 48: 148-155, 1983.

Tsokos M., Linnoila R.I., Chandra R.S., y Triche T.J.  
Neuron Specific Enolase in the diagnosis of neuroblastoma and other small round cell tumors in children.  
Hum. Pathol. 15: 575-584, 1984.

Turc-Carel C., Philip I., Berger M., Philip T., y Lenoir G.M.  
Chromosome study of Ewing's sarcoma cell lines. Consistency of a reciprocal translocation t(11;22)(q24;q12).  
Cancer Genet. Cytogenet. 12: 1-19, 1984.

Valdes Ruiz M., Bigne Pertegaz J., y Llombart Jr. A.  
Las características clínicas y anatomopatológicas de los sarcomas rhabdomyosarcomas alveolares.

Med. Esp. 281: 3-14, 1962.

Vanderheul R.O.  
Histological aspect of osteosarcoma and Ewing's sarcoma.  
Proc. SIOP XVII 1975.

Voss B.L., Pisher T.J., y Bennet Humphrey G.  
Peripheral neuroepithelioma in childhood.  
Cancer 54: 3059-3064, 1984.

Whang-Peng J., Triche T.J., Knutsen T., Miser J., Douglass E.C., e Israel M.A.  
Chromosome traslocation in peripheral neuroepithelioma.  
N. Engl. J. Med. 311: 584-585, 1984.

Whang-Peng J., Triche T.J., y cols.  
Cytogenetic characterization of selected small round cell tumor of childhood.  
Cancer Genet. Cytoget. 21: 185-208, 1986.

Weatherall D.J.  
The new genetics and clinical practice.  
En Oxford University press. 1985. p.99-104.

Weinberg R.A.  
A molecular basis of cancer.  
Scientific American 249: 126-138, 1983.

Wilkins R.M., Pritchard D.J., Oner Burgerd E., y Unni K.K.  
Ewing's sarcoma of bone. Experience with 140 patients.  
Cancer 58: 2551-2555, 1986.

Wilson B.S., y Lloyd R.V.  
Detection of chromogranin in neuroendocrine cells with a monoclonal antibody.  
Am. J. Pathol. 115: 458-468, 1984.

Willis R.A.  
Metastatic neuroblastoma in bone presenting the Ewing's syndrome with a discussion of Ewing's sarcoma.  
Am. J. Pathol. 16: 317-331, 1940.

Willis R.A.  
Pathology of tumours.  
En Butterworth. Washington. 1960. p.691.

Workman M.L., Soukup S., y cols.  
Biologic characteristics of four Ewing's sarcomas.  
Cancer Genet. Cytoget. 15: 215-225, 1985.

Wright J.H.  
Neurocistoma or neuroblastoma, a kind of tumor not generally recognized.  
J. Exp. Med. 12: 556, 1910.

Yunis E.J.

Ewing's sarcoma and related small round cell neoplasms in children.

Am. J. Surg. Pathol. 10 (supl): 54-62, 1986.

Yunis E. J., Agostini R.M., Walpusk J. A., y Hubbard J.D.  
Glycogen in neuroblastomas. A light and electron microscopic study of 40 cases.

Am. J. Surg. Pathol. 3: 313-323, 1979.