

Técnicas especiales en el diagnóstico de tumores óseos

F. J. MARTÍNEZ TELLO

Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Universitario «12 de Octubre». Madrid.

Resumen.—Se hace una exposición del valor actual desde el punto de vista diagnóstico y pronóstico de las técnicas especiales aplicables a los tumores óseos por el patólogo. En histoquímica se resalta el valor práctico de las técnicas de PAS y fosfatasa alcalina para el diagnóstico del sarcoma de Ewing y del osteosarcoma respectivamente. Se comenta el valor de la aplicación de la microscopía electrónica en el diagnóstico de los tumores de células redondas pequeñas (sarcoma de Ewing, tumor neuroectodérmico periférico, linfoma primitivo óseo y metástasis de neuroblastoma y de rhabdomyosarcoma embrionario) y de los sarcomas fusocelulares (fibrosarcoma, leiomyosarcoma embrionario) y de los sarcoma fusocelulares (fibrosarcoma, leiomyosarcoma primitivo de hueso y sarcoma sinovial) y de la aplicación de la inmunocitoquímica en los mismos tópicos así como el diagnóstico diferencial del condrosarcoma, cordoma y metástasis de carcinoma mucosecretor en columna. Se comenta que la citología sólo es válida cuando es utilizada por un patólogo experto en patología tumoral ósea y en citopatología y que su aplicación es muy limitada. Se hace una revisión del valor de los estudios de ploidia con las técnicas de citometría de flujo y estática, resaltando su valor en la valoración pronóstica de ciertos tumores (condrosarcoma; sarcoma de Ewing). Finalmente, se comenta la aplicación diagnóstica de los estudios citogenéticos en el sarcoma de Ewing y el futuro de dichas técnicas de esta patología.

SOPHISTICATED TECHNIQUES FOR THE DIAGNOSIS OF BONE TUMORS

Summary.—In terms of diagnosis and prognosis, the present value of different sophisticated techniques applied for the pathologist on bone tumors is reviewed. Histochemically, alkaline phosphatase and PAS techniques are both very important for the diagnosis of osteosarcoma and Ewing's sarcoma respectively. The value of electronic microscopy and immunohistochemistry for diagnosis of round small cells tumors (Ewing's sarcoma, neuroectodermic tumors, primary bone lymphoma and metastatic neuroblastoma) and fusocellular sarcomas (fibrosarcoma, leiomyosarcoma of bone and synovial sarcoma) is discussed. The differential diagnosis of chondrosarcoma, chordoma and metastatic mucosecretor carcinoma at the spine by using immunohistochemistry is reviewed. The application of cytology is very limited and only useful in the hands of pathologist expert in bone tumors. Recent studies on cellular ploidy using the techniques of flow and static cytometry have shown prognostic value in certain tumors such as chondrosarcoma. The future seems to be cytogenetics as have been demonstrated already for Ewing sarcoma.

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de los tumores óseos sigue basándose en el estudio histológico, apoyado en la clínica

y en la radiología, que le proporciona al patólogo una información indispensable de las características de la anatomía macroscópica de las lesiones. Sin un conocimiento cabal de la clínica y de la radiología, ningún patólogo debe emitir un diagnóstico. Si bien es cierto, que en muchos casos las imágenes histológicas son claramente diagnósticas, la clínica y radiología aportan datos que pueden matizar distintos aspectos diagnósticos y en otros casos se pueden cometer graves errores si no se conocen las características clínico-radiológicas de una determinada lesión.

Correspondencia:

Dr. FRANCISCO J. MARTÍNEZ TELLO
Departamento de Anatomía Patológica
Hospital Universitario «12 de Octubre»
Ctra. de Andalucía, km. 5,400
28041 Madrid

No obstante, el estudio anatomopatológico sigue siendo el único medio diagnóstico de las neoplasias óseas. Sin embargo, aunque la histopatología permite el diagnóstico en más del 95% de los casos, queda una minoría de ellos en los que dicho medio no permite llegar él. En este exiguo número de casos, en los que las limitaciones de la histopatología no permiten alcanzar un diagnóstico, es en los que se puede llegar a él mediante determinadas técnicas especiales. Además, el desarrollo de las nuevas tecnologías incorporadas a los laboratorios de anatomía patológica han ampliado las posibilidades del patólogo en cuanto a proporcionar información de tipo pronóstico.

HISTOQUIMIA

Históricamente, la histoquímica fue una de las primeras técnicas especiales desarrolladas. En la patología tumoral ósea sigue teniendo utilidad en el diagnóstico de los tumores. Schajowicz y Cabrini (1) demostraron la abundancia de glucógeno intracitoplasmático en las células del sarcoma de Ewing y de fosfatasa alcalina en las células del osteosarcoma. Si bien es cierto que posteriormente se ha demostrado que los citoplasmas de las células de otros tumores de células pequeñas del hueso pueden contener glucógeno [condrosarcoma mesenquimal (2, 3), metástasis de neuroblastomas (4) o rhabdomyosarcomas (5)], y que en una minoría de sarcomas de Ewing sus células no contienen glucógeno (6), las técnicas del carmín de Best o del ácido periódico de Schiff (PAS) siguen siendo de gran utilidad. Igualmente ocurre con la detección de fosfatasa alcalina para el diagnóstico de osteosarcoma. En ambos casos, además, se pueden realizar en extensiones citológicas, con lo cual se logran obtener resultados más rápidamente.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Posteriormente surgió la microscopía electrónica que, como en casi todos los campos de la patología, no colmó las esperanzas que en esta técnica se habían puesto, en cuanto a diagnóstico se refiere. Si bien es cierto, que ha contribuido enormemente a un conocimiento más profundo de las neoplasias óseas, son contadas las áreas en las que su contribución puede ser decisiva para el diagnóstico. Hay que recordar que la microscopía electrónica no sirve para distinguir entre benignidad y malignidad en las neoplasias, aunque una serie de características nucleares sean indicatorias de que se trata de células malignas.

La microscopía electrónica puede ser de alguna utilidad en el diagnóstico diferencial de los sarcomas de patrón fusocelular, aunque por razones de incidencia este problema es en los tumores óseos de mucha menor trascendencia que en los tumores de partes blandas. En los tumores óseos se puede circunscribir al diagnóstico diferencial entre el fibrosarcoma y el rarísimo leiomyosarcoma primario de hueso, y cuando el tumor afecta hueso y partes blandas, con el sarcoma sinovial fusocelular monofásico. En los tres casos, las células son fusiformes pero muestran aspectos ultraestructurales diferentes. El leiomyosarcoma (7) presenta características reminiscentes de la fibra muscular lisa normal. Esta se caracteriza porque es una célula fusiforme rodeada individualmente por una lámina externa, con uniones densas, aunque no auténticos desmosomas, y abundantes vesículas pinocitóticas. El citoplasma presenta escasas organelas, fundamentalmente localizadas en los polos nucleares, y abundantes fascículos de filamentos finos (60-70 nm), situados en una disposición más o menos paralela al eje principal de la célula, asociados a cuerpos densos. Los núcleos característicos son fusiformes y presentan extremos romos, así como frecuentes invaginaciones transversales profundas, relacionadas con las contracciones de las fibras de actina. Frecuentemente las células tumorales del leiomyosarcoma pierden, en gran medida, la lámina externa y las vesículas pinocitóticas no son tan abundantes como en las células musculares lisas. Usualmente contienen organelas más abundantes y diseminadas que en el caso de las fibras lisas benignas, especialmente retículo endoplásmico rugoso que en cierto modo puede hacer que se asemejen a los miofibroblastos. No obstante, los miofibroblastos difieren ultraestructuralmente debido a que usualmente tienen filamentos finos más abundantes y muestran más frecuentemente uniones desmosoma-like.

Los fibrosarcomas muestran ultraestructuralmente (8) células de tipo fibroblásticas con núcleos ovales o alargados y marginación de la cromatina. El citoplasma característicamente contiene un RER muy abundante, numerosos filamentos citoplásmicos y muchas mitocondrias. En ellos no se observa lámina externa ni vesículas pinocitóticas.

La sinovial normal no presenta membrana basal y, aunque puede observarse en algunos casos en la interfase entre células epiteliales y células fusiformes en los sarcomas sinoviales bifásicos, no se encuentra en los monofásicos fusiformes. Además, focalmente, y tras exámenes exhaustivos general-

mente, se pueden encontrar espacios intercelulares abortivos con múltiples filopodias, desmosomas pobremente diferenciados y fragmentos de un material semejante a la membrana basal. También se han observado espacios en forma de hendidura en tumores de tipo fibroso monofásico (9).

Es, sin embargo, en el campo de los sarcomas de células redondas en el que la microscopía electrónica no solamente es válida sino esencial en ciertos casos para llegar a un diagnóstico. El estudio ultraestructural permite la diferenciación entre sarcoma de Ewing, condrosarcoma mesenquimal, linfoma óseo y metástasis de neuroblastoma, y rhabdomyosarcoma.

El sarcoma de Ewing típico consta de células de tamaño muy uniforme, núcleos redondeados u ovoides y membranas celulares rectas sin invaginaciones ni microvellosidades (10). La membrana nuclear no muestra indentaciones, la cromatina es fina y usualmente contiene uno o dos nucleolos de tamaño medio. El citoplasma se caracteriza por su escasez en organelas, pero generalmente, en la mayoría de los casos típicos de sarcoma de Ewing, alberga grandes cantidades del glucógeno que desplazan a las escasas organelas citoplásmicas. Esto puede presentarse en forma beta monopartículada o de rosetas alfa. Excepcionalmente se observan escasos filamentos intermedios. Las membranas celulares tienen generalmente uniones primitivas pero no desmosomas.

Con el condrosarcoma mesenquimal, el problema del diagnóstico diferencial puede presentarse si al hacer la biopsia se toma una muestra pequeña que sólo contiene el componente de células indiferenciadas. Ultraestructuralmente (2) este tumor se caracteriza por la presencia de sábanas de células de tamaño y morfología uniformes. Las células son poligonales u ovals. No existe una matriz intercelular o bien ésta es muy escasa. A veces las células tumorales forman nidos de 4 a 6 células que aparecen rodeados por finos fascículos de colágena. Los núcleos de las células son redondeados u ovalados y tampoco muestran indentaciones al igual que en el sarcoma de Ewing. El citoplasma también es escaso y muy pobre en organelas, pero es bastante rico en polirribosomas, lo cual no ocurre en el sarcoma de Ewing. En general, las membranas citoplásmicas son también rectas y sin indentaciones, si bien las células fusiformes pueden tener proyecciones citoplásmicas de tipo dendrítico. Ocasionalmente en los citoplasmas se encuentran pequeñas vacuolas de lípidos y pequeñas cantidades de glucógeno,

así como escasos filamentos (70-100 Å) que no muestran una distribución especial.

Los linfomas muestran una mayor variación en el tamaño de sus células que el sarcoma de Ewing (8). Los núcleos son redondeados, la membrana nuclear tiene frecuentes indentaciones y algunas «nuclear blebs» así como grumos dispersos de heterocromatina y nucleolos de gran tamaño. El citoplasma es más amplio y más rico en organelas que en el caso del sarcoma de Ewing o de las células indiferenciadas del condrosarcoma mesenquimal. Posee abundantes polirribosomas siendo el RER y los lisosomas más prominentes que en los otros tumores. Prácticamente no se encuentra glucógeno en el citoplasma de sus células, si bien se han descrito algunos casos. Pero lo que más diferencia en el estudio ultraestructural las células de los linfomas de las del sarcoma de Ewing y de células del componente pobremente diferenciado del condrosarcoma mesenquimal es que las membranas celulares poseen complejas indentaciones e invaginaciones y no existen uniones primitivas.

Las células de los neuroblastomas (11) son, en general, de mayor tamaño que las células del tumor de Ewing o del condrosarcoma mesenquimal. Sus núcleos son irregulares y sus membranas celulares poseen múltiples proyecciones citoplásmicas que ocupan el espacio intercelular. En el citoplasma se encuentran microtúbulos, gránulos secretorios con membrana que aparecen localizados en el pericarion o en los procesos citoplásmicos, dando lugar a veces a formaciones semejante a las sinapsis. También contienen en los procesos celulares abundantes microtúbulos. Finalmente, reseñar la presencia de abundantes desmosomas entre las células tumorales. En sus citoplasmas es la regla que no se encuentra glucógeno pero también hay casos en que se ha podido observar su presencia (4).

La metástasis de un rhabdomyosarcoma embrionario a hueso es excepcional. Los criterios diagnósticos ultraestructurales para el rhabdomyosarcoma (5) son la presencia de miofilamentos gruesos y finos, lo cual es diagnóstico pero en los tumores muy indiferenciados pueden no hallarse. En general, las células son de mayor tamaño y más irregulares que las del sarcoma de Ewing y, asimismo, muestran núcleos también más irregulares. Ocasionalmente también pueden contener en su citoplasma glucógeno.

En el contexto de los sarcomas de células pequeñas redondas hay que incluir también al tumor neuroectodérmico de hueso (PNET), tumor que había sido descrito ya previamente en partes blan-

das, pero que fue referido en el hueso por primera vez por Jaffe y col. en 1984 (12). Antes de dicha publicación, dichos tumores se habían incluido con los sarcomas de Ewing. La descripción de cuatro casos por estos autores, alentó la hipótesis de que un cierto número de sarcomas de Ewing tuviera un origen neuroectodérmico. A medida que ha pasado el tiempo y que se ha aplicado el estudio ultraestructural e inmunohistoquímico a sarcomas de Ewing, aparentemente típicos, se ha descubierto que tenía alguna diferenciación de esta naturaleza. Desde el punto de vista ultraestructural muchas áreas de tumor neuroectodérmico de hueso aparece completamente indiferenciado. Se pueden hallar acúmulos de glucógeno confluentes como en el Ewing típico. Ocasionalmente se encuentran uniones celulares pobremente formadas de tipo intermedio. En estos tumores se observan procesos que pueden ser escasos o abundantes constituyendo estructuras dendríticas con microtúbulos, neurofilamentos y grupos de gránulos densos. Cuando se encuentran rosetas de Homer Wright aparecen constituidas por un núcleo central de procesos citoplásmicos entrelazados. También se han descrito rosetas verdaderas, gránulos densos aislados en localizaciones centrales endocitoplásmicas, midiendo de 50 a 200 nm y una membrana basal rodeando las células por colágena de largo espacio (Luse bodies) en el intersticio (13).

INMUNOCITOQUIMIA

La inmunocitoquímica ha supuesto un gran avance en la determinación del fenotipo de las células neoplásicas y, por tanto, es aplicable al diagnóstico diferencial en la patología ósea tumoral. Tiene la ventaja sobre la microscopía electrónica que es un método más rápido y económico y no precisa la adquisición de un microscopio electrónico y un ultramicrotomo. Es decir, no precisa la instalación de un laboratorio especial de microscopía electrónica. Su aplicación puede ser decisiva en ciertos casos. Especialmente puede ser útil en el diagnóstico diferencial de los tumores de columna, cuando se plantea el diagnóstico diferencial entre condrosarcoma, cordoma y metástasis de carcinoma mucosecretor en columna, que en ciertas ocasiones puede ser imposible con la histología convencional (14, 15). El condrosarcoma es negativo para la queratina y positivo para la proteína S-100. El carcinoma es, por el contrario, positivo para las queratinas y negativo para la proteína S-100 y el cordoma es positivo para ambos tipos de antisueros.

Al igual que la microscopía electrónica la inmunocitoquímica es útil en el diagnóstico diferencial de los sarcomas de patrón fusocelular y en los de células pequeñas. En cuanto a los sarcomas fusocelulares el leiomioma, puede ser positivo con la desmina, mioglobina y actina (16) y las células del sarcoma sinovial fusocelular monofásico, se tiñen positivamente para la citoqueratina y menos intensamente para el antígeno epitelial de membrana (17), en tanto que el fibrosarcoma es únicamente positivo para la vimentina, que los es también para los otros dos tipos de tumores. En relación con los sarcomas de células redondas se puede hacer mediante la inmunocitoquímica una fácil diferenciación con respecto al linfoma primitivo de hueso por ser sus células positivas para el antígeno leucocitario común (18), y con la infiltración ósea por un rhabdomyosarcoma embrionario, por poder hallarse en sus células positividad para la desmina, mioglobina y actina (19). Con respecto al osteosarcoma de células pequeñas en la mayoría de los casos las células son negativas para todos estos marcadores, y los marcadores de diferenciación neuroectodérmica. El mayor problema está en el diagnóstico diferencial entre los tumores de diferenciación neuroectodérmica. Se ha utilizado una amplia batería de antisueros, entre los que se encuentran la enolasa específica neuronal, Leu-7, sinaptofisina, antígeno de superficie de célula neuronal y proteína de filamentos neuronales, proteína S-100, y cromogranina (12, 13, 20-22). Mediante esta batería de antisueros se puede diferenciar claramente la metástasis del neuroblastoma con respecto al sarcoma de Ewing. Más difícil es la diferenciación entre el tumor primitivo neuroectodérmico de hueso y el sarcoma de Ewing, por lo cual la validez en la distinción entre el sarcoma de Ewing y el tumor neuroectodérmico primitivo, sigue siendo todavía cuestionada por muchos. Por el momento, sin embargo, su distinción parece estar justificada, si nos basamos en una serie de estudios que sugiere una mayor frecuencia de metástasis en el momento del diagnóstico, una respuesta adversa al tratamiento y en definitiva unos resultados de pronóstico más sombrío en aquellos tumores que muestran una clara diferenciación neural, en comparación con el típico sarcoma de Ewing.

Se ha descrito un anticuerpo monoclonal, 5C11, que está dirigido contra una proteína de superficie de la célula del sarcoma de Ewing de un peso molecular de 81000 dalton, que parece distinguir el tumor de otros tumores de células pequeñas, incluído el tumor primitivo de hueso neuroectodérmico

según estudios preliminares (23). Esta técnica, sin embargo, no se puede utilizar a partir de cortes obtenidos de bloques de parafina, ya que mediante la fijación en formalina se pierde la antigenidad de las células, por lo cual sólo puede realizarse en cortes obtenidos con criotomo.

CITOLOGÍA

La citología es aplicable al estudio de los tumores óseos siempre que se den dos condicionamientos imprescindibles: 1) que sea realizada por un citopatólogo experto, que al mismo tiempo sea 2) un experto en patología ósea tumoral. Si un patólogo no posee estos dos requisitos el estudio citológico le puede llevar a errores diagnóstico muy graves y, aún dominando la citopatología y la patología tumoral ósea, su eficacia queda restringida a sólo ciertos campos. Su mayor utilidad es en el diagnóstico de los «sarcomas de células redondas pequeñas». Una ventaja ya mencionada, es que se pueden realizar más rápidamente las técnicas de histoquímica e inmunocitoquímica. Con el material obtenido por punción, también con aguja fina cuando ello sea posible, se pueden hacer inclusiones para microscopía electrónica y realizar un estudio ultraestructural. La información obtenida mediante la citología y las técnicas mencionadas permite a un citopatólogo y patólogo experto en patología tumoral ósea llegar a un diagnóstico en ciertos casos.

TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LA PLOIDIA

La citometría de flujo y la citometría estática se han incorporado a los laboratorios de anatomía patológica. Mediante ambas técnicas se puede estudiar la ploidia de las células de una neoplasia. Su interés se basa en que pueden proporcionar una información importante para ayudar al patólogo y al clínico en definir el grado de malignidad, y por tanto, para predecir el comportamiento biológico de un determinado tumor. La gradación histológica de ciertos tumores es importante en este sentido, pero difícil, y se basa en criterios un tanto subjetivos.

Se ha intentado usar dichas técnicas como un determinante pronóstico del comportamiento biológico en determinados tumores óseos como el condrosarcoma (24) y el osteosarcoma (25), obteniéndose una buena correlación en los condrosarcomas. El valor significativo del contenido de DNA en el sarcoma de Ewing, se ha estudiado con citometría de flujo y citometría estática, hallándose que aquellos pacientes con tumores aneuploides

tuvieron un peor pronóstico. Ambas técnicas resultaron métodos fiables para la obtención de información pronóstica en el sarcoma de Ewing pero la citofotometría in situ proporcionó una discriminación mejor para la supervivencia general que la citometría de flujo (26). Sin embargo, en otro estudio, en tumores periféricos primitivos neuroectodérmicos, el DNA index no predijo la supervivencia (27).

También se ha utilizado dicha técnica como posible predictora para la aparición de metástasis en relación con la presencia de un pico aneuploide. Se ha visto que es un determinante positivo importante para ciertos tumores sólidos y en hueso, especialmente en relación con el mieloma y leucemias (30). Sin embargo, la aparición de aneuploidia no es en sí mismo un hecho ominoso en ciertos neuroblastomas. Paradójicamente, al menos en apariencia, pacientes con osteosarcoma y en el mismo estadio, cuando se compararon los grupos de pacientes aneuploide y euploide con respecto a la supervivencia, demostraron que el grupo aneuploide tuvo un considerable mejor pronóstico. También se demostró una inversa relación entre aneuploidia y desarrollo de metástasis, especialmente en osteosarcomas y no tanto en condrosarcomas (30).

ESTUDIOS CITOGENÉTICOS

Han alcanzado también resultados de interés práctico en el diagnóstico de este grupo de tumores. Así Aurias et al. (29) describieron la translocación cromosómica afectando la banda q12 del cromosoma 22. Realmente el marcador tisular más específico del sarcoma de Ewing y sus congéneres es citogenético y no morfológico. En una serie de 85 casos de sarcoma de Ewing, en 79 de ellos se identificó la translocación estándar 11;22, o una translocación compleja afectando un tercer cromosoma 22q12 y un cromosoma distinto del 11 (30). Se ha detectado en sarcomas de Ewing típicos, en la variante de sarcoma de Ewing atípico, en tumores que presentan cierta diferenciación neural y también en tumores neuroectodérmicos periféricos de hueso. Los patrones de expresión de protooncogenes en el sarcoma de Ewing y en el PNET son aparentemente indistinguibles (30).

Posteriormente Ambros y col. (31) describieron un marcador específico del sarcoma de Ewing y del tumor neuroectodérmico primitivo periférico. Ambos tumores comparten una sobreexpresión del gen pseudoautosoma MIC2, localizado en los brazos cortos de los cromosomas sexuales, con una pro-

ducción resultante de grandes cantidades de una glicoproteína de superficie que puede ser detectada mediante un anticuerpo monoclonal. Los neuroblastomas, sin embargo, no han presentado tinción alguna cuando fueron tratados con este antisuero.

Otro asunto de especial interés es el estudio de las posibles mutaciones del gen P53, situado en el cromosoma 17q13 y su significado en los osteosarcomas humanos. En un estudio de 10 líneas de osteosarcomas humanos xenotrasplantados en ratones atímicos, en 7 casos, de 9 osteosarcomas estudiados, mostraron alteraciones frecuentes del gen p53,

presentando diversos tipos de anomalías en la región analizada del gen: mutaciones puntuales, ausencia de la transcripción o una transcripción anormal. En dicho estudio se halló que la existencia de anomalías en el gen p53 no parecía estar relacionado con el tipo histológico del sarcoma, edad de los pacientes o con su capacidad metastásica. Sin embargo, los osteosarcomas que en dicho estudio presentaron un periodo de supervivencia más largo fueron los que no mostraron alteraciones frente a los que poseían mutaciones o productos de transcripción anormales. En ellos la supervivencia fue significativamente más corta (32).

Bibliografía

- Schajowicz F, Cabrini RL. Histochemical studies of bone in normal and pathological conditions. With special reference to alkaline phosphatase, glycogen and mucopolysaccharides. *J Bone Joint Surg* 1954; 36-B: 474-89.
- Steiner GC, Mirra JM, Bulloug PG. Mesenchymal chondrosarcoma, a study of ultrastructure. *Cancer* 1973; 32: 926-39.
- Martínez-Tello FJ, Navas Palacios JJ. Ultrastructural study of conventional chondrosarcomas and myxoid-and mesenchymal-chondrosarcomas. *Virchows Arch [Path Anat]* 1982; 396: 197-211.
- Triche TJ, Ross WE. Glycogen-containing neuroblastoma with clinical and histopathologic features of Ewing's sarcoma. *Cancer* 1978; 41: 1425-32.
- Amemiya T, Uchida S. Electron microscopic and histochemical studies on embryonal rhabdomyosarcoma of the orbit. *Z Krebsforsch* 1975; 83: 305-11.
- Hartman KR, Triche TJ, Kinsella TJ, Miser JS. Prognostic value of histopathology in Ewing's sarcoma. Long-term follow-up of distal extremity primary tumors. *Cancer* 1991; 67: 163-71.
- Sanerkin NG. Primary leiomyosarcoma of the bone and its comparison with fibrosarcoma: a cytological, histological, and ultrastructural study. *Cancer* 1979; 44: 1375-87.
- Steiner GC. The ultrastructure of bone tumors. En: Bonucci E, Motta PM, eds. *Ultrastructure of skeletal tissues. Bone and cartilage in health and disease*. Boston. Kluwer Academic Publisher, 1990; 271-91.
- Krall RA, Kostianofsky M, Patchefsky AS. Synovial sarcoma. A clinical, pathological and ultrastructural study of 26 cases supporting the recognition of a monophasic variant. *Am J Surg Pathol* 1981; 5: 137-43.
- Llombart-Rosch A, Blache R, Peydro-Olaya A. Ultrastructural study of 28 cases of Ewing's sarcoma: typical and atypical forms. *Cancer* 1978; 41: 1362-73.
- Triche T, Cavazzana A. Round cell tumors of bone. En: Unni KK editor. *Bone tumors*. New York: Churchill Livingstone, 1988; 199-223.
- Jaffe R, Santamaria M, Yunis EJ, Tannery M, Medina J, Goodman M. Neuroendocrine tumor of bone: its distinction from Ewing's sarcoma (Abstr). *Lab Invest* 1984; 50: 5.
- Llombart-Bosch A, Lacombe MJ, Peydro-Olaya A, Pérez-Bacete M, Contesso G. Malignant peripheral neuroectodermal tumours of bone other than Askin's naoplasm: characterization of 14 new cases with immunochemistry and electron microscopy. *Virchows Arch [A]* 1988; 412: 421-30.
- Meis JM, Giraldo AA. Chordoma. An immunohistochemical study of 20 cases. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 553-6.
- Miettinen M, Lehto VP, Dahl I, Virtanen I. Differential diagnosis of chordoma, chondroid, and ependymal tumors as aided by anti-intermediate filament antibodies. *Am J Pathol* 1983; 112: 160-9.
- Myers JL, Arocho J, Bernreuter W, Dunham W, Mazur MT. Leiomyosarcoma of bone. A clinicopathologic, immunohistochemical and ultrastructural study of five cases. *Cancer* 1991; 67: 1051-6.
- Fischer C. Synovial sarcoma: ultrastructural and immunohistochemical features of epithelial differentiation in monophasic and biphasic tumors. *Human Pathol* 1986; 17: 996-1002.
- Fechner RE, Mills SE. Tumors of the bones and joints. En *Atlas of tumor pathology* 8. 3.ª serie Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC 1992; p. 193.
- Eusebi V, Cecarelli C, Schiaffino S, Bussolati G. Immunocytochemistry of rhabdomyosarcoma. The use of four different markers. *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 293.
- Jürgens II, Bier V, Harms D, Beck J, Brandeis W, Estpüler G et al. Malignant peripheral neuroectodermal tumors. A retrospective analysis of 42 patients. *Cancer* 1988; 61: 349-57.
- Swanson PE, Wick MR, Hagan KA, Dehner LP. Synaptophysin in small round cell tumors [Abstr] *Am J Clin Pathol* 1987; 88: 523.
- Tsuneyoshi M, Yokohama R, Hahsimoto H, Enjoji M. Comparative study of neuroectodermal tumor and Ewing's sarcoma of the bone. Histopathologic, immunohistochemical and ultrastructural features. *Acta Pathol Jpn* 1989; 39: 573-81.
- Hara S, Ishii E, Tanaka Y, Yokohama J, Katsumata K, Fujimoto J, Hata J. A monoclonal antibody specifically reactive with Ewing's sarcoma. *Br J Cancer* 1989; 60: 875-9.
- Kreichbergs A, Boquist L, Borssen B, Larsson SE. Prognostic factors in chondrosarcoma. A comparative study of cellular DNA content and clinicopathologic features. *Cancer* 1982; 50: 577-83.

25. **Kreicbergs A, Boström LA, Cavrien G, Einhorn S.** Cellular DNA content in human osteosarcoma. Aspects on diagnosis and prognosis. *Cancer* 1982; 50: 2476.
26. **Dierick AM, Langlois M, Van Oostveldt, Roels H.** The prognostic significance of the DNA content in Ewing's sarcoma: a retrospective cytophotometric and flow cytometric study. *Histopathology* 1993; 23: 333-9.
27. **Swanson PE, Jaszcz W, Nakhleh RE, Kelly DR, Dehner LP.** Peripheral primitive neuroectodermal tumors. A flow cytometric analysis with immunohistochemical and ultrastructural observations. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 1202-8.
28. **Mankin HJ, Matsumo T, Gerbhardt MC, Schiller AL, Rosenberg A.** Flow cytometry in the management of bone tumors. En: *Rone Tumors*, Unni KK editor, Churchill Livingstone, New York, 1988, 85-106.
29. **Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Dubousset J, Mazabraud A.** Chromosomal translocation in Ewing's sarcoma. [Letter] *N Engl J Med* 1983; 309: 496-7.
30. Ewing's sarcoma and its congeners: an interim appraisal. Editorial. *Lancet* 1992; 339: 99-100.
31. **Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar II, Gardner II, Salzer-Kuntschik M.** MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* 1991; 67: 1886-93.
32. **López-Terrada D.** Caracterización morfológica y biológica de diez líneas de osteosarcomas humanos xenotransplantados en ratones atímicos. Un estudio del gen supresor tumoral p53. Tesis Doctoral. Valencia. Universidad de Valencia, 1993.