



## IV CONGRESO VIRTUAL HISPANOAMERICANO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

*Presentación*

*Volver al  
Índice*

*Volver al  
Inicio*

Conferencia Invitada:

**SARCOMA DE EWING Y TUMOR  
NEUROECTODERMICO  
PRIMITIVO PERIFERICO DE  
HUESO Y PARTES BLANDAS.**

**Antonio Llombart Bosch**

Departamento de Patología. Facultad  
de Medicina. Servicio de Anatomía  
Patológica.

Hospital Clínico Universitario.

Universidad de Valencia

Valencia. España

Bajo el término de sarcoma de Ewing (Es) incluimos a un grupo heterogéneo de neoplasias formadas por células redondas de pequeño tamaño, que ofrecen localizaciones anatómicas muy diversas, afectando preferentemente al hueso pero también apareciendo en partes blandas y en distintos órganos (ovarios, testes, riñón, pulmón, mediastino, dermis, etc.).

Significa uno de los tipos histológicos mas

indiferenciados de tumor maligno, habiéndose propuesto numerosas hipótesis histogénicas. Entre todas existe una preferente concordancia para aceptar que estas células redondas y pequeñas (srct) entrarían dentro de la categoría de aquellas derivadas de la cresta neural y tendrían un carácter neuroectodérmico, semejando a los neuroepiteliomas periféricos (pPNET) si bien expresando un diverso grado de diferenciación y variable capacidad madurativa, lo que condiciona un cierto grado de heterogeneidad fenotípica. Ella se va a manifestar por una complicada diversidad histológica y también con una expresión genética compleja, que causa en última instancia una clínica variada, aunque siempre muy maligna.

A pesar de los logros obtenidos en el tratamiento de estos tumores, su pronóstico continua siendo infausto en un buen número de casos. El estudio de factores predictivos pronósticos es por tanto importante tanto a nivel morfológico como genético y de biología molecular. También se hace necesario el ensayo de nuevas aproximaciones terapéuticas, distintas de las empleadas en la actualidad.

### **Aspectos históricos. Perspectivas presentes**

En 1921 James Ewing comunicó a la New York Society of Pathology sus observaciones sobre 7 casos de sarcomas no osteogénicos del hueso diagnosticados en pacientes jóvenes. El tumor infiltraba la cortical y se extendía hasta el canal medular así como rompiendo periostio afectaba partes blandas teniendo una alta incidencia metastática. Aunque era un tumor muy radiosensible, mostraba tendencia a recurrir.

En una segunda publicación en 1924, recogía 30 casos

insistiendo en que la imagen histológica constituía un problema muy complejo. Suponía que esta neoplasia constituía una nueva entidad clínico-patológica, posiblemente iniciada a expensas del componente vascular óseo y consiguientemente lo diagnóstico como un "endotelioma de hueso".

Estos hallazgos serían confirmados en 1928 por el patólogo francés Charles Oberling, quien defendería que el "sarcoma de Ewing" como él así lo denominaría, derivaba de una célula mesenquimal pluripotencial de la médula ósea, en cierto modo equiparable con las células reticulares primitivas multipotentes propuestas por Maximow. Entre otras posibilidades tendría una capacidad prospectiva endotelial.

El tumor fue motivo de fuerte controversia en los años 1930-1940 por cuanto Willis (1940) defendió la posibilidad de que en realidad el Es no fuera sino la expresión local de la metástasis de un neuroblastoma (Nb) oculto, basándose no solo en su heterogeneidad histológica sino también en su presencia multiorgánica así como en su extrema semejanza con los neuroblastomas indiferenciados de la infancia. Arthur Pourdy Stout en New York (1944), utilizando cultivos de tejidos, defendería la independencia biológica del Es y su diferencia frente a los Nb en contra del criterio de Willis.

En los años 50, Fritz Schajowicz (1956, 1959) publicó en Argentina una serie de trabajos relacionados con este tumor así como con los entonces denominados por J. Stewart "Sarcomas reticulares de la médula ósea" (reticulosarcomas de hueso), señalando como atributo fundamental de los mismos su alto grado de

indiferenciación (sarcoma de células redondas pequeñas) y la presencia de abundante glucógeno citoplásmico detectable mediante el carmín de Best o el PAS y siendo sensible a la diastasa. Ello significó un avance importante en su diagnóstico, teniendo sin embargo presente la presencia de glucógeno también en otros tumores malignos y poco diferenciados (rabdiosarcomas, linfomas) e incluso en el Nb.

Progresiva complejidad se vio cuando Tefft (1969) describió la presencia de estos tumores a modo de masas paravertebrales capaces de causar compresión epidural. Unos años más tarde (1975) Angervall y Enzinger recogerían una amplia serie de tumores localizados en partes blandas sin dependencia ósea, no solo presentes en adolescentes sino también en jóvenes y adultos, todos ellos tendrían un imagen semejante a la vista en el Es de hueso.

Coincidiría esta época con nuestras primeras descripciones de los Es, en las que señalábamos su gran heterogeneidad estructural tanto a nivel morfológico como ultraestructural (1970, 1974, 1978). De esta suerte, junto al sarcoma de Ewing convencional, existiría también un Ewing atípico con células grandes y aspectos de diferenciación endotelial como también serían confirmados por otros autores (Nascimento y col., 1980).

Otro aspecto importante del problema se originaría al señalarse las semejanzas estructurales ópticas y electrónicas de estos tumores con los también llamados "neuroepiteliomas periféricos" de los nervios (Stout, 1918) y con los neuroblastomas periféricos del adulto (Bolande, 1969). La aparición de imágenes tipo Homer- Wright con formaciones de rosetas típicas y

filamentos centrales o pseudorosetas óptimamente vacías en su centro o imperfectamente configuradas, haría que el diagnóstico diferencial entre todos estos tumores fuera casi imposible sin la ayuda de técnicas específicas (Schmitt y col, 1982).

En 1979 Askin y cols. comunicaron la existencia de un grupo de neoplasias indiferenciadas formadas por células redondas de localización toracopulmonar, presentes también en niños y jóvenes; algunas tendrían origen en las costillas aunque en otras ocasiones serían inicialmente de partes blandas y solo posteriormente infiltrarían hueso. Histológicamente presentan rasgos semejantes al Es e histogeneticamente propondrían para ellos también un origen neuroectodérmico. Los casos publicados por estos autores sin embargo no solo serían Es/pPNET sino también variantes con diferenciación rabdosarcomatosa embrionaria.

El componente neuroectodérmico encontraría no solo refrendo ultraestructural con la presencia de granulaciones neurosecretoras (Llombart-Bosch y col., 1982) sino también con base a estudios inmunohistoquímicos. La reciente técnica inmunohistoquímica permitió detectar marcadores neurales en el Es (Lipinsky y col., 1986) que posteriormente sería confirmado por numerosos patólogos y serviría de base para defender la naturaleza neural del Es (Dehner, 1985; Triche, 1986; Cavazzana y col., 1987).

Sin embargo está demostrado que excepcionalmente estas neoplasias tienen capacidad osteoformadora en ratones atímicos (Bauer y col., 1981; Bussolatti y col., 1994) acercándose por ello al grupo de sarcomas primitivos multipotenciales con variada expresión

fenotípica neural, osteogénica incluso muscular (Triche y cols., 1986; Kamamoto y col., 1987; Parham y col., 1992) así como epitelial (Moller y col., 1987; Llombart-Bosch y col., 1989).

La detección en 1983 por Aurias y col. de una translocación genética balanceada presente en gran número de Es y de pPNET a nivel de los cromosomas t(11;22)(q24;q12) abrió una nueva perspectiva diagnóstica para este grupo de sarcomas. Posteriormente se detectarían otras nuevas (véase más adelante). Sería ya a principio de la pasada década cuando en 1992 el grupo francés Thomas, encabezado por Delattre demostraría que esta translocación está asociada a una fusión génica aberrante entre el llamado gen EWS localizado a nivel 22q12 y el gen FLI1 perteneciente a una familia conocida como ETS (Erythroblastic Transforming Sequence) situado en el cromosoma 11q24. Otros genes de la misma familia ETS están también implicados en este grupo de neoplasias (Kovar H. 1998).

Nos encontramos por tanto no ante un solo tumor, sino ante una familia de neoplasias formadas por células redondas, pequeñas, indiferenciadas que presentan una expresión fenotípica neuroectodérmica y una alteración genotípica común. Sin embargo, histológicamente, su morfología es variada y compleja. También la clínica y la localización, tanto en hueso como en partes blandas así como en diversos territorios orgánicos, hacen de este grupo de sarcomas un modelo interesante de estudio y un reto para la clínica, no resuelto en la actualidad.

### **Epidemiología**

Se conoce muy poco acerca de los factores etiológicos



relacionados con estos tumores. Hay diversidad clara cuando se comparan con los osteosarcomas, que también aparecen en edades juveniles. No parece tener relación con este tipo de sarcoma. Hay tendencia a producirse en gente joven durante la fase de mayor crecimiento y en los huesos largos (correspondiendo con el periodo de mayor crecimiento esquelético). No existe agregación familiar aunque ha sido descrito en algunos gemelos. Tampoco se han podido relacionar con irradiación médica y ambiental o con factores relacionados con el trabajo paterno o materno. Ninguna de las enfermedades genéticas conocidas como predisponentes al cáncer en la infancia aparecen relacionadas con el Es.

La única diferencia sensible tiene carácter racial por cuanto la raza negra presenta una sensible disminución de estos sarcomas comparando poblaciones equiparables en USA. No es conocido el factor genético que puede influenciar esta diferencia. Otras razas como la china, japonesa o hindú, sufren análogo índice de tumores que la raza blanca (caucasiana).

### **Edad y sexo**

Es/pPNET aparece con mayor frecuencia en la segunda década de la vida. Es infrecuente en niños por bajo de los 4 años (si bien nuestro paciente más joven presentó un tumor al mes de nacimiento). Alternativamente a partir de los 30 años este tipo de tumor tiende a desaparecer, aunque hemos tenido ocasión de diagnosticar casos aislados en edades más avanzadas de la vida (Llombart-Bosch y col., 1986). En un estudio llevado a cabo por nuestro grupo (Terrier y col., 1993) estudiando 315 enfermos de distintas instituciones de Europa y América pudimos

hallar una relación hombre/mujer de 1/1.6 y una media de edad de 14.0 años con valores de 14.2 en los varones y 13.7 en las mujeres.

Analizando las distintas variantes histológicas del Es (pPNET, con referencia a la edad, hemos podido encontrar ciertas variaciones de interés: el llamado sarcoma de Ewing clásico (convencional) presenta una distribución por sexos de 1:1 varon/hembra. El sarcoma de Ewing atípico con grandes células ofrece una distribución 1:2 (varon/hembra), por contra el tumor con diferenciación neuroectodérmica (pPNET) ofrece una distribución contraria de 2:1 (varon/hembra). También hemos visto diferencias relativas de la edad y el tipo tumoral. El Es clásico tiene una media de edad de 13.7 años, el Es atípico de células grandes 14.9 años y la variante neuroectodérmica se presenta con mayor frecuencia en edades superiores (17.5 años de media). También se ha visto y nosotros hemos podido confirmar que el Es de localización en partes blandas ocurre en edades más tardías (aproximadamente a hacia los 20 años) sin verse claras diferencias de sexo (Angervall y Enzinger, 1975). Estos datos coinciden también con los obtenidos por otros autores (McCormack y col., 1952; Prichard y col., 1975). En resumen, corresponde a un sarcoma que tiene una predominancia masculina y una mayor incidencia en la segunda década de la vida.

## **Anatomía Patológica**

### **1.- Patología macroscópica**

Hemos de distinguir varias formas de presentación, la más frecuente es en hueso, seguida de partes blandas (tejidos esqueléticos) y en vísceras (riñón, cavidad



abdominal), área torácico pulmonar, columna vertebral y SNC. También se han descrito casos de localización primitiva en piel (dermis). Estos últimos tendrían un comportamiento clínico menos agresivo. Excepcionalmente, se han descrito casos en miocardio, vulva y meninges. Referidos a hueso existen las siguientes posibilidades:

- Es/PNET de hueso (médula ósea y canal medular)
- Es/PNET periostal con extensión medular y a partes blandas.
- Es/PNET parostal (yuxtacortical) con preferente extensión a partes blandas.
- Es/pPNET de partes blandas semejando un sarcoma de otra histología (sinovial, FHM).

En lo concerniente a las localizaciones anatómicas esqueléticas, debemos distinguir dos grandes grupos que tienen significado pronóstico: aquellos que se localizan en las extremidades (fémur, tibia, peroné, huesos del pie o de la mano) y los presentes en el tronco y cabeza/cuello (pelvis, costillas, región torácica, vértebras, ectra). Los primeros tienen, en líneas generales, mejor pronóstico que los últimos.

Basados en nuestra propia experiencia de 351 pacientes revisados (Terrier y col., 1993) la localización mas frecuente en nuestros casos fueron los huesos largos (48% de casos) de los cuales el 26% se produjeron en las extremidades distales. Un 45% de pacientes tenían tumores en el tronco, dividiéndose en 20% para localizaciones costales y vertebrales y un 25% de enfermos con localización primaria en pelvis. Casos con multicentricidad (o metástasis óseas al

diagnostico) lo vimos en el 7% de enfermos.

Existe también una cierta evidencia sobre la predominancia de tumores con diferenciación neuroectodérmica en localización corporal central como son costillas, pelvis y cuerpos vertebrales. Los tumores con localización primitiva visceral (riñón) semejan a tumores con otra histología (carcinomas, sarcomas). Lo mismo ocurre para los casos vistos en ovario y testículos, quienes tienden a asociarse a tumores germinales de tipo neural.

La localización dérmica superficial merece una atención particular. Los casos descritos semejan a un tumor de dermis media con lento crecimiento, y sin tendencia a ulcerarse. Solo la histología y genética determinaran su verdadera naturaleza biológica. El comportamiento clínico es menos agresivo comparado con aquellos de localización visceral o hueso.

## **Histopatología**

Desde las primeras descripciones de Ewing numerosos patólogos hemos efectuado importantes contribuciones al diagnóstico histopatológico de los mismos, como ya hemos indicado en la introducción. Hemos de tener presente un dato importante: no se trata de un solo tipo de tumor, sino de una familia de neoplasias, todas ellas indiferenciadas (en variado grado), con una expresión fenotípica múltiple pero todos ellos con una alteración génica en la que se afecta el gen EWS (cromosoma 22q12). En consecuencia podemos distinguir los siguientes subtipos o variedades histológicas:

1. Ewing sarcoma clásico (convencional)

2. Ewing sarcoma atípico
  - 2.1. Células grandes
  - 2.2. Células claras
  - 2.3. Diferenciación neuroectodérmica
3. Neuroepitelioma periférico (pPNET)
4. Es con diferenciación vascular (endotelial)

Además hay tipos de sarcomas primitivos de hueso con presencia de elementos mixtos: Ewing, osteosarcoma microcelular y rhabdomyosarcoma).

Un diagnóstico diferencial, frente otras entidades que semejan el Es, lo describimos mas adelante.

Técnicas histológicas convencionales a utilizar:

- Hematoxilina eosina
- PAS/Carmin de Best
- Tricrómico de Masson
- Reticulina de Gomori

El estudio inmunohistoquímico lo consideramos independientemente.

### **1.- Sarcoma de Ewing clásico (Convencional)**

La morfología es difusa y desestructurada a bajos aumentos. Presenta un aspecto homogéneo con una gran celularidad, compuesta por células redondas pequeñas conglomeradas y compactas, dando un aspecto azulado tipo linfoma difuso, que ha servido para llamar a estos tumores también "sarcomas de células redondas pequeñas y azules" (small round blue cell sarcomas), al estar intensamente teñidos por la hematoxilina.

El estroma tumoral es escaso o inexistente, solo aparecen algunos vasos alrededor de los cuales se disponen los nidos celulares. Hay frecuente hiperplasia endotelial que no debe confundirse con las células tumorales. Existen coronas de células perivasculares por fuera de las cuales aparece abundante necrosis. Estos campos necróticos tienden a confluír dando aspecto geográfico. La red reticular se limita a las áreas perivasculares pero no envuelve a las células aisladamente ni tampoco a grupos celulares.

La citología es el factor dominante del tumor: las células tiene núcleos "blandos" con cromatina laxa, nucleolo único prominente, citoplasmas de límites imprecisos que se pierde confluyendo con el vecino, aspecto vacuolado debido al contenido en glucógeno. Junto a estas células dominantes llamadas "células principales" hay un segundo tipo celular mas denso, alargado, de igual tamaño pero de apariencia mas eosinofílica, son las llamadas células oscuras. Algunas muestran claros signos de condensación cromática y de apoptosis. Su distribución es irregular con respecto a las anteriores apareciendo entremezcladas y en cierta transición o continuidad. Las mitosis son frecuentes aunque solo aparecen en las células principales. Ninguna de estas células adopta en el Es clásico una disposición arquitectónica específica. Por tanto lo esencial del tumor es la ausencia de arquitectura definida. Ello también implica la ausencia de rosetas o seudoroetas de tipo neuroectodérmico.

Cuando afecta al hueso se adapta a los canales medulares ofreciendo una apariencia plexiforme. Puede sustituir la médula grasa o mezclarse con los elementos hematopoyéticos, semejando mieloblastos. También se confunden con osteoblastos cuando se

infiltran a lo largo del borde de osificación reactiva. Es importante diferenciarlos de las células osteoformadoras, como ocurre en el osteosarcoma microcelular.

La infiltración de partes blandas y músculo produce otro tipo de imagen histológica en tablero de damas (chest-board) o con aspecto arrosariado entremezclandose en filas o hileras con el tejido muscular que queda englobado en su interior. Esta apariencia reticulada ha sido valorada junto con la extensión de la necrosis tumoral como posible factor pronóstico evolutivo con un carácter negativo (vease mas adelante). La presencia de glucógeno es un marcador muy interesante (Schajowicz y col., 1959). Aproximadamente un 80% de los Es presentan glucógeno citoplasmático en grumos masivos o con carácter puntiforme, ocupando parcial o totalmente el citoplasma e incluso extendiéndose fuera del mismo ocupando en depósitos del intersticio. Con frecuencia las células presentan un típico ribete perinuclear ocupado por granulaciones PAS positivas. La fijación ideal para la determinación del glucógeno es la alcohólica (teñir improntas fijadas en alcohol de 96°) pero también una buena fijación formólica produce resultados adecuados seguida de una buena inclusión en parafina. Hay también que tener presente que existen casos de Es con escaso glucógeno o incluso sin glucógeno, lo cual no invalida un diagnóstico de Swing.

## **2. Variantes Atípicas de Es**

### **2.1. Sarcoma de Swing de células grandes**

Algunos tumores, con caracteres semejantes al Es, presentan una marcada heterogeneidad celular; esta heterogeneidad no solo se limita al tamaño, sino también a la forma (mas irregular) con indentaciones nucleares y con ocasional binucleación. La cromatina es mas densa y conglomerada. Se encuentran uno o dos nucleolos prominentes. El citoplasma en estas células es denso y ácido filo dando una apariencia histiocitoide. El contenido en glucógeno es mas escaso y tiende a adoptar un ribete periférico.

Hay además grupos de células fusiformes, con núcleos ovalados, ofreciendo imágenes en empalizada. Esta participación celular no suele alterar de modo esencial la arquitectura, que suele ser semejante a la de Es convencional. Hay también algunas células secundarias densas y picnóticas.

En algunos casos hemos visto diferenciación neuroectodérmica conseudorosetas y con mayor contenido fibrilar en el estroma. También estas imágenes mas atípicas pueden coexistir con un Es convencional. La presencia de esta variante atípica puede asociarse a estados de post tratamiento por quimioterapia o radioterapia, así como a recidivas tumorales. También, ocasionalmente, adoptan apariencia vascular con hendiduras bordeando espacios rellenos por eritrocitos, confiriendo apariencia hemangioendoteliomatosa. En resumen: es significativa la heterogeneidad celular y variable su organización arquitectónica, sin embargo continua siendo un Es.

## 2.2. Es con diferenciación neuroectodérmica (pPNET)



Llama la atención en un Es convencional o atípico la presencia de un número variable de estructuras rosetoides o en típicas empalizadas, distribuidas convergiendo a un polo central hacia donde se orientan los núcleos que mantienen características de Es. Pueden llegar a conformar rosetas Homer-Wright, sin embargo esta arquitectura es mas incompleta y pobremente elaborada si la comparamos con las vistas en el neuroblastoma o el neuroepitelioma periférico de los nervios. Estas imágenes han sido descritas en repetidas ocasiones por distintos autores (Jaffe y col., 1984; Llombart-Bosch y col., 1988).

El número y la distribución de estas seudorosetas varia de un campo histológico a otro, estando en continuidad con áreas de Es convencional o de células grandes. También el número de estas estructuras varía de un área a otra del tumor. En ocasiones no son fácilmente reconocibles necesitándose de una observación detallada y cuidadosa.

Existe además un segundo componente visible en esta variante que se refiere a la presencia de un fondo fibrilar mal definible que envuelve a grupos celulares de modo caprichoso y poco preciso. No son fibras de reticulina, sino proyecciones del propio citoplasma que adopta aspecto fusiforme.

El estroma es mas rico en fibras reticulínicas que en el sarcoma de Es convencional. Estas fibras tienden a adoptar una disposición en cesta, englobando a varios grupos celulares conjuntamente. A ello se une una mayor densidad vascular y la existencia de depósitos de colágena hialina.

La extensión de la necrosis es semejante a la vista en el

Es convencional. Los estudios inmunohistoquímicos se superponen con los del Es, si bien presentan una mayor positividad frente a marcadores neuroectodérmicos, además de los específicos del Es. A nivel ultraestructural existe también diferenciación neuroectodérmica.

### 2.3. Neuroepitelioma periférico

Conocido desde principios de siglo (Stout 1921) como un tumor específico de localización en vainas nerviosas periféricas distinto del sarcoma de vainas nerviosas periféricas, este pPNET ha quedado progresivamente incorporado a la familia de tumores de células redondas y pequeñas con carácter neural. Sería la última cadena de maduración de un Es convencional o clásico.

La expresión fenotípica más característica es la presencia de típicas rosetas de Homer-Wright. Así como en el caso anterior hay que buscar estas estructuras para hallar su diferenciación, en el pPNET la imagen sobresale en la visión microscópica ante la magnitud y número de las mismas. Además se encuentran bien configuradas, como las describiera Homer-Wright en los neuroblastomas inmaduros.

Son grupos de 6-8 células que se elongan y buscan un hipotético punto central hacia donde confluyen las prolongaciones apicales de las células. Las células de estas rosetas contienen también glucógeno. La red reticular y los depósitos de colágena amorfa, PAS positiva son más abundantes que en el Es.

Estos tumores se han confundido y descrito en más de una ocasión como neuroblastomas periféricos del

adulto. Sin embargo, esta confusión puede aclararse con técnicas inmunohistoquímicas (ausencia de CD99 en el Nb y positividad en el Es) así como también mediante biología molecular. Alteraciones de 1p16 en el Nb no visibles en Es y presencia en este último de translocaciones ausentes en el Nb, t(11;22).

Sin embargo, durante bastantes años a estas dos entidades Nb del adulto y el pPNET han sido confundidas siendo motivo de diagnóstico diferencial complejo.

#### **2.4. Es atípico de células claras**

En varias ocasiones hemos tenido dificultad para diagnosticar un Es, pudiéndolo confundir con un sarcoma de células claras o incluso con un carcinoma de células claras. Ello es especialmente problemático cuando aparece infiltración de partes blandas.

El Es tiene una impresionante plasticidad y puede llegar a formar nidos de células epitelio ideas relativamente grandes con citoplasma vacuolado en agua de roca y núcleos desplazados y retraídos. Estas estructuras quedan englobadas en bandas fibrilares con componente desmoide dando lugar a áreas hialinas.

Esta variante de Es, sin embargo mantiene un alto contenido en glucógeno y su comportamiento genético es superponible al resto de sarcomas de células redondas y pequeñas. En uno de los casos estudiados el tumor también presentaba disposición focal de Es convencional.

Estos Es con células claras mantienen a nivel inmunohistoquímico y ultraestructural caracteres de Es.

Nosotros recientemente hemos publicado un nuevo caso de esta variante mostrando translocación infrecuente t(2;22) y reorganización génica excepcional: variante nueva del EWS/FEV (Llombart-Bosch y col., 2000).

La rareza de este caso precisa nuevas confirmaciones, cosa que no es sencilla, atendido lo infrecuente de esta nueva variante tumoral.

### **3. Estructuras vasculares en el Es**

La presencia de una rica red vascular fue ya reconocida por Ewing y Oberling en las primeras descripciones de estos tumores. Incluso se propuso considerarlos como un hemangioendotelioma óseo.

La rica red vascular existente y la presencia de frecuentes necrosis pueden producir esta falsa apariencia pseudovascular. A ello se une la fuerte hiperplasia de los endotelios vasculares que adoptan patrón epitelioide prominente y que en algunas secciones se entremezclan con células tumorales, sin embargo la presencia de basales suele ser visible en casi todos los casos.

No referimos sin embargo a otra circunstancia distinta. Es la presencia de lagunas vasculares y de diferenciación angioblásticas incipientes en el propio Es (o en áreas focales del mismo). Las células tumorales bordean estructuras lacunares y se ven acompañadas de basales, así como adquieren texturas capilaroides permeabilizadas o no.

Estas células tienen citoplasma más amplio y a nivel superficial se aprecian diferenciaciones de membrana (colagena amorfa). También la red reticular es mucho

mas compleja que la de un Es convencional, viéndose apariencia lobulada o en cesta.

Estos casos carecen de diferenciación neuroectodérmica, pero expresan marcadores de Es (CD99) así como marcadores mesenquimales y vasculares (CD34; FXII)

En realidad todavía no está excluido el carácter mesenquimal del Es, combinado o no a su propiedad prospectiva neuroectodérmica. Estando formado por células primordiales pluripotenciales pueden ofrecer diferenciación divergente con fenotipos extraños (osificación, músculo, endotelios, etc.) (Bauer y col., 1981; Bussolati y col., 1997; Sorensen y col., 1998)

Es desafortunado que en estos casos, muy raros, no se haya podido determinar el genotipo tumoral de la variante vascular y solo se base su conocimiento en hallazgos morfológicos, ópticos, inmunohistoquímicos y ultraestructurales, que no son aceptados en la actualidad por todo el mundo científico.

### **Inmunohistoquímica**

La distinta expresión fenotípica ofrece una ayuda considerable para el diagnóstico de estos srct, ya que a través de ella se consigue un perfil específico que complementa perfectamente tanto la histología como la citología.

Más del 80% de los Es y sus distintas variantes expresan vimentina. Esta posibilidad sirve para confirmar el correcto estado de conservación del tejido así como para excluir un linfoma. Sin embargo alguno de los pPNET carecen de expresión de vimentina, si

bien expresan diversos marcadores neuroectodérmicos. Ellos en cierto modo se superponen con el Nb del adulto y pueden precisar estudios complementarios.

Está descrita la positividad de los Es frente a distintos marcadores de membrana basal (laminina, colageno tipo IV) así como fibronectina y colageno tipo III. Estos hallazgos postularían en favor de un origen mesenquimal del Es (Meattinen y col., 1982; Lönning y col., 1985; Llombart-Bosch y col., 1986; Scalpa y col., 1987). Esta hipótesis mesenquimal para el Es se vería reforzada por la positividad frente al LeuM2 (Lönning y col., 1985)

Independientemente una larga serie de antígenos neuroectodérmicos se han detectado en este grupo de tumores con una caprichosa y variada frecuencia. Estos marcadores son: Enolasa neuronal específica (NSE), HNK-1 (Leu7) equivalente al CD57, S-100, PGP 9.5, neurofilamentos, receptores de transferrina y antígenos HLA-C II. La expresión de estos epitopos neurales serviría para marcar un mayor grado de diferenciación neuroectodérmica. En general, pueden aparecer positivities variables e independientes del tipo o variante histológica previamente descritas, sin embargo hay una mayor positividad del número de marcadores neurales en aquellos que presentan diferenciación neuroectodérmica con rosetas tipo Homer-Wright.

Smitd y col. (1992) han defendido la necesidad de que se expresen 2 o 3 marcadores neurales para aceptar el carácter neuroectodérmico del Es, independientemente de su configuración morfológica (presencia o no de rosetas de Homer-Wright). Ello tendría implicaciones



pronósticas mas peyorativas. Nosotros hemos encontrado relación entre el grado de diferenciación neural y la presencia/ausencia de marcadores, de forma que los pPNET expresan con regularidad 2 o 3 epitopos neuroectodérmicos, mientras que el Es clásico puede también hacerlo, aunque es mas inusual así como también puede tan solo expresar vimentina.

La presencia de marcadores epiteliales ha sido vista en diversos tipos de Es, tanto en cultivo de tejidos como en material fresco. Recientemente, se han publicado nuevos datos sobre este tema descubriéndose positividades hasta de un 20% de casos de células aisladas tipo Es entre la citoqueratina CAM 5.2 y EA1, EA3 (Gould y col., 1987). Este hallazgo hay que considerarlo en el diagnóstico diferencial frente a tumores como el sarcoma sinovial monofásico o carcinomas de células pequeñas que pueden expresar ambos tipos de epitopos.

También hay diferenciación y expresión de marcadores neuroendocrinos en el Es. El análisis de la familia de cromogranina (CgA, CgB y CgC0SgII) ha sido estudiada tanto en tumores originales como también en líneas de cultivo de Es, viéndose positiva expresión de CgC-SgII.

También en nuestro laboratorio hemos podido determinar la positividad del Es/pPNET ante los receptores del Trk. El receptor trk-A se expresa mas intensamente en el tumor neuroectodérmico, mientras que el Trk-B y Trk-c se expresan mas frecuentemente en los tumores indiferenciados tipo Es convencional.

El gen MIC2X es un gen pseudo-autosómico localizado en la región homóloga X-Y y se ha localizado a nivel

Xp2.2-2.3p-ter. El producto de este gen es una glicoproteína de membrana que fue reconocida por Levy y col. usando un anticuerpo monoclonal 12E7 obtenido tras inmunización de células T de una leucemia linfoblástica aguda. Otros anticuerpos reconocen diversos epitopos de la misma molécula proteica de 30.000 kilo-dalton de peso molecular, reconocida como p30/32. Esta glicoproteína de localización membranosa también es reconocida por el anticuerpo 0.13 procedente de inmunizar una línea celular de un melanoma y también el anticuerpo HBA-71 que procedía de inmunizar una línea celular de tipo Es/pPNET ósea. Los tres anticuerpos 12E7, 0.13 y HBA-71 ofrecen una buena sensibilidad para todos los Es/pPNET. Los tres funcionan adecuadamente en material incluido en parafina (Fellinger y col., 1971; Hamilton y col., 1973). En la actualidad se comercializan los tres anticuerpos (DAKO: 12E7; Signet: HBA71 y 013). La positividad de este anticuerpo alcanza hasta el 90% de los tumores con una tinción membranosa específica que puede extenderse hasta el citoplasma.

Desafortunadamente, la especificidad de este anticuerpo no es exclusiva del tumor Es/pPNET y se han descrito expresiones positivas en otras neoplasias (Stevenson y col., 1994). Hay positividades en el 20% de los rhabdomiomas, en los linfomas linfoblásticos y leucemias linfoblásticas agudas (100%), así como en algunos osteosarcomas (23%). Sin embargo, ello no limita la utilidad diagnóstica del CD99 que en el momento actual es el anticuerpo de uso más extendido para estos tumores, siendo negativo para el neuroblastoma.

Recientemente se han estudiado una serie de nuevos marcadores.

Chung y col., (1998) han publicado resultados positivos en el Es frente la  $\beta$ -1 integrina proteína-kinasa.

Ricoli y cols (1998) encuentran positividad del c-kit y el SCF (stem cell factor) en los Es. Esta proteína esta ligada a la proliferación celular previniendo la apoptosis.

También se han efectuado estudios inmunohistoquímicos empleando el producto del gen EWS/FLI-1 para lo cual se ha utilizado el peptido correspondiente a la region c-terminal del FLI-1 (Nilsson y col., 1999).

Nosotros hemos estudiado tambien esta proteína, no solo frente al Es/pPNET, sino tambien frente a linfomas, rabdosarcomas, sarcomas sinoviales y neuroblastomas (Llombart-Bosch y col., 2000). El anticuerpo se expresa en el 100% de los srct, pero tambien es positivo en los linfomas, linfocitos normales y células endoteliales. Sin embargo los neuroblastomas y los rabdomiosarcomas fueron negativos.

En resumen: si bien no disponemos de un anticuerpo con especificidad absoluta frente a este grupo de tumores, si existen una serie de anticuerpos con una buena sensibilidad y especificidad que pueden ayudar decisivamente en el diagnóstico diferencial frente a otras neoplasias que histologicamente presentan un cierto grado de semejanza y sin embargo pertenecen a otras categorias tumorales. El CD 99 y CD57 junto con los marcadores neurales ENS, S-100, NF y PgP 9.5 continuan ofreciendo

suficiente soporte para este diagnóstico.

## **Microscopia electrónica**

Esta técnica ha aportado contribuciones importantes en el estudio de estos sarcomas confirmando la mayoría de hallazgos histológicos y ayudando a comprender su histogénesis.

A bajos aumentos el tumor demuestra estructura compacta y homogénea, con un conglomerado celular masivo sin semejanza alguna con algún tejido normal. Las células se adosan estrechamente entre sí dando una imagen en sabana difusa. Hay escaso estroma y solo destacan capilares con endotelios prominentes que pueden confundirse con células tumorales si bien siempre existe una membrana basal de separación.

La configuración celular ofrece dos tipos predominantes:

Células principales y células secundarias (oscuras). Ambos tipos celulares aparecen entremezclados en los mismos campos y existe transición entre los dos por progresiva condensación citoplásmica y retracción nuclear.

La célula principal es redondeada o poligonal de superficie lisa, estrechamente adosada a las células vecinas, atendida la ausencia de material interpuesto. Hay uniones celulares en forma de uniones estrechas así como aislados desmosomas de diferenciación incompleta.

El citoplasma es abundante si bien contiene escasos orgánulos siendo la estructura más frecuente y

llamativa la presencia de glucógeno que se distribuye bien de forma amorfa o bien se organiza en rosetas de polisacáridos complejos. Suelen distribuirse caprichosamente ocupando buena parte del citoplasma. Sin embargo, no todas las células principales contienen glucógeno habiendo numerosas células carentes del mismo con un citoplasma vacuolado claro. Cuando domina esta textura hablamos de "células claras" por el aspecto histológico en agua de roca translucido. También existen aislados orgánulos como mitocondrias, RER y campos de Golgi. Los filamentos de tipo intermedio aparecen asociados a las mitocondrias.

En los Es de "células grandes" existe mayor riqueza de orgánulos citoplasmáticos y el hialoplasma es más denso al mismo tiempo que existen más acúmulos de filamentos. Existen inclusiones lisosomiales aisladas que no deben confundirse con granulaciones neurosecretoras. Estas últimas son de tamaños entre 100-200 nm de diámetro y tienen un cuerpo denso osmiofilo rodeado por una membrana. Su contorno es redondeado o elongado. Pueden localizarse en el citoplasma, en áreas perinucleares o en las prolongaciones citoplasmáticas, cuando el Es adopta una configuración de pPNET con proyecciones citoplasmáticas dendríticas o con apariencia elongada, periforme. Estas estructuras solo son visibles en aquellos casos en que existe una diferenciación neuroectodérmica pero no se ven en los Es convencionales.

También en los casos con maduración neural encontramos proyecciones citoplasmáticas ocupadas por filamentos en bandas así como neurotúbulos. Ocasionalmente, hemos podido también ver

terminaciones celulares a modo de contactos sinápticos con una vesícula terminal dilatada y una membrana densa en contacto con un soma celular. En el interior de la vesícula sináptica existen granulaciones neurosecretoras.

El núcleo de las células principales es redondeado u oval y ocupa una amplia porción de la célula. Tiene cromatina laxa periférica, reticulada y uno o dos nucleolos. Estos contornos celulares se hacen más irregulares e indentados en las formas de Es atípico entremezclándose células blastemales inmaduras con otras binucleadas o de núcleos indentados. También en estas células hay un nucleolo más prominente que adopta patrón reticular.

Los Es atípicos de células grandes destacan por la irregularidad de sus células y variación en el tamaño de las mismas así como también de sus núcleos.

Las células secundarias son también conocidas como células oscuras. Tienen contornos irregulares y los contactos entre ellas son menos precisos, su citoplasma es denso, habiendo glucógeno y orgánulos variados. Se encuentran también lisosomas. Hay filamentos densos. Algunas de estas células presentan núcleos elongados de cromatina conglomerada y nucleolo poco prominente. Hay núcleos en apoptosis.

Existe progresiva o bien brusca transición entre células principales y secundarias en proporción variada pero visible en todos los tipos de Es típicos y atípicos así como en el pPNET. La diferenciación tumoral neuroectodérmica (pPNET) es también claramente determinable con ME. Las células son más irregulares y con ricas prolongaciones de variada longitud y



orientación. Ellas se tienden a polarizar hacia un hipotético centro o bien adoptan un aspecto reticular dando aspecto dendritico entremezclandose las distintas prolongaciones. Hay algunas células piriformes y otras estrelladas junto con redondas u ovals. Las uniones intercelulares aparecen mejor desarrolladas con presencia de desmosomas bien configurados (positividad ante la desmoplakina)

El intersticio de estos tumores es pobre o ausente en el Es convencional, aumentando progresivamente en el Es atípico y en el pPNET. En estos últimos se encuentran depósitos de colágena no estructurada (tipo IV) así como cuerpos de Luse con estructuras periódicas y colágena periódica convencional.

La vascularización varía de un tumor a otro. En general hay una rica red capilar con numerosas células endoteliales muy prominentes pero sin aspecto neoplásico. Debe distinguirse estos endotelios reactivos de los neoplásicos vistos en la variante endotelial del Es. En ellos aparece siempre una fina basal de separación entre célula tumoral y célula reactiva endotelial.

La variante endotelial del Es está configurada por grandes células de amplio citoplasma muy vacuolizado pero con escaso glucógeno. Estas células se agrupan estrechamente pero dibujan vacuolas intracitoplasmicas o fisuras y hendiduras intercelulares de progresivo diámetro. Tienen citoplasma con microvellosidades, vacuolas de pinocitosis y también cuerpos Weible-Palade como las células endoteliales típicas. Existen basales de soporte que dibujan texturas pseudocapilares. Alguna de la luz intercelular está ocupada por eritrocitos.

Semeja a los hemangioendoteliomas, pero se asocia por otro lado a células más indiferenciadas que poseen la textura de las células principales del Es atípico con células grandes.

En resumen: hay una doble población celular en el Es (células principales y secundarias). Existe una variabilidad ultraestructural en la participación celular no semeja a ninguna estructura celular histológica normal. El glucógeno es abundante pero de disposición caprichosa. Existen granulos neurosecretorios que son más abundantes en los tumores con diferenciación neuroectodérmica pero que también son aisladamente visibles en los Es convencionales.

La presencia de estroma con colágena amorfa y cuerpos de Luse se encuentran en los pPNET. Hay casos con diferenciación endotelial semeja un tumor vascular maligno.

En todo caso, es un tumor de células muy indiferenciadas e inmaduras sin otros atributos morfológicos reconocibles.

### **Genética. Patología Molecular**

En 1983 se descubrió la existencia de una translocación cromosómica balanceada  $t(11;22)(q24;q12)$  que ha resultado ser un marcador fenotípico extraordinario (Aurias y col., 1983; Turc-Carel y col., 1984). Posteriormente, se han ido describiendo nuevas translocaciones cromosómicas, independientemente de la variante histológica del tumor. En un orden de frecuencia descendiente son las siguientes:  $t(21;22)(p22;q12)$  en aproximadamente 10%

de casos (Giovannini y col., 1994; Dunn y col., 1994); t(7;22)(q22;q12) en un 1% de tumores (Jeon y col., 1995); t(17;22)(q12;q12) en menos de un 1% (Kaneko y col., 1996) y finalmente una translocación muy inusual t(2;22)(q33;q12) descrito solo en tres casos de sarcomas (Peter y col., 1997). Es decir que por lo menos existen cinco tipos de translocaciones en las que el locus 22q12 aparece implicado.

Consecuencia de ello ha sido la caracterización de los puntos de fractura del Es en el cromosoma 22q12 y la subsiguiente secuenciación y clonaje de un transcripto quimérico cDNA, resultado de la fusión entre los genes EWS y el factor de transcripción FLI-1 de la familia ETS (Delattre y col., 1992); Zucman y col., 1992). Además varias de las otras reorganizaciones cromosómicas señaladas previamente también han podido ser clonadas e identificadas (Kovak, 1998; Kovak, 1998). Es interesante señalar que todos estos genes fusionados pertenecen a una misma familia de factores de transcripción conocida como ETS (Erythroblastic Transforming Sequence).

Recientemente también se ha conocido que la proteína producto de la fusión EWS/FLI-1 puede detectarse mediante Western blotting utilizando un anticuerpo policlonal frente a la región c-terminal del FLI-1. El 80% de los Es expresan esta proteína nuclear, siendo negativa en los neuroblastomas (Nilsson y col., 1999). Nosotros también lo hemos podido confirmar (Llombart-Bosch y Navarro, 2000) si bien la especificidad del anticuerpo no es total (hay positividades frente a linfomas y sarcomas sinoviales).

Sin embargo hay que tener presente que aproximadamente un 5% de estos sarcomas no

expresan ninguna de estas translocaciones o expresiones génicas reorganizadas, utilizando tejido fresco y RT-PCR. Además, ciertos sarcomas presentan un fenotipo múltiple con expresión neural, muscular y mesenquimal (Parham y col., 1992) y muestran también transcritos EWS (Sorensen y col., 1995; Pagani y col., 1995). En estos casos el empleo de técnicas de FISH (hibridación fluorescente in situ) utilizando pruebas de cosmidos que delimitan los puntos de fractura del Es, pueden aportar resultados positivos estudiándolos en núcleos interfásicos (Kovar, 1998; Monforte-Muñoz y col., 1999)

Distintas mutaciones adicionales también han sido halladas en estos tumores. Ellas no son necesariamente específicas pero pueden contribuir a la heterogeneidad clínica e histológica. Destaca la trisomía 8 que aparece en un 50% de casos y la trisomía 12 en un 20%. También se ha descrito una translocación t(1;16) en varios tumores con fenotipo Es (Armengol y col., 1997).

Además numerosos oncogenes han sido detectados en los Es, como el ras, cMYC, MDM2, p53, p16 y Rb, si bien la creencia general es que estas mutaciones o sobre-expresiones no son significativas para la biología del sarcoma.

Solo alguno de ellos parece tener significado, como es la mutación p53 que se produce en un 10% de casos, mientras que el gen Rb no está inactivado. Por contra, se ha visto una delección homocigótica del gen p16 sin observarse aberraciones cromosómicas a nivel 9q21.

## **Diagnóstico diferencial**

Este diagnóstico incluye un número relativamente extenso de sarcomas de hueso y partes blandas compuestos por células redondas pequeñas que semejan el Es o algunas de sus variantes. Su diagnóstico diferencial es importante por cuanto el pronóstico y tratamiento varía radicalmente.

Los siguientes tipos tumorales merecen especial atención:

1. Osteosarcoma anaplásico microcelular
2. Condrosarcoma mesenquimal
3. Condrosarcoma mixoide
4. Sarcoma primitivo de hueso y partes blandas
5. Linfoma no Hodgkin
6. Neuroblastoma

## **Pronóstico y criterios terapéuticos**

No hay criterios pronósticos aceptados con un carácter definitivo para este grupo de sarcomas. Son criterios fundamentales: la localización del tumor primario y la presencia o ausencia de metástasis en el momento del diagnóstico. La edad también parece tener una debil relación pronóstica, mientras que no existen diferencias pronósticas relacionadas con el sexo.

Una evolución clínica mas agresiva presentan los Es de localización toracopulmonar y en pelvis, quizás por lo tardío del diagnóstico y la afectación visceral.

En general, los tumores localizados en el tronco tienen un pronóstico evolutivo peor que los localizados en las extremidades y particularmente los tumores de localización en extremidades distales ofrecen mayores supervivencias.

En la actualidad se buscan insistentemente criterios clínico-patológicos que indiquen una mayor o menor agresividad clínica que justifique un tratamiento mas intensivo o menos agresivo. Estos criterios se buscan a distintos niveles: histopatológicos, citogenéticos, biología molecular. Hasta ahora, los resultados son contradictorios si bien nuevas puertas se abren a la esperanza.

A nivel histológico, la presencia de una estructura reticular en damero de ajedrez o "filigree" descrita por Kissane (1983) vendria asociada a una mayor malignidad tumoral y a una supervivencia mas corta. Nosotros pudimos confirmar estos hallazgos en casos de enfermos no metastasicos (Llombart-Bosch y col., 1986) aunque otros investigadores no pudieron hacerlo (Hartman y col., 1991).

Un segundo factor de mayor agresividad clínica de estos sarcomas es la presencia de necrosis tumoral extensa en tumores no tratados con quimioterapia neoadyuvante (Llombart-Bosch y col., 1986).

La heterogeneidad histológica ha sido motivo de análisis para establecer criterios pronósticos, especialmente el estudio de la diferenciación neuroectodérmica frente a los tipos mas indiferenciados (Es versus pPNET) ha sido motivo de controversia. Schmidt y col. en Alemania y Hartman y col. (1991) en USA han señalado la relación de un pronóstico mas adverso en los pPNET con clara diferenciación neuroectodérmica (presencia de rosetas de Homer-Wright y mas de un marcador neuroectodérmico a nivel inmunohistoquímico). En un amplio estudio contando con casos de USA y Europa



(Terrier y col., 1993) no pudimos confirmar estos hallazgos.

Nuevas aportaciones se han llevado a cabo: hay varios estudios en marcha tratando de determinar si determinadas modificaciones moleculares pueden tener un significado pronóstico. El análisis del producto de la translocación génica EWS/FLI-1, al compararse los puntos de fusión de los exones 1-7 del EWS (90% de los casos) y los exones 6-9 del FLI-1 (50% de los casos). La fusión más frecuente en los Es/pPNET es la llamada tipo 1: EWS/FLI-1 exones 7/6, mientras que la fusión 7/5 ocurre en un tercio de los casos (fusión tipo 2). Tipos más infrecuentes son las fusiones que afectan a los exones 9, 10 del EWS (10% de casos) con los exones 4 o 6 del FLI-1 (Ladanyi y col., 1995; Obata y col., 1999). Diversos estudios recientes (Zoubek y col., 1996) demuestran que el pronóstico evolutivo clínico de los Es/pPNET favorece a aquellos tumores con fusión tipo 1. Ello sería válido no solo para los tumores no metastásicos, sino también en los casos con metástasis en el momento del diagnóstico (de Alava y col., 1998). Sin embargo últimas publicaciones de los mismos autores no han permitido confirmar estas diferencias clínicas, estando el tema todavía pendiente de estudios con mayores casuísticas clínicas (Aryee y col., 2000)

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Aryee DNT, Sommergruber W, Muehlbacher K, Dockhorn-Dworniczak B, Zoubek A, Kovar H. Variability in gene expression patterns of Ewing tumor cell lines differing in EWS-FLI1 fusion type. *Lab Invest* 80 (12):1833-44, 2000
2. Antonescu CR, Gerald WL, Magid MS, Ladanyi M. Molecular variants of the EWS-WT1 gene fusion in desmoplastic small round cell tumor.

Diagn Mol Pathol 1998;7:24-8.

3. Bailly RA, Bosselut R, Zucman J, et al. DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. *Mol Cell Biol* 1994;14:3230-41.
4. Batsakis J, Mackay B, el-Naggar A. Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor: an interim report. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105:838-43.
5. Carrillo R. Case report. I Curso de Patología de Cabeza y Cuello. Facultat de Medicina y Ciències de la Salut. Reus (Spain), 1998.
6. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987;162:156-9.
7. d'Amore ES, Ninfo V. Soft tissue small round cell tumors: morphological parameters. *Semin Diagn Pathol* 1996;13:184-203
8. de Alava E, Lozano MD, Patino A, Sierrasesumaga L, Pardo-Mindan FJ. Ewing family tumors: potential prognostic value of reverse-transcriptase polymerase chain reaction detection of minimal residual disease in peripheral blood samples. *Diagn Mol Pathol* 1998;7:152-7.
9. de Alava E, Kawai A, Healey JH, et al. EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 1998;16:1248-55.
10. Dehner LP. Primitive neuroectodermal tumor and Ewing's sarcoma. *Am J Surg Pathol* 1993;17:1-13.
11. Dehner LP. On trial: a malignant small cell tumor in a child: four wrongs do not make a right. *Am J Clin Pathol* 1998;109:662-8.
12. Delattre O, Zucmann J, Plougastel B, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 1992;359:162-5.
13. Delattre O, Zucman J, Melot T, et al. The Ewing family of tumors: a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med* 1994;331:294-9.
14. Dockhorn-Dworniczak B, Schäfer KL, Dantcheva R, et al. Diagnostic value of the molecular genetic detection of the t(11;22) translocation in Ewing's tumors. *Virchows Arch* 1994;425:107-12.
15. Frascella E, Rosolen A. Detection of the MyoD1 transcript in rhabdomyosarcoma cell lines and tumor samples by reverse transcription

polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1998;152:577-83.

16. Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, et al. Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nature Genetics* 1993;5:230-5.

17. Giovannini M, Biegel JA, Serra M, et al. EWS-erg and EWS-Flt1 fusion transcripts in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors with variant translocations. *J Clin Invest* 1994;94:489-96.

18. ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman F (ed); S. Karger, Basel, 1995.

19. Jeon IS, Davis JN, Braun BS, et al. A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* 1995;10:1229-34.

20. Kaneko Y, Yoshida K, Handa M, et al. Fusion of an ETS-family gene, EIAF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;15:115-21.

21. Kovar H. Progress in the molecular biology of Ewing tumors. *Sarcoma* 1998;2:3-17.

22. Ladanyi M, Gerald W. Fusion of the EWS and WT1 genes in the desmoplastic small round cell tumor. *Cancer Res* 1994;54:2837-40.

23. Ladanyi M. The emerging molecular genetics of sarcoma translocations. *Diagn Mol Pathol* 1995;4:162-73.

24. Llombart-Bosch A, Blache R, Peydro-Olaya A. Ultrastructural study of 28 cases of Ewing's sarcoma: typical and atypical forms. *Cancer* 1978;41:1362-73.

25. Llombart-Bosch A, Carda C, Peydró-Olaya A, et al. Soft tissue Ewing's sarcoma. Characterization in established cultures and xenografts with evidence of a neuroectodermic phenotype. *Cancer* 1990;66:2589-601.

26. Llombart-Bosch A, Contesso G, Peydro-Olaya A. Histology, immunohistochemistry and electron microscopy of small round cell tumors of bone. *Semin Diagn Pathol* 1996;13:153-70.

27. May WA, Lessnick SL, Braun BS, et al. The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* 1993;13:7393-8.

28. McManus AP, Gusterson BA, Pinkerton CR, Shipley JM. The molecular pathology of small round-cell tumours. Relevance to diagnosis,

prognosis and classification. *J Pathol* 1966;178:116-21.

29. Meis-Kindblom JM, Stenman G, Kindblom LG. Differential diagnosis of small round cell tumors. *Semin Diagn Pathol* 1996;13:213-41.

30. Nascimento AG, Unni KK, Pritchard DJ, Cooper KL, Dahlin DC. A clinicopathologic study of 20 cases of large-cell (atypical) Ewing's sarcoma of bone. *Am J Surg Pathol* 1980;4:29-36.

31. Noguera R, Navarro S, Cremades A, et al. Translocation (X;18) in a biphasic synovial sarcoma with morphologic features of neural differentiation. *Diagn Mol Pathol* 1998;7:16-23.

32. Obata K, Hiraga H, Nojima T, Yoshida MC, Abe S. Molecular characterization of the genomic breakpoint junction in a t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:6-15.

33. Ohno T, Rao VN, Reddy ES. EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator. *Cancer Res* 1993;53:5859-63.

34. Panagopoulos I, Hoglund M, Mertens F, Mandahl N, Mitelman F, Aman P. Fusion of the EWS and CHOP genes in myxoid liposarcoma. *Oncogene* 1996;12:489-94.

35. Parham DM, Dias P, Kelly DR, Rutledge JC, Houghton P. Desmin positivity in primitive neuroectodermal tumors of childhood. *Am J Surg Pathol* 1992;16:483-92.

36. Parham AM, Jenkins JJ. Pathology of selected pediatric embryonal neoplasms. *Modern Pathology* 1994;7:501-19.

37. Pellin A, Boix J, Blesa JR, Noguera R, Carda C, Llombart-Bosch A. EWS/FLI-1 rearrangement in small round cell sarcomas of bone and soft tissue detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction amplification. *Eur J Cancer* 1994;6:827-31.

38. Peter M, Couturier J, Pacquement H, et al. A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. *Oncogene* 1997;14:1159-64.

39. Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ, Denny CT. A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nature Genetics* 1994;6:146-51.

40. Sorensen PH, Shimada H, Liu XF, Lim JF, Thomas G, Triche TJ. Biphenotypic sarcomas with myogenic and neural differentiation express the Ewing's sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. *Cancer Res* 1995;55:1385-92.

41. Thorner P, Squire J, Chilton-MacNeil S, et al. Is the EWS/FLI-1 fusion transcript specific for Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor? A report of four cases showing this transcript in a wider range of tumor types. *Am J Pathol* 1996;148:1125-38.
42. Urano F, Umezawa A, Hong W, Kikuchi H, Hata J. A novel chimera gene between EWS and E1A-F, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extrasosseous Ewing's sarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;219:608-12.
43. Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O et al. Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? *J Clin Oncol* 1996;14:1245-51.
44. Zucman J, Delattre O, Desmaze C, et al. EWS and ATF-1 gene fusion induced by t(12;22) translocation in malignant melanoma of soft parts. *Nature Genetics* 1993;4:341-5.
45. Zucman J, Melot T, Desmaze C, et al. Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *EMBO J* 1993;12:4481-7.
46. Zucman-Rossi J, Legoix P, Victor JM, Lopez B, Thomas G. Chromosome translocation based on illegitimate recombination in human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11786-91