

Original

Valor pronóstico de la ploidía y del índice de proliferación celular (MIB-1) en 23 rhabdomiosarcomas infantiles

M.P. San Miguel Fraile, R. Carrillo Gijón y A. Candia Fernández

Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid.

SUMMARY

The DNA content and proliferative index of 23 juvenile rhabdomyosarcomas were measured by image analysis and correlated with the clinicopathological features of the lesion, patient survival and disease-free interval. DNA analysis was performed on cytospin single-cell preparations obtained from the paraffin-embedded tissue blocks. The proliferation marker MIB-1 was used on paraffin sections. DNA aneuploidy was detected in 19 tumors (82%). Most of the aneuploid histograms showed an hyperdiploid distribution (15 cases), 2 cases were classified as tetraploid and two others as polyploid. Twelve cases had high MIB-1 index (>25%). Both DNA ploidy and MIB-1 index were not correlated with the histological type (embryonal vs. alveolar). The Kaplan-Meier method showed that patients with hyperdiploid tumors had longer survival ($p<0.01$) and disease-free intervals ($p<0.05$), whereas patients with low MIB-1 index (<25%) had longer disease-free intervals ($p<0.01$).

The results of multivariate analysis indicate that DNA ploidy is the only independent prognostic factor when survival is analyzed, whereas both DNA ploidy and MIB-1 index are independent prognostic indicators for a disease-free interval. These results suggest that DNA ploidy and MIB-1 index should be important parameters for predicting prognosis of juvenile rhabdomyosarcoma. **Rev Esp Patol 1998; 31(3): 227-236.**

Key words: Rhabdomyosarcoma - DNA ploidy - DNA cytometry - Proliferation index - Prognosis

RESUMEN

Se ha estudiado el contenido de DNA y el índice de proliferación celular (IPC), junto a las demás características clinicopatológicas de interés pronóstico, en una serie de 23 rhabdomiosarcomas infantiles. Estos parámetros se han relacionado con la supervivencia y el intervalo libre de enfermedad de los pacientes. El DNA se determinó por citometría estática en preparaciones citológicas realizadas con los núcleos extraídos de los bloques de parafina. Para el IPC se utilizó el anticuerpo MIB-1 en cortes de parafina. Diecinueve tumores fueron aneuploides (82%) y sólo cuatro (18%) diploides. El tipo de histograma aneuploide más frecuente fue el hiperdiploide, que se dio en 15 casos; dos fueron poliploides y dos tetraploides. El IPC fue alto (>25%) en 12 casos y bajo (<25%) en 11. La ploidía y el IPC no mostraron correlación estadística con el tipo histológico embrionario o alveolar. El método de Kaplan-Meier indicó que los pacientes con tumores hiperdiploides tenían una supervivencia ($p<0.01$) y un intervalo libre de enfermedad ($p<0.05$) superiores a los del resto. Además, los casos con IPC bajo (<25%) mostraron un intervalo libre de enfermedad más largo ($p<0.01$).

El análisis multivariable de Cox demostró que la ploidía era el único factor pronóstico independiente cuando se analizaba la supervivencia, mientras que tanto la ploidía como el IPC lo eran frente al intervalo libre de enfermedad. Estos resultados indican que el análisis de la ploidía y del IPC pueden ser importantes para predecir el pronóstico en el rhabdomiosarcoma infantil. **Rev Esp Patol 1998; 31(3): 227-236.**

Palabras clave: Rhabdomiosarcoma - Ploidía - Citometría del DNA - Índice de proliferación celular - Pronóstico

INTRODUCCIÓN

Aunque la supervivencia en el rhabdomioma infantil ha mejorado mucho con el empleo de tratamientos combinados, todavía existe un porcentaje alto de recidivas y casos fatales. A menudo las características clínicas e histológicas no son suficientes para prever el pronóstico de estos tumores. Por este motivo en los últimos años se están buscando nuevos datos pronóstico que permitan predecir la respuesta a la quimioterapia y por lo tanto propiciar tratamientos más selectivos que mejoren la supervivencia de los pacientes.

La ploidía y el índice de proliferación celular (IPC), que figuran entre los factores con importancia pronóstica en otros tumores infantiles, como el neuroblastoma (1) y la leucemia linfoblástica aguda (2), se han estudiado insuficientemente en el rhabdomioma. Según algunos trabajos previos, parece existir una estrecha relación entre el tipo histológico y la ploidía (3-6), de forma que los rhabdomiomas embrionarios son mayoritariamente hiperdiploides mientras los alveolares suelen ser tetraploides. Además, algunos autores han observado que la ploidía es la variable que mejor predice la respuesta al tratamiento, mejor en los casos hiperdiploides que en los tetraploides y diploides (3, 4, 6-8). En cuanto a la proliferación celular, los estudios son escasos y contradictorios (3, 6-9).

El objetivo de este trabajo es investigar el valor pronóstico de ambos parámetros (ploidía y proliferación celular), estudiando su relación con la supervivencia y el intervalo libre de enfermedad, en una serie de 23 rhabdomiomas infantiles. Además se intenta determinar si aportan información suplementaria a los factores pronóstico clásicos (edad, localización, estadio clínico y tipo histológico) mediante un estudio estadístico multivariable.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron retrospectivamente 23 rhabdomiomas diagnosticados en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal entre los años 1979 y 1996 con un seguimiento clínico medio de 103 (216-11) meses. Todos los pacientes se trataron según la estrategia terapéutica de la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica (SIOP) vigente en el momento del diagnóstico (10, 11).

Revisión clinicopatológica

Se revisaron las historias clínicas, recogiendo en todas ellas la edad, el sexo, la localización, el estadio clínico en el momento del diagnóstico y cuando llega al hospital Ramón y Cajal, el tratamiento y la evolución. Se revisaron las preparaciones histológicas, confirmando en todos los casos el diagnóstico histológico. La diferenciación muscular fue comprobada en los casos necesarios mediante técnicas inmunohistoquímicas y en 6 casos por estudio con microscopía electrónica. Se clasificaron histológicamente siguiendo la nueva clasificación internacional (12).

Determinación del DNA

El estudio de la ploidía se realizó con citometría de imagen sobre material incluido en parafina. Para ello se eligió un bloque representativo de cada tumor, del que se extrajeron los núcleos según la técnica de Hedley modificada (13). De las suspensiones nucleares se obtuvieron extensiones citológicas mediante citocentrífuga, que luego se tiñeron con el método estequiométrico de Feulgen utilizando los reactivos de tinción y lavado preparados por Becton-Dickinson (14). En cada tumor se ha determinado el contenido de DNA en más de 150 núcleos de células tumorales; como control interno diploide se ha valorado el DNA nuclear de al menos 20 linfocitos, polimorfonucleares o células estromales, y como control externo se han utilizado hepatocitos de rata preparados por la casa Becton-Dickinson en portas de calibración. Sobre estas portas conteniendo el control externo se depositó la muestra de núcleos de cada tumor y de esta forma se aseguró que los núcleos control y los de la muestra habían sido sometidos a las mismas condiciones durante la tinción. Antes de medir los núcleos tumorales se midieron al menos 20 núcleos del control externo, lo que aseguraba que la tinción realizada estaba en condiciones óptimas. El coeficiente de variación de este control externo no superó en ningún caso el 3%. La cuantificación del DNA se realizó en el analizador de imágenes CAS-200 con el programa Quantitative DNA Analysis.

Los histogramas se clasificaron según el índice de DNA de la población tumoral, *DNA index* (DI), en diploides (DI entre 0,8 y 1,12), hiperdiploides (DI entre 1,13 y 1,79), tetraploides (DI entre 1,80 y 2,12) y poliploides (más de una población tumoral no diploide).

Determinación del índice de proliferación celular

Para la cuantificación de la fracción de crecimiento de la neoplasia se utilizó el anticuerpo MIB-1 de *Immunotech*[®] que reacciona con el antígeno nuclear Ki67 asociado a la proliferación celular. La técnica de inmunohistoquímica se realizó sobre secciones tratadas previamente a la inmunotinción para facilitar el acceso de los anticuerpos a los antígenos tisulares. Se utilizó un método no enzimático (15) de desenmascaramiento de antígenos y se empleó la técnica del complejo avidina-biotina (16). Las secciones de parafina se montaron sobre portas tratados con poli-L-lisina, siendo desparafinadas y rehidratadas en alcohol. Con objeto de inhibir la peroxidasa endógena, las secciones se incubaron en una solución fresca de metanol al 5% de H₂O₂, durante 10-15 minutos, en cámara húmeda. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario diluido adecuadamente en tampón tris-salino durante 30 minutos, se lavaron con TBS durante 5 minutos y se cubrieron con el complejo estrepto-avidina-biotina, marcado con peroxidasa (Strep AB HRP) diluido al 1/250. Tras un nuevo lavado con TBS durante 5 minutos, se incubaron en una solución de Fast Red (*Sigma*[®]) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, tras un último lavado con TBS durante 5 minutos se contrastaron con hematoxilina de Mayer durante 2-5 minutos y se procedió al lavado con agua y diferenciación con alcohol para luego deshidratar, clarificar y montar. Antes de proceder a la cuantificación del IPC, se valoró en todos los casos la calidad de la técnica de inmunohistoquímica y se seleccionaron las áreas con más cantidad de núcleos por campo y mayor actividad proliferativa, evitando mediciones en áreas periféricas, zonas desvitalizadas, con necrosis o artefactos. Se calculó el IPC de cada tumor mediante cuantificación automática, con el analizador de imágenes CAS-200 en el programa de índice de proliferación (*Quantitative proliferation index*). El programa calcula automáticamente el área nuclear positiva en relación con el área nuclear total, expresando el resultado en porcentajes. En cada tumor se han medido como mínimo 1500 células.

Análisis estadístico

En el estudio estadístico se incluyeron las siguientes variables: edad (<10 o >10 años), localización (favorable

o desfavorable), estadio clínico (I, II, III, IV), tipo histológico (embrionario o alveolar), ploidía e IPC. Se consideran localizaciones favorables la órbita, el aparato genitourinario y el aparato gastrointestinal. Son desfavorables las extremidades, el retroperitoneo, la cabeza y el cuello, el tronco y el periné. Para determinar el tipo histológico se siguió la nueva clasificación internacional (12). Se consideran dentro del grupo embrionario los casos con la histología embrionaria clásica y las variantes botrioides y de células fusiformes. La categoría alveolar agrupa a tumores con patrón alveolar o sólido, basándose en criterios citológicos. La ploidía se dividió en dos grupos: hiperdiploides y el resto. No obstante, la relación con la supervivencia y el intervalo libre de enfermedad también se analizó en los cuatro grupos por separado: hiperdiploides, diploides, poliploides y tetraploides. El IPC se estratificó en dos grupos: IPC alto e IPC bajo. Para el punto de corte del IPC se eligió el valor con mayor relación estadística con la supervivencia, que resultó ser el 25%.

La relación estadística entre el tipo histológico, la ploidía y el IPC se analizó mediante el test de χ^2 o la prueba exacta de Fisher.

Para establecer la relación de las seis variables analizadas con la supervivencia y el intervalo libre de enfermedad, se utilizó el método de Kaplan-Meier, y las diferencias en supervivencia e intervalo libre de enfermedad se compararon con el test *log-rank* y χ^2 , considerándose significativos los valores $p < 0.05$.

Para el análisis multivariable se utilizó el modelo de regresión de Cox, en el cual se compararon sólo las variables que en el análisis univariable demostraron una relación estadística con la supervivencia o con el intervalo libre de enfermedad ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Las características clinicopatológicas aparecen en la Tabla 1. La edad de los enfermos oscila entre 1 y 21 años (media 11 años), con una incidencia semejante en ambos sexos. La localización más frecuente es la cabeza y el cuello (8 casos, 34%), y 12 casos (51%) se diagnosticaron predominantemente en estadios clínicos avanzados (estadio III). El tamaño del tumor primario osciló entre 2,5 y 20 cm (media 8,3 cm). El seguimiento clínico está comprendido entre 11 y 216 meses (media 103 meses).

Tabla 1. Datos clinicopatológicos en 23 rhabdomyosarcomas.

	Sexo	
	Hombres (12 casos)	Mujeres (11 casos)
Edad		
<10 años: 14	7	7
>10 años: 9	5	4
Localización		
Favorable: 5	3	2
Órbita: 4	2	2
Paratesticular: 1	1	0
Desfavorable: 18	9	9
Extremidades: 4	0	4
Retroperitoneo: 4	3	1
Cabeza y cuello: 8	4	4
Tronco: 2	2	0
Estadio clínico		
I	3	2
II	3	3
III	6	6
Tipo histológico		
Embrionario	6	8
Alveolar	6	3
Tratamiento combinado	12	11

Hubo recidiva o metástasis en 15 casos (65%), 12 casos murieron a consecuencia del tumor y uno por complicaciones de la quimioterapia, en siete no hubo recidiva ni metástasis. El intervalo libre de enfermedad está comprendido entre 1 y 48 meses (media 11,3 meses).

El tipo histológico fue embrionario en 14 casos (60%) y alveolar en 9 casos (40%). En los 23 casos se obtuvo un histograma valorable del contenido del DNA

nuclear. Según el tipo de histograma 15 casos fueron hiperdiploides, 4 diploides, 2 poliploides y 2 tetraploides. Doce casos tuvieron un IPC alto (>25%) y 11 bajo (<25%). No se demostró relación estadística entre la ploidía e IPC y el tipo histológico (Tabla 2).

El estudio estadístico de la relación entre las seis variables analizadas y la supervivencia e intervalo libre de enfermedad se refleja en la Tabla 3. Los factores relacionados con la supervivencia fueron la localización ($p=0.02657$), la ploidía dividida en cuatro grupos ($p=0.00019$) y la ploidía dividida en dos grupos ($p=0.00755$). La supervivencia más elevada la tuvieron los tumores hiperdiploides y en orden decreciente los tetraploides, diploides y poliploides (Fig. 1). Cuando se compararon los tumores hiperdiploides con el resto también se obtuvo una diferencia significativa de la supervivencia a favor de los primeros (Fig. 2).

Los factores relacionados con el intervalo libre de enfermedad fueron la ploidía dividida en cuatro grupos ($p=0.00001$), la ploidía dividida en dos grupos ($p=0.02381$) y el IPC ($p=0.00601$). El intervalo libre de enfermedad más largo lo tuvieron los tumores hiperdiploides y, en orden decreciente, diploides, tetraploides y poliploides. Cuando se compararon en dos grupos (hiperdiploides frente al resto), los tumores hiperdiploides presentaron un intervalo libre de enfermedad superior al de los demás. Los tumores de IPC <25% presentaron un intervalo libre de enfermedad superior al de los tumores con un IPC >25% (Fig. 3).

El análisis multivariable de Cox demostró que la ploidía es el único factor pronóstico independiente cuando se analiza la supervivencia ($p=0.01334$). En el estudio del intervalo libre de enfermedad, tanto la ploidía

Tabla 2. Rhabdomyosarcomas: correlación de la ploidía y el índice de proliferación con el tipo histológico.

	Embrionario (n=14)	Alveolar (n=9)	Total	p
Ploidía				
Hiperdiploides	9	6	15	0.6325885
No hiperdiploides	5	3	8	
Diploides	1	3	4	
Poliploides	2	0	2	
Tetraploides	2	0	2	
IPC				
MIB-1 >25%	7	5	12	0.5666308
MIB-1 <25%	7	4	11	

Tabla 3. Rhabdomyosarcomas: resultados del análisis estadístico comparando las variables con la supervivencia y el intervalo libre de enfermedad (Kaplan-Meier).

	Supervivencia (p)	Intervalo libre de enfermedad (p)
Edad	0.735503	0.185197
Localización	0.026575	0.794278
Estadio clínico	0.337408	0.752519
Tipo histológico	0.667512	0.944170
Ploidía (4 grupos)	0.000191	0.000017
Ploidía (hiperdiploides-resto)	0.007554	0.023813
IPC	0.574954	0.006018

(p=0.03162) como el IPC (p=0.01112) permanecían como factores pronóstico independientes.

DISCUSIÓN

La ploidía es un factor pronóstico de máxima importancia en dos tumores infantiles: el neuroblastoma y la leucemia linfoblástica aguda. Desde hace tiempo se sabe que los neuroblastomas con contenido de DNA aneuploide tienen una buena respuesta a la quimioterapia, incluso en estadios clínicos avanzados (1, 17). Los estu-

dios más recientes indican que la amplificación del oncogén *N-myc* en el genoma tumoral y el índice de DNA son los factores más importantes y con valor pronóstico independiente para predecir el pronóstico de los neuroblastomas (18, 19).

En la leucemia linfoblástica aguda, el número de cromosomas en los blastos tumorales, y por tanto el contenido de DNA, son conocidos desde hace tiempo como factores primordiales en el pronóstico (2). Los casos con blastos de más de 51 cromosomas tienen una buena respuesta al tratamiento (20), y esto corresponde exactamente a un índice de DNA de 1,16 (2). Así pues, la determinación de la ploidía se ha convertido, junto al cariotipo y el recuento de blastos en sangre periférica, en una prueba analítica de primer orden en los niños con leucemia linfoblástica aguda (20).

En otros tumores infantiles como el sarcoma de Ewing o el meduloblastoma, los resultados han sido menos concluyentes (21, 22).

En el rhabdomyosarcoma infantil los primeros estudios de cuantificación del DNA se realizaron en series muy reducidas, y parecían indicar una escasa utilidad pronóstica de esta técnica, ya que obtenían un porcentaje muy elevado de aneuploidía (23-26). Otros estudios previos que investigaron el valor pronóstico de la ploidía en los rhabdomyosarcomas comprendían series

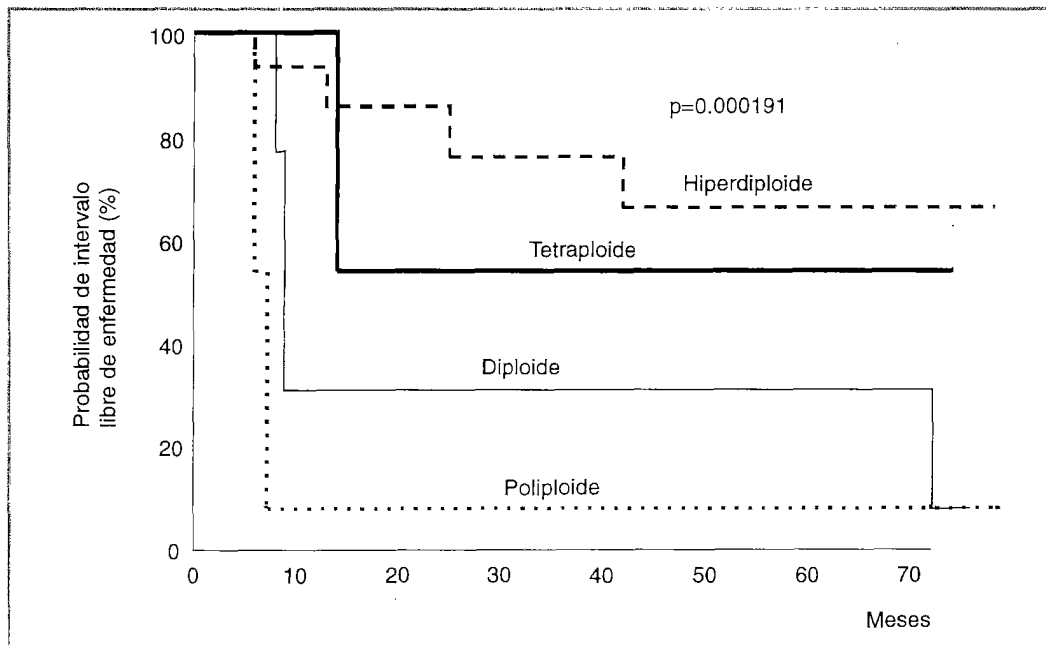


Figura 1. Supervivencia acumulada según el tipo de histograma del contenido de DNA.

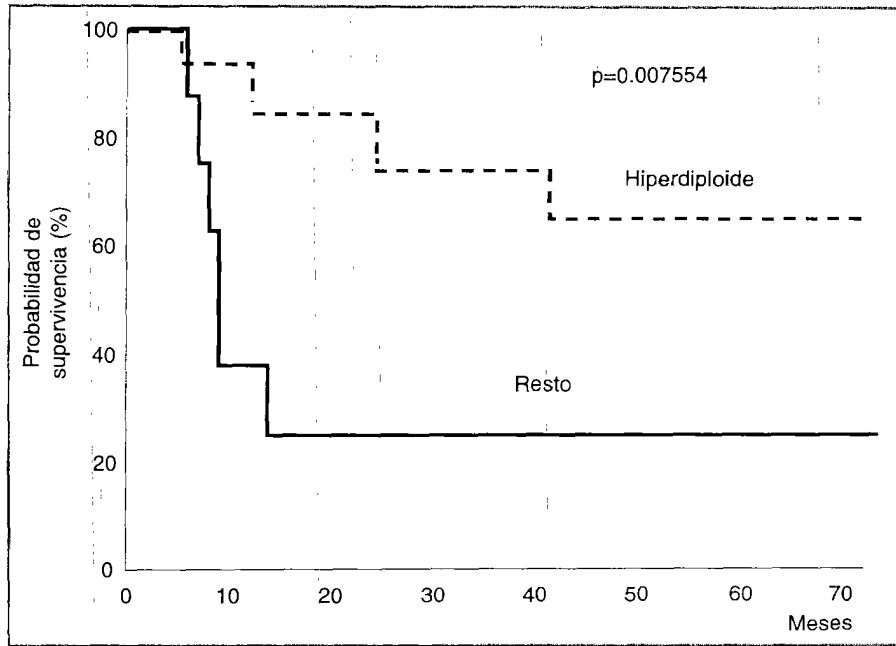


Figura 2. Supervivencia acumulada agrupando los histogramas del contenido de DNA en hiperdiploides frente al resto (diploides, tetraploides o poliploides).

cortas o heterogéneas, considerando a la vez otros sarcomas infantiles o incluyendo rhabdomiosarcomas del adulto (5, 25, 27, 28), por lo que sus resultados no son consistentes.

En dos trabajos consecutivos con rhabdomiosarcomas infantiles en estadio III (3, 4) se observó una estrecha relación entre el contenido de DNA, el tipo histológico y el pronóstico. Los rhabdomiosarcomas de tipo embrio-

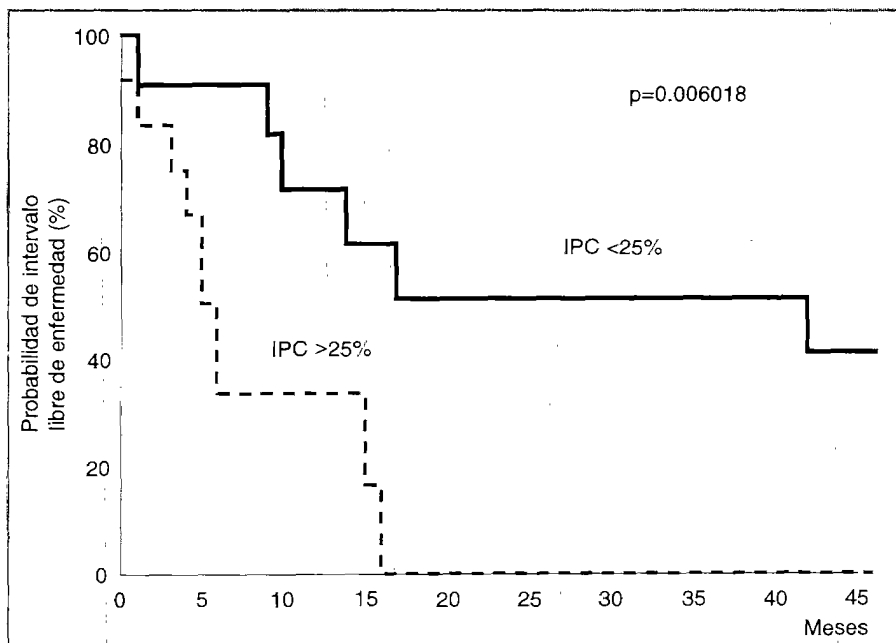


Figura 3. Supervivencia acumulada según el índice de proliferación celular (IPC).

nario se asociaban de forma casi exclusiva con un contenido de DNA hiperdiploide (índices de DNA comprendidos entre 1,10 y 1,80) que conllevaba un pronóstico favorable. Por el contrario, un contenido de DNA casi tetraploide (índices de DNA entre 1,80 y 2,60) estaba fuertemente asociado a un patrón histológico alveolar y a una evolución desfavorable. Según estos estudios, la ploidía se configuraba como el factor que mejor predecía la respuesta al tratamiento y abría el camino hacia nuevos protocolos terapéuticos (3, 4).

Sólo existen tres publicaciones previas, con series amplias y estudios estadísticos multivariados, que investigan el valor pronóstico de la ploidía frente a los demás factores clinicopatológicos en los rhabdomyosarcomas infantiles (6-8). En los tres estudios se confirma, como en el nuestro, que el contenido de DNA tiene una influencia independiente sobre la supervivencia de los rhabdomyosarcomas. Nuestros resultados y los de estas series demuestran que los tumores hiperdiploides tienen un mejor pronóstico que los diploides y tetraploides. En nuestro estudio, así como en el de Wijnaendts (7), se ha separado además un grupo de casos que presentan numerosas poblaciones aneuploides que, comparativamente, tienen el peor pronóstico. En los restantes estudios, o no encuentran este tipo de histogramas poliploides (6, 8) o los clasifican de acuerdo con el índice de DNA del pico situado más a la izquierda, que a veces es diploide o hiperdiploide (3, 4).

De cualquier forma, parece claro que en los rhabdomyosarcomas el estudio de la ploidía con fines pronóstico no puede limitarse a separar los casos aneuploides de los diploides, como se planteaba en las primeras publicaciones sobre el tema, sino que los tumores deben clasificarse en una de las cuatro categorías definidas según el tipo de histograma (diploide, hiperdiploide, tetraploide o poliploide). Con nuestros resultados hemos comprobado cómo la significación pronóstica de la ploidía cuando se separa en estos cuatro grupos supera incluso la que se obtiene cuando se compara la supervivencia de los hiperdiploides con el resto. Esto sugiere que puede haber al menos tres categorías biológicas diferentes de rhabdomyosarcomas (diploide, hiperdiploide y tetraploide) con distinto pronóstico, de forma similar a lo que ocurre en otros tumores. En el neuroblastoma el cariotipo tetraploide tiene una evolución diferente del hiperdiploide, lo que traduce un mecanismo diferente de progresión tumoral: los tetraploides se originan por endorreducción a

partir de una línea celular diploide (29), hecho que también puede ocurrir en el rhabdomyosarcoma.

En nuestro trabajo también hemos demostrado una influencia significativa de la ploidía en el intervalo libre de enfermedad, lo que no se había estudiado previamente. Dicho intervalo resultó máximo en los casos hiperdiploides y mínimo en los poliploides. En los rhabdomyosarcomas es un parámetro que define fielmente la evolución clínica, puesto que los casos fatales se caracterizan por presentar recidivas tempranas, como consecuencia del fracaso del tratamiento. Al analizar el intervalo libre de enfermedad se corrige parcialmente el insuficiente seguimiento clínico de los casos más recientes.

El análisis del DNA por citometría de imagen en material fijado e incluido en parafina tiene, sin embargo, sus limitaciones y problemas. Está ampliamente demostrado en la literatura (30, 31) que, para el análisis de la ploidía, la citometría de imagen es una técnica comparable a la citometría de flujo, superior incluso a ésta en sensibilidad a la aneuploidía (5), siempre y cuando se realice sobre núcleos completos extraídos del bloque de parafina y no sobre secciones histológicas. Sin embargo, la digestión enzimática del material de archivo, en condiciones previas de fijación incontrolables, produce artefactos que pueden llegar a desvirtuar algunos histogramas. No obstante, los estudios comparativos de citometría en material fresco y parafina (32) han respaldado desde hace tiempo la técnica enzimática de Hedley (13) para la cuantificación del DNA en material incluido en parafina.

Un problema más grave consiste en las variaciones del contenido del DNA que pueden ocurrir dentro de un mismo tumor como resultado de la heterogeneidad regional. Este hecho se produce hasta en un 20% a 30% de algunos tumores (32) y su incidencia en el rhabdomyosarcoma está por estudiar.

La influencia de la actividad proliferativa en el pronóstico de los rhabdomyosarcomas se ha estudiado relativamente poco. En tres estudios de citometría de flujo que incluyen la fase S en el análisis multivariable de supervivencia (6-8), se demuestra que la fase S es un factor pronóstico significativo, que resulta ser independiente en dos de ellos (6, 8). En las tres series (6-8), los rhabdomyosarcomas con fase S superior al 14% o 15% tenían menor supervivencia. No obstante, estos resultados deben considerarse con cautela, ya que la estimación de la actividad proliferativa mediante cuantificación de la

fase S en citometría de flujo aún tiene mayores problemas que la determinación del índice de DNA. Esto es así especialmente en material incluido en parafina, debido a la gran cantidad de detritos celulares que reducen la exactitud de la medición (8).

Por lo que sabemos hasta el día de hoy, un solo estudio (9) ha analizado la influencia de la actividad proliferativa en la supervivencia de los rhabdomiosarcomas determinando el IPC con el marcador MIB-1. Este estudio, al igual que el nuestro, no encontró una relación estadística entre el IPC y la supervivencia, pero no analizó su posible relación con el intervalo libre de enfermedad, que en nuestros resultados fue altamente significativa, ni determinó el punto de corte con un mayor significado estadístico.

Estos resultados, que señalan un peor pronóstico para los casos con actividad proliferativa elevada, contradicen la teoría expresada por Shapiro (3), según la cual el mal pronóstico de los casos diploides estaría relacionado con una baja proporción de células en proliferación, que son las sensibles a la quimioterapia.

Con respecto a la relación entre la ploidía y el tipo histológico, nuestros resultados no reflejan la estrecha asociación detectada por Shapiro (3). El autor encontró que 15 de sus 24 rhabdomiosarcomas embrionarios eran hiperdiploides (62%), mientras 10 de los 13 alveolares presentaban un contenido tetraploide (76%). En nuestra serie, 9 de los 14 casos embrionarios eran hiperdiploides (64%) pero ninguno de los nueve alveolares fue tetraploide. A excepción de una serie relativamente corta y heterogénea (5) que encuentra unos porcentajes similares a los de Shapiro, en los restantes estudios sobre este tema (6-8) los porcentajes se aproximan más a los obtenidos por nosotros: mientras el de tumores hiperdiploides entre los rhabdomiosarcomas embrionarios se confirma entre el 60% y 70% (6-8), el porcentaje de tumores tetraploides entre los rhabdomiosarcomas alveolares oscila entre un 18% y un 8% (6-8). En uno de estos trabajos (7) los resultados se aproximan mucho a los nuestros: de 14 tumores con histología alveolar, sólo uno presentó un histograma tetraploide.

Estas discrepancias pueden reflejar diferencias en la clasificación histológica empleada y en los criterios para analizar los histogramas. Ya hemos observado que los casos con numerosas poblaciones tumorales detectadas en la citometría fueron arbitrariamente clasificados por Shapiro de acuerdo al DI de la población situada más a

la izquierda, lo cual elimina automáticamente la categoría poliploide.

Según algunos autores, la actividad proliferativa se correlaciona con el tipo histológico (6, 8) y la ploidía (6): será mayor la actividad proliferativa en los rhabdomiosarcomas alveolares diploides o tetraploides que en los embrionarios hiperdiploides. Nuestro estudio y otro previo (9) no demostraron una relación estadística entre la actividad proliferativa y el tipo histológico.

De las cuatro variables clinicopatológicas analizadas en nuestro estudio estadístico (edad, localización, estadio clínico y tipo histológico), solamente la localización se relacionó con la supervivencia y ninguna con el intervalo libre de enfermedad.

La edad es un factor pronóstico discutido en los rhabdomiosarcomas (8, 33), que posiblemente está asociado al tipo histológico, pues los rhabdomiosarcomas de niños mayores de 10 años son mayoritariamente alveolares (33).

La localización es otro de los datos pronóstico clásicos en el rhabdomiosarcoma (33-35), aunque las diferencias a la hora de agrupar los casos en localizaciones favorables y desfavorables dificultan la comparación de los diferentes resultados. Nosotros hemos seguido el criterio empleado en el Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (12), mientras otros estudios multivariados de supervivencia agrupan la localización en genitourinario/resto (6), o de miembros/resto (8) o no especifican este detalle (7).

El estadio clínico es, como ocurre en general con todos los tumores malignos, un factor pronóstico muy importante en los rhabdomiosarcomas (33-35). El pequeño tamaño de nuestra serie, unido al escaso número de tumores en estadios I y IV (5 y ningún caso, respectivamente), y al hecho de no haber estratificado los resultados, como hacen algunos autores (7, 8), puede justificar nuestros resultados, que son similares a los de otros estudios multivariados (6).

De los factores pronóstico clásicos, probablemente es el tipo histológico el que ha recibido mayor atención en los últimos años (12, 36). Sin embargo, pocos artículos sobre factores pronóstico de los rhabdomiosarcomas especifican la clasificación histológica empleada. En las clasificaciones más actuales (12, 37) se reconoce la variante alveolar sólida del rhabdomiosarcoma, que implica el mismo pronóstico desfavorable que la alveolar clásica. En el trabajo de Shapiro (3) las referencias histológicas en su material y métodos hacen suponer que

esta variante sólida no fue considerada. Otros trabajos sobre ploidía en los rhabdiosarcomas (5, 7) utilizan diferentes subtipos y variantes histológicas sin agruparlos en tipo embrionario (favorable) y tipo alveolar (desfavorable). De Zen (6) demostró recientemente un aumento progresivo de la supervivencia en los enfermos con rhabdiosarcoma alveolar (33%), embrionario (58,8%) y botrioide (100%), aunque sin asociación estadística significativa. En nuestro estudio tampoco encontramos una relación estadística entre el tipo histológico y el pronóstico, lo cual puede estar justificado por el pequeño tamaño de la muestra y la gran heterogeneidad de este tumor.

En conclusión, el contenido de DNA y el IPC aportan información pronóstica adicional a los factores pronóstico clásicos, fundamentalmente a la clasificación histológica actual. Además, según nuestra experiencia, la ploidía y el IPC pueden ser particularmente útiles en casos de histología límite, en los cuales la clasificación como alveolar sólido o embrionario de citología agresiva puede resultar muy subjetiva.

La determinación del contenido de DNA por citometría estática o de flujo no es una técnica compleja, aunque requiere un equipamiento que no está al alcance de todos los laboratorios de anatomía patológica. Sin embargo, si nuestros resultados se confirman y la ploidía resulta ser un factor decisivo en el pronóstico de los rhabdiosarcomas, estaría justificada su determinación en centros de referencia, especialmente en casos difíciles de clasificar histológicamente como favorables o desfavorables.

BIBLIOGRAFÍA

1. Look AT, Hayes FA, Nitschke RN, McWilliams NB, Green AA. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med* 1984; 4: 231-235.
2. Look AT, Roberson PK, Williams DL y cols. Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1985; 65: 1079-1086.
3. Shapiro DN, Parham DM, Douglass EC y cols. Relationship of tumor cell ploidy to histologic subtype and treatment outcome in children and adolescents with unresectable rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 1991; 9: 159-166.
4. Pappo AS, Crist WM, Kuttesch J y cols. Tumor-cell DNA content predicts outcome in children and adolescents with clinical group III embryonal rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1901-1905.
5. Kilpatrick SE, Teot LA, Geisinger KR y cols. Relationship of DNA ploidy to histology and prognosis in rhabdomyosarcoma. *Cancer* 1994; 74: 3227-3233.
6. De Zen L, Sommaggio A, D'Amore L y cols. Clinical relevance of DNA ploidy and proliferative activity in childhood rhabdomyosarcoma: A retrospective analysis of patients enrolled onto the Italian Cooperative Rhabdomyosarcoma Study RMS88. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1198-1205.
7. Wijnaendts LCD, Van der Linden JC, Van Diest PJ y cols. Prognostic importance of DNA flow cytometric variables in rhabdomyosarcomas. *J Clin Pathol* 1993; 46: 948-952.
8. Niggli FK, Powell JE, Parkes SE y cols. DNA ploidy and proliferative activity (S-phase) in childhood soft-tissue sarcomas: Their value as prognostic indicators. *Br J Cancer* 1994; 69: 1106-1110.
9. Noguchi S, Tamiya S, Nagoshi M, Suita S, Fukuda T, Tsuneyoshi M. Nuclear morphometry and the MIB-1 index in rhabdomyosarcoma. *Mod Pathol* 1996; 9: 253-260.
10. Flamant F, Hill C. The improvement in survival associated with combined chemotherapy in childhood rhabdomyosarcoma: A historical comparison of 345 patients in the same center. *Cancer* 1984; 53: 2417-2421.
11. Carli M, Pinkerton R, Frascella E. Intensive chemotherapy for metastatic sarcoma in children. *SIOP European Intergroup Study MMT89*. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1993; 12: 410.
12. Newton WA, Gehan EA, Webber BL y cols. Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. *J Clin Oncol* 1995; 15: 1073-1085.
13. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor W, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *Histochem Cytochem* 1983; 31: 1333-1335.
14. Koss LG, Czerniak B, Herz F, Wersto R. Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: A critical appraisal. *Hum Pathol* 1989; 20: 528-546.
15. Shi RR, Key ME, Kaira K. Antigen retrieval in formalid-fixed, paraffin embedded tissues and enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 741-748.
16. Cattoretti G, Becker MHG, Key G y cols. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168: 357-363.
17. Oppedal BR, Storm-Mathisen I, Lie SO, Brandtzaeg P. Prognostic factors in neuroblastoma. Clinical, histopathologic, and immunohistochemical features and DNA ploidy in relation to prognosis. *Cancer* 1988; 62: 772-780.
18. Bourhis J, De Vathaire F, Wilson GD y cols. Combined analysis of DNA ploidy index and N-myc genomic content in neuroblastoma. *Cancer Res* 1991; 15: 33-36.
19. Brodeur GM, Azar C, Brother M y cols. Neuroblastoma affect of genetic factors on prognosis and treatment. *Cancer* 1992; 70: 1685-1694.
20. Jackson JF, Boyett J, Pullen J y cols. Favorable prognosis associated with hyperdiploidy in children with acute lymphocytic leukemia correlates with extra chromosome 6. *Cancer* 1990; 15: 1183-1189.
21. Dierick AM, Langlois M, Van Oostveldt P, Roels H. The prognostic significance of the DNA content in Ewing's sarcoma: A retrospective

- cytophotometric and flow cytometric study*. *Histopathology* 1993; 23: 333-339.
22. Zerbini C, Gelber RD, Weinberg D y cols. *Prognosis factors in medulloblastoma, including DNA ploidy*. *J Clin Oncol* 1993; 4: 616-622.
 23. Boyle ET, Remain HM, Kramer SA. *Embryonal rhabdomyosarcoma of bladder and prostate: Nuclear DNA patterns studied by cytometry*. *J Urol* 1988; 140: 1119-1121.
 24. Molenaar WM, Dam Meiring A, Kamps WA, Cornelisse CJ. *DNA aneuploidy in rhabdomyosarcoma as compared with other sarcomas of childhood and adolescence*. *Hum Pathol* 1988; 19: 573-579.
 25. Kowal-Vern A, González-Crussi F, Turner J. *Flow and image cytometric DNA analysis in rhabdomyosarcoma*. *Cancer Res* 1990; 50: 6023-6027.
 26. El-Naggar A, Batsakis JG, Ordóñez NG. *Rhabdomyosarcoma of the adult head and neck: A clinicopathological and DNA ploidy study*. *J Laryng Otol* 1993; 107: 716-720.
 27. Algevard TA, Berg NO, Baldetorp B. *Cellular DNA content and prognosis of high-grade soft tissue sarcoma. The Scandinavian Sarcoma Group experience*. *J Clin Oncol* 1990; 8: 538-547.
 28. Dias P, Kumar P, Marsden HB, Gattamaneni HR, Kumar S. *Prognostic relevance of DNA ploidy in rhabdomyosarcoma and other sarcomas of childhood*. *Anticancer Res* 1992; 12: 1173-1177.
 29. Kusafuka T, Fukuzawa M, Oue T, Yoneda A, Okada A, Satani M. *DNA flow cytometric analysis of neuroblastoma: Distinction of tetraploidy subset*. *J Pediatr Surg* 1994; 29: 543-547.
 30. Lanigan D, McLean PA, Curran B, Leader M. *Comparison of flow and static image cytometry in the determination of ploidy*. *J Clin Pathol* 1993; 46: 135-139.
 31. Bauer TW, Tubbs RR, Edinger MD, Suit PF, Gephardt GN, Levin HS. *A prospective comparison of DNA quantitation by image and flow cytometry*. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: 322-326.
 32. Kallioniemi OP. *Comparison of fresh and paraffin-embedded tissue as starting material for DNA flow cytometry and evaluation of intratumor heterogeneity*. *Cytometry* 1988; 9: 164-169.
 33. Donaldson SS, Belli JA. *A rational clinical staging system for childhood rhabdomyosarcoma*. *J Clin Oncol* 1984; 2: 135-139.
 34. Lawrence W, Gehan EA, Hays DM, Beltangady M, Maurer HM. *Prognostic significance of staging factors of the UICC staging system in childhood rhabdomyosarcoma: A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRSII)*. *J Clin Oncol* 1987; 5: 46-54.
 35. Crist W, Gehan A, Ragad AH y cols. *The third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study*. *J Clin Oncol* 1995; 13(3): 610-630.
 36. Coffin CM. *The new international rhabdomyosarcoma classification, its progenitors and considerations beyond morphology*. *Advances in Anatomic Pathology* 1997; 1: 1-16.
 37. Tsokos M, Webber BL, Parham DM y cols. *Rhabdomyosarcoma: A new classification scheme related to prognosis*. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 847-856.