

FACULTAD DE MEDICINA DE VALENCIA. DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA
CÁTEDRA DE HISTOLOGÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

Director: Prof. A. LLOMBART BOSCH

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

A. LLOMBART-BOSCH¹

RESUMEN

En el actual estudio se discuten 23 casos de sarcoma de Ewing con métodos ópticos y microscópico electrónico. Basados en los criterios actuales creemos en la existencia de distintos tipos morfológicos de sarcoma de Ewing cuya histología se extiende desde formas indiferenciadas blastémicas a otras más atípicas e irregulares.

La presencia de distintos tipos celulares blastémicos junto a otros más electrodensos (células oscuras), sugiere que todas estas células se distinguen sólo en función de su grado de maduración y diferenciación metabólica. De esta forma se han podido distinguir dos tipos fundamentales de sarcoma de Ewing cuyas características fundamentales son las siguientes:

Ewing típico: Hemos reunido 15 casos de tal carácter estudiado con microscopía electrónica. Este tumor está formado casi exclusivamente por nidos sólidos de células blastemales (célula matriz indiferenciada) en íntimo contacto mutuo. Hay células blastemales provistas de glucógeno y otras desprovistas del mismo. El segundo tipo celular tiene carácter oscuro, denso, y su contenido en glucógeno varía. Los capilares del tumor tienen densas basales y endotelio hiperplásico pero sin relación directa con las células neoplásicas. Hay abundantes depósitos de fibrina. Las fibras reticulares escasean o no existen. Hay frecuentes necrosis.

Ewing atípico: En 8 casos hemos encontrado diverso grado de variación en la morfología y distribución cuando se comparan con el anterior tipo de tumor. Aquí las células principales tienen una naturaleza más irregular y se disponen con un carácter histiocitario o mesenquimal. El contenido en glucógeno es más escaso. Las células secundarias también aparecen. Ambos tipos celulares se asocian en grupos o más aisladamente semejando al Ewing típico. Los espacios intersticiales están ocupados por vasos con densas basales y fibras reticulares más abundantes.

Alguna de estas células con tipología mesenquimal muestran filamentos compactos agrupados en bandas y asociados a mitocondrias. La diferenciación celular histiocítica presenta un RER bien desarrollado así como cisternas con actividad funcional. Hay lisosomas.

Descriptores: Sarcoma de Ewing. Tipos.

SUMMARY

Present report deals with 23 cases of Ewing's sarcoma analysed by optical and electronic microscopical means. On the basis of the present histological criteria we believe in the existence of several morphological types of Ewing's sarcoma whose histology extends from the most undifferentiated blastemal ones to a more atypical variant.

The presence of several cell types and the existence of transitional forms between the principal cell of a blastemal nature and the more in appearance electrodense ones (dark cell) suggest that all these cells seen in the same tumor differ only in their metabolic state of maturation. On this basis a relation could be established between the number of cells present in one given type of tumor and the ultrastructural nature of this neoplasm. On this basis two main types of Ewing's sarcoma have been identified whose characteristics are the following:

Ewing typical: We have collected 15 cases of this nature in our ultrastructural analysed material. The tumors is almost exclusively composed of solid nests of blastemal cells (undifferentiated stem cells) which appear in very close contact with each other. Within similar cell structures there exist two variants: with glycogen and without glycogen. In very close relationship there are occasional dark cells (secondary cells), with or without glycogen. In the interstitial spaces of the tumor appear isolated capillaries provided with a dense basal and without any relationship to the neoplastic cells. There exist numerous deposits of fibrine. The reticular fibres are absent or in a very sparse number. Necrosis is abundant.

Ewing atypical: In eight cases we have found some variations in cell distribution and morphology in relation to the first tumor group. Here, the principal cells have a more irregular nature being of a mesenchymal or histiocytic character and the glycogen content is sparse. Secondary cells are also present. Both kinds of cells appear isolated or located in groups or compact nests as typical Ewing do. In the interstitial spaces the vessels have thick basals and the reticular fibres are more abundant. Some cells of mesenchymal nature are provided with filaments in cytoplasmic bundles associated to mitochondria. The histiocytic differentiated ones show a very well developed RER with cisternae in functional activity. There are lysosomes inside its cytoplasm.

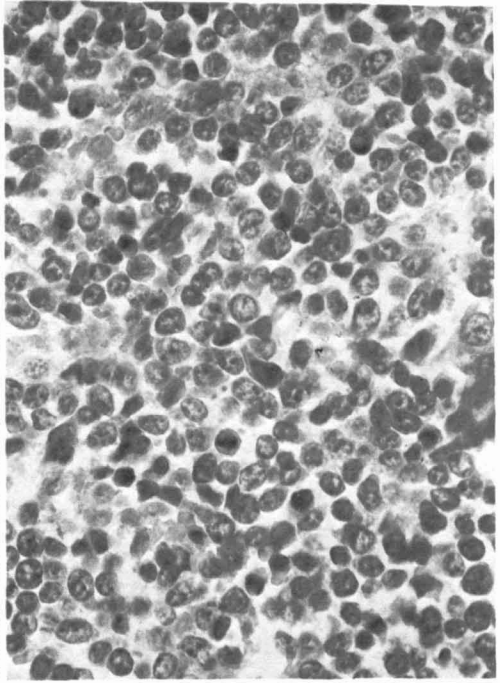
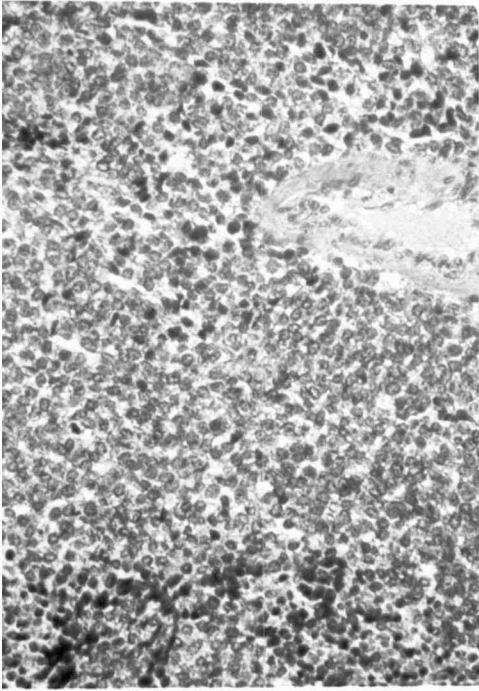
Key words: Ewing's Sarcoma. Types.

Dentro del grupo de tumores primitivos del hueso formados por células redondas, el llamado sarcoma de Ewing, presenta peculiaridades clínicas y morfológicas particulares, que lo individualizan del resto de linfomas (linfosarcomas y reticulosarcomas), así como de las formas localizadas de leucemias y mielomas.

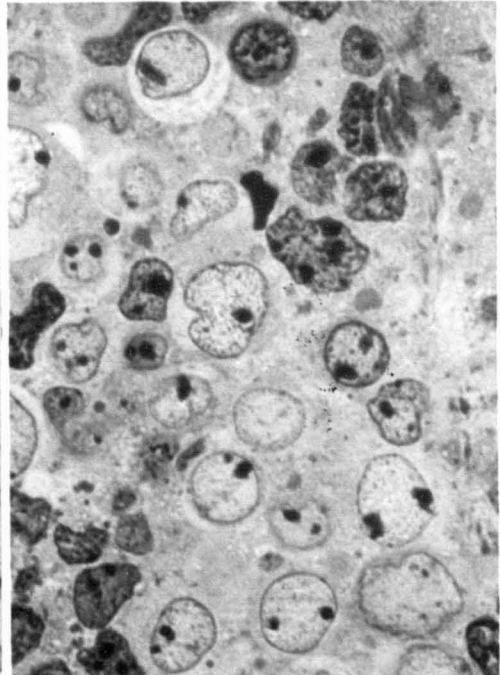
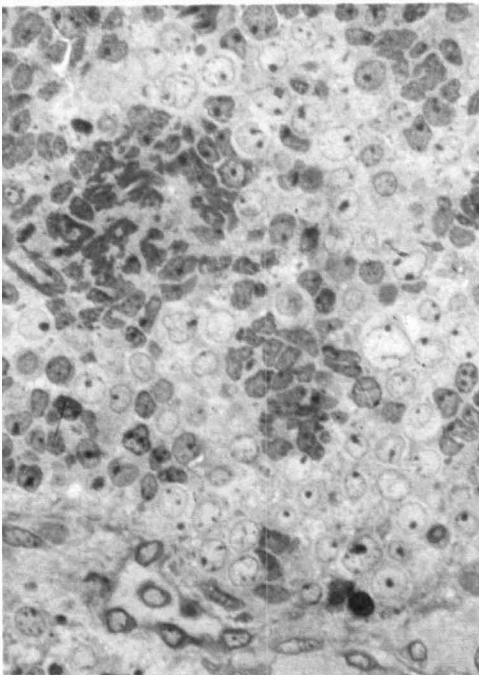
Sin embargo, la tipificación y análisis histogénico de este tumor ha sido durante

mucho tiempo motivo de debate y continúa aún siéndolo hoy en día, desde que Ewing lo deslindara como una entidad patológica ya en 1921, considerándolo como de naturaleza vascular endotelial. Otros autores OBERLING (1928); OBERLING y RAILEANU (1932); FRUHLING y CHADU (1957), supusieron su origen a partir de una hipotética y hoy no confirmada, célula reticular pluri-potencial embrionaria de la médula ósea. También JAFFE (1951) supuso que este tumor tendría su origen en el componente mesenquimal de soporte medular óseo. Más recientemente KADIN y BENSCH (1971) han

1, Efectuado con ayuda a la Investigación del Ministerio de Educación y Ciencia y con ayuda del Intercambio Cultural de la embajada de Francia en España.

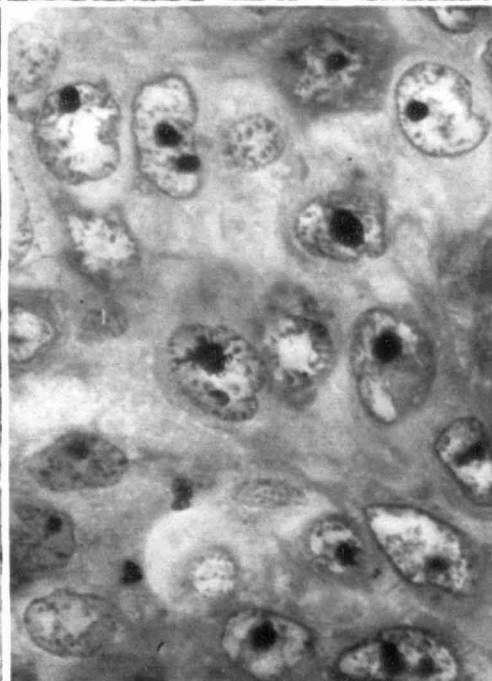
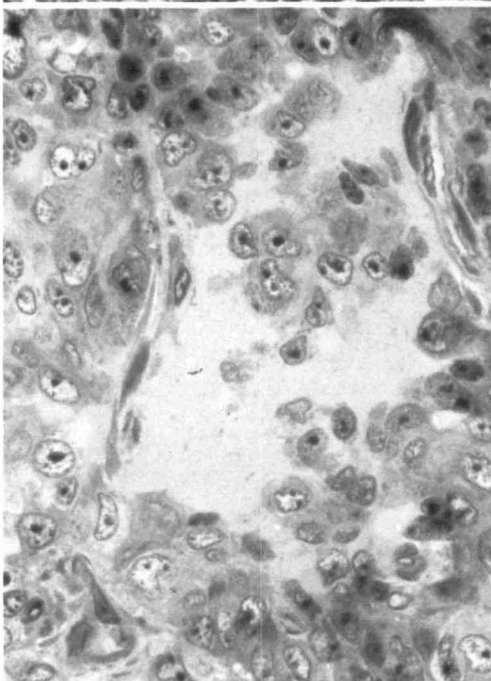
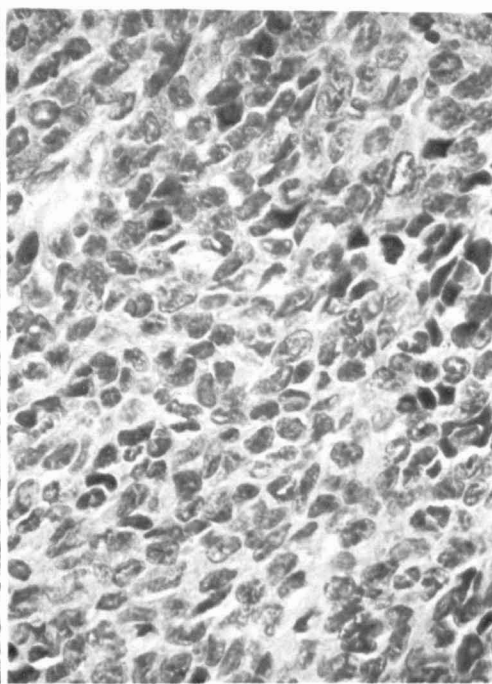
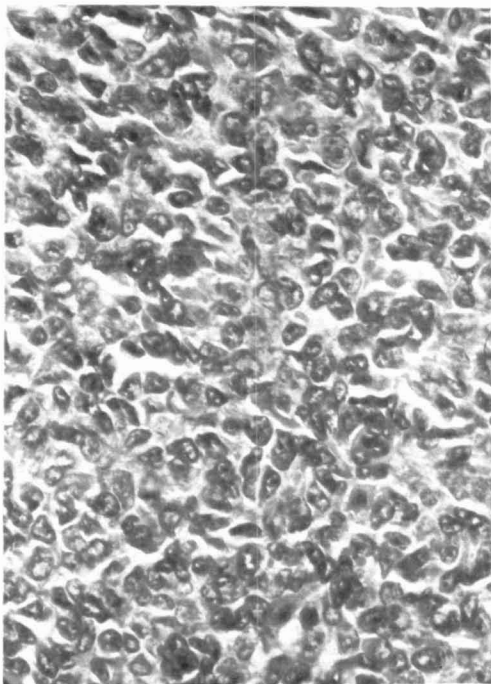


2



4

FIGS. 1, 2, 3 y 4.—Caracteres microscópicos de un sarcoma de Ewing típico. Visión conjunta del tumor (fig. 1) con hialinosis perivascular. En la fig. 2 aparecen células principales y secundarias entremezcladas. Destaca la regularidad nuclear. Corte semifino en la fig. 3, apreciándose grupos de células claras y oscuras irregularmente distribuidas. En la fig. 4 aparece detalle en sección semifina de células principales y secundarias en directo contacto. Fig. 1: $10 \times$ H. E.; fig. 2: $60 \times$ H. E.; fig. 3: semifino. Azul toluidina. $70 \times$; fig. 4: semifino. Azul toluidina $100 \times$.



FIGS. 5, 6, 7 y 8. — Caracteres microscópicos de un sarcoma de Ewing atípico. La fig. 5 muestra área tumoral destacando la irregularidad nuclear y el pleomorfismo celular. Análogas imágenes son visibles en la fig. 6 donde además hay vasos con pobres paredes. En la sección semifina núm. 7, se aprecia uno de estos senos vasculares con irregulares paredes en cuyo seno aparecen células tumorales. Detalle citológico (fig. 8) en donde destaca la mayor densidad cromática así como la presencia de voluminoso nucléolo en las células tumorales. ● Fig. 5: $60 \times$ H. E.; fig. 6: $60 \times$ H. E.; fig. 7: Azul toluidina: $70 \times$ semifino; fig. 8: Azul toluidina $100 \times$ semifino.

defendido un carácter mieloides para esta neoplasia.

Desde ya hace varios años (1969), estamos ocupados en el estudio particular de este tipo de neoplasias en colaboración de nuestro departamento con el Instituto Gustave Roussy (Villejuif-France). Como resultado de estos estudios y con la colaboración de R. BLACHE (Villejuif) y A. PEYDRÓ (Valencia), hemos encontrado nuevas perspectivas tanto morfológicas como histogenéticas que creemos pueden tener una significación clínica de interés.

En buena parte nuestras observaciones han sido ya publicadas previamente (A. LLOMBART BOSCH y cols., 1970); A. PEYDRÓ y A. LLOMBART BOSCH (1972); A. LLOMBART BOSCH y R. BLACHE (1974); A. LLOMBART BOSCH (1975), o están pendientes de nueva y más amplia discusión (A. LLOMBART BOSCH, R. BLACHE, A. PEYDRÓ 1978), pudiendo ya en la actualidad deslindar con nitidez, dentro del terreno de la morfología (óptica y ultraestructural) dos variantes de sarcoma de Ewing, el típico y el sarcoma de Ewing atípico. Como es lógico esta individualización neoplásica ha sido también llevada a cabo frente a otros sarcomas de la medula ósea que pueden ser motivo de difícil diagnóstico diferencial con los métodos de rutina usual, cual es el caso del reticulosarcoma tipo Jackson y Parker, así como, los linfosarcomas primitivos óseos. La posible existencia de metástasis óseas de neuroblastomas ocultos han sido también tenida en consideración.

Pretendemos en el presente trabajo analizar las características ópticas y microscópicas electrónicas de las dos variantes del sarcoma de Ewing tratando de exponer criterios prácticos de diferenciación no sólo entre ellos mismos sino también frente al resto de neoplasias pobremente diferenciadas de la medula ósea.

Material y métodos

Desde hace ocho años recogemos sistemáticamente todo el material que llega a nuestro Departamento, referente a patología tumoral ósea y articular con vistas a un estudio sistemático con microscopía óptica, histoquímica y microscopía electrónica. El presente material tiene por tanto una heterogénea procedencia siendo, en nuestro país, fundamentales fuentes de origen: Departamento de Ortopedia y Traumatología de la Facultad de Medicina de Valencia (Director Prof. F. Gomar), Servicio de Traumatología del Hospital Provincial (Director Dr. E. López Trigo), Residencia Marítima de la Malvarrosa de Valencia. Servicio de Traumatología del Hospital Provincial y Facultad de Medicina de Murcia. También agradecemos el envío de algún caso tanto al Prof. Ortuño Pacheco (Cartagena), como al Prof. Horacio Oliva (Madrid). Sin embargo, la gran mayoría de nuestro material ultraestructural procede de la estrecha colaboración existente entre nuestro Departamento y el Servicio de Patología del Instituto Gustave Roussy, Villejuif-France (Director Dr. R. Gerard-Marchant). Además debemos señalar cómo alguno de los casos analizados proceden a través del sistema de consultas establecido por la S. I. O. P. (Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica). Queremos por todo ello agradecer a todos estos colegas su desinteresada aportación a estos trabajos.

En la tabla adjunta núm. 1, se resume todo el material dispuesto para estudio microscópico electrónico y del cual sólo hacemos referencia a los que pueden considerarse como sarcomas de células redondas (véase tumores de Ewing), reticulosarcomas de Jackson y Parker, linfomas, plasmocitomas e histiocitosis, así como las consideradas metástasis óseas de neuroblastoma. No incluimos en el presente estudio

TABLA 1. — *Tumores óseos estudiados con microscopía electrónica*

Tipo de tumor	Número de casos
Sarcomas de Ewing	23
Reticulosarcomas	5
Neuroblastomas	2
Sarcomas osteogénicos... ..	17
Osteoclastomas	2
Condrosarcomas	3
Condrosarcomas	2
Plasmocitomas	3
Fibrosarcomas	2
Granulomas eosinófilos	4
Otros tumores benignos	6

otros tipos de lesiones óseas primitivas o metastásicas (carcinomas indiferenciados, metástasis de carcinomas tipo grano de avena), que pueden eventualmente y de modo excepcional llevar a confusión diagnóstica con un Ewing.

El material analizado fue fijado en formalina neutra al 10 por 100 e incluido en parafina según técnica usual. No hemos efectuado ninguna decalcificación previa evitando recoger las áreas necróticas y espículas óseas. Empleamos las siguientes técnicas de coloración: Hematoxilina-Eosina; Hematoxilina Safranina; PAS; PAS-alfa-amilasa; carmín de Best; impregnación argéntica de GOMORI o WILDER para las fibras de reticulina.

Para los estudios histoquímicos hemos utilizado como fijador directo el nitrógeno líquido siendo seguidamente cortados a 17° bajo cero en un criostato EIC. Las técnicas efectuadas y alguno de los resultados logrados han sido publicados previamente (PEYDRÓ y LOMBART BOSCH, 1972).

Para microscopía electrónica utilizamos la técnica usual empleada en nuestro Departamento y ya publicada en anteriores ocasiones (A. LOMBART BOSCH y colaboradores, 1970). Los pequeños fragmentos de tumor no necróticos son recogidos directamente en 4 por 100 glutaraldehído fosfato (ph 9'4 a 4° C) y cortados fina-

mente para su fijación e inclusión en Durcupan (Fluka) previa osmificación y contraste con acetato de uranilo.

Sistemáticamente efectuamos control y estudio de todos los casos mediante cortes semifinos incluidos en Durcupan y teñidos con azul de toluidina. Este material es estudiado con microscopía óptica y establece un importante y a veces decisivo escalón intermedio entre la microscopía óptica convencional y la microscopía electrónica. El estudio microscópico electrónico ha sido llevado a cabo en microscopios Jeol, tipo JEM T8 y JEM 100 B, con un voltaje de 80 kv.

Resultados

1. Microscopía óptica

En el momento actual, y siguiendo los criterios ya clásicos de EWING (1921), OBERLING (1926), JAFFE (1958), y SCHA-JOWITZ (1959-1972), aceptamos bajo la terminología de sarcoma de Ewing aquellos tumores primitivos del hueso, que apareciendo con preponderancia en niños y adolescentes, muestran los siguientes caracteres microscópicos:

— Células redondas, pequeñas y homogéneas con núcleos regulares de 10 a 12 micras de tamaño. Cromatina poco densa. Mitosis frecuentes pero no excesivas.

— Glucógeno citoplásmico abundante en bloques PAS positivos o carmín de Best positivo.

— Estroma ausente o muy pobremente desarrollado con ocasionales fibras en lóbulos de distribución perivascular.

— Vascularización de tipo capilar moderada con endotelios en ocasiones impresionantes. Lagunas hemorrágicas aisladas.

— Las células pueden disponerse en corona perivascular o bien rodeando zonas irregulares de necrosis.

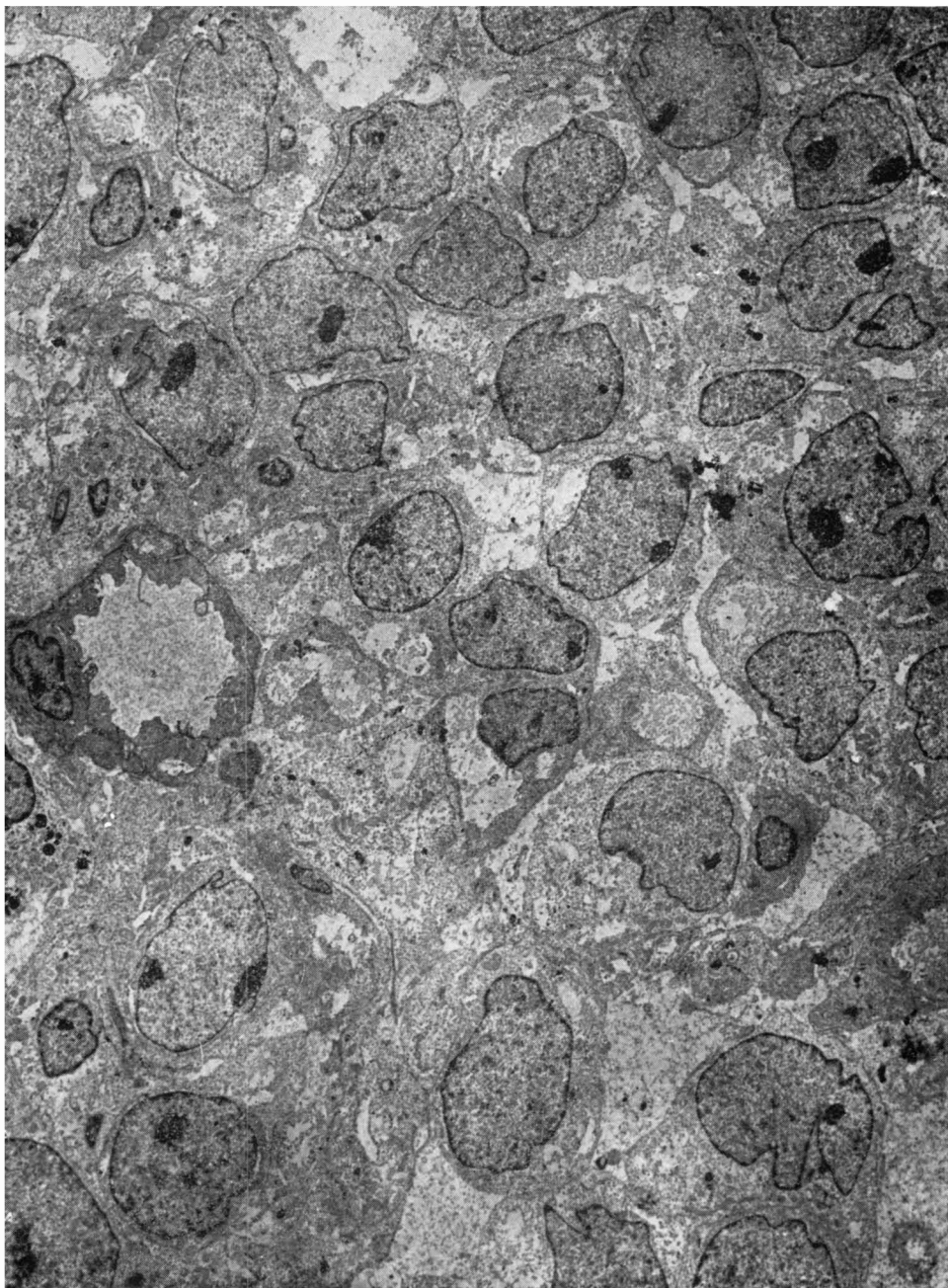


FIG. 9. — Visión electrónico microscópica de un sarcoma de Ewing típico, formado exclusivamente por células principales blastemales con glucógeno (en visión negativa). Vaso prominente aislado del tumor: 1.800 ×.

Tipificación de las distintas formas celulares: Utilizando la microscopía óptica en cortes de 4-6 micras es factible encontrar, aun dentro de la homogeneidad que caracteriza a esta neoplasia, distintas formas celulares que vamos a analizar seguidamente con un mayor detalle.

La célula más frecuente tiene una apariencia blastémica, indiferenciada, siendo por ello denominada como *célula principal* del tumor. Posee ella apariencia regular, homogénea, núcleo redondeado, ocasionalmente oval y una cromatina finamente distribuida. Los límites celulares son imprecisos si bien muestran clara tendencia a adosarse compactamente entre sí. El núcleo tiene uno o dos nucléolos pequeños, ocasionalmente son de disposición polar.

En el citoplasma aparecen acúmulos de glucógeno en bloques más o menos compactos, formando masa que ocupa gran parte del citoplasma. Hay una gran labilidad y grado de caprichosidad en la distribución del glucógeno, mientras que en otras porciones del tumor este glucógeno, que es muy sensible a la diastasa, tiende a acumularse como si su producción tuviera carácter clonal por grupos o familias de células. Múltiples células principales pueden carecer de glucógeno, no siendo ello debido a una irregularidad en la preparación del material.

En improntas del tumor, las células principales tienen contorno redondo muy homogéneo, cromatina finamente reticular y citoplasma mal definido. Hay frecuentes signos de involución y pignosis.

Asociada a esta célula principal y matriz de la neoplasia, aparece íntimamente mezclada con ella e incluso en continuidad de unas con otras un segundo tipo celular, que ha sido clásicamente considerado como *célula secundaria* o por su mayor densidad citoplásmica y nuclear, también es conocida como *célula oscura* («dark cell»). Esta célula tiene un tamaño ligeramente inferior

a la principal (8-10 micras) y sus bordes son mucho más imprecisos que la anterior. Aparece aislada o en grupos. No tiene preferencia perivascular o periférica. Se hace más abundante en áreas necrobióticas.

Su configuración es más irregular que la anterior. El núcleo, tiende a adoptar un aspecto elongado o fasciculado siendo su cromatina densa y su contorno provisto de invaginaciones e irregularidades de superficie. Persiste un nucléolo, no siempre bien visible. No hay signos de pignosis. El citoplasma carece de bordes precisos. Contiene también glucógeno si bien en menor cantidad que la célula principal. No hemos encontrado actividad divisional en estas células.

La asociación de ambos tipos celulares es muy estrecha y varía dependiendo del área tumoral estudiada. En las zonas periféricas e infiltrativas es más frecuente ver el tipo de célula oscura, la cual parece mostrar una mejor capacidad adaptativa y se introduce entre el estroma periosteal o a través de partes blandas formando filas o hileras irregulares. En general las zonas de invasión tumoral (periosteal, muscular o intraósea medular) contienen predominantemente estas células oscuras.

No ocurre así con las metástasis a distancia, de forma que en ellas (hemos estudiado dos metástasis hepáticas y pulmonares) las imágenes reproducen con toda fidelidad el tumor primitivo óseo.

La relación con los vasos de estas células es muy íntima pero nunca llegan a formar verdaderos endotelios existiendo membranas basales de separación que llegan incluso a aparecer fuertemente hialinizadas y con luces angostas. Las células neoplásicas rodean a modo de empalizada estas paredes. Alguna célula sarcomatosa ha sido vista, mediante el empleo de cortes semifinos, infiltrando la luz del vaso. No hay trombos tumorales. Existe, como insistiremos en la microscopía electrónica,

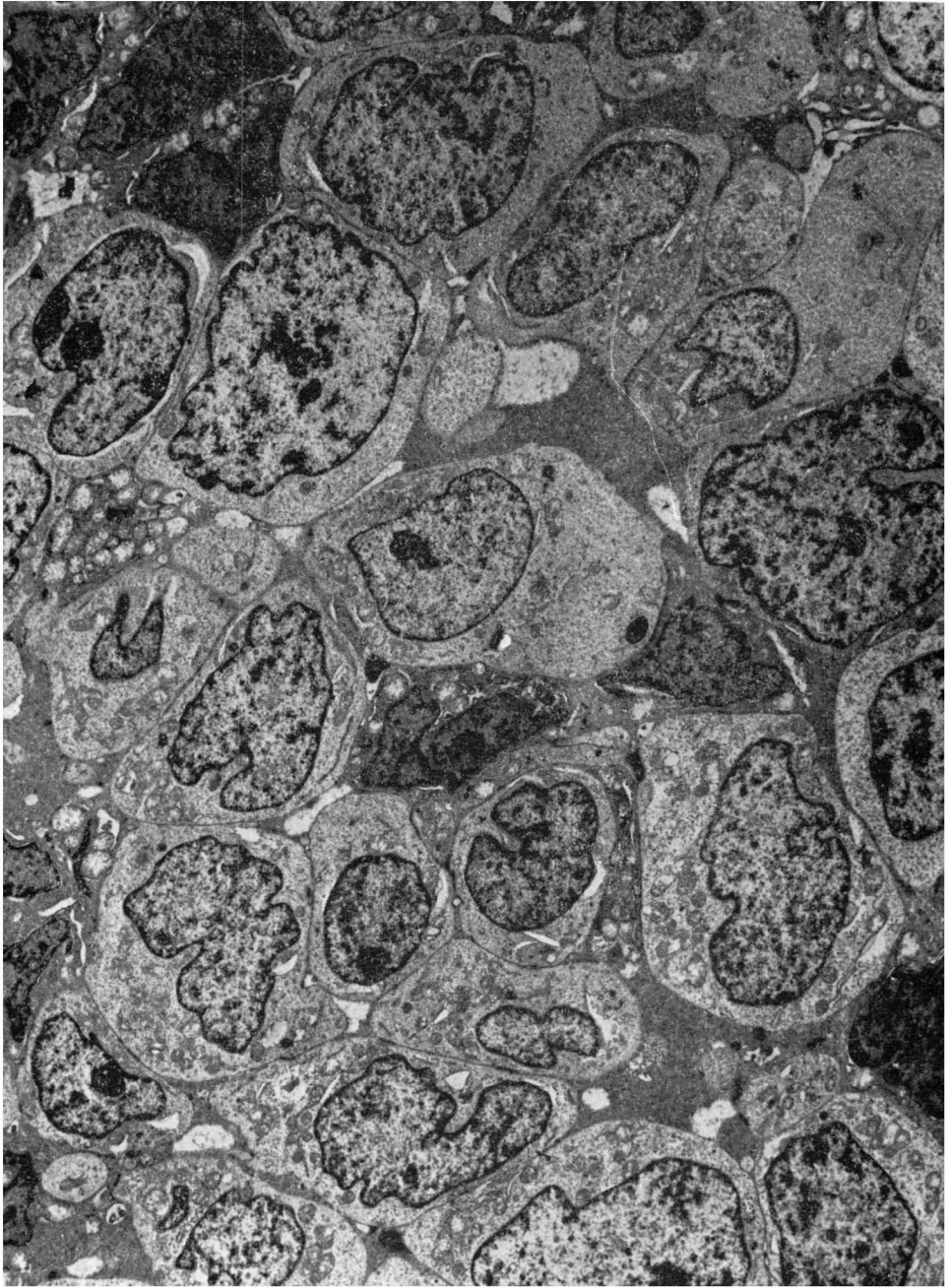


FIG. 10. — Sarcoma de Ewing típico: Células principales desprovistas de glucógeno y células secundarias ("dark cells"). Apréciense células transicionales entre ambas. 2.000 \times .

una hiperplasia reactiva muy intensa del endotelio en algunos vasos que puede dar lugar a una falsa imagen tumoral.

La participación fibrilar es muy escasa. Generalmente se limita a septos más o menos finos que lobulan el conjunto del tumor dejando amplias áreas totalmente desprovistas de estroma, así como también a finas redes de disposición perivasculares. El resto de la neoplasia está totalmente desprovista de estroma reticular.

Con técnicas argentícas aparecen ocasionales bloques argentafines entre las células neoplásicas. Corresponden a irregulares y escasos depósitos de fibrina.

La valoración de la trama reticular en el sarcoma de Ewing es muy importante por cuanto ella va a diferenciarse de modo progresivo y aumentar en intensidad en la variante atípica del mismo, aunque como es lógico sin alcanzar los niveles de densidad propios del llamado reticulosarcoma de Jackson y Parker.

En estas condiciones morfológicas y con dichos tipos celulares, podemos definitivamente caracterizar lo que nosotros consideramos con un sarcoma de Ewing típico o también siguiendo la misma norma en concepción anglosajona lo que recientemente hemos descrito como «*Conventional Ewing's sarcoma*».

Esto entraña la existencia, admitida por nosotros, de una variante atípica del tumor. Esta forma de «*Sarcoma de Ewing atípico*» posee la siguiente diferenciación celular, así como las características estrómicotumorales que indicamos:

La célula principal del tumor tiene un carácter indiferenciado, blastémico, pero una configuración mesenquimal o histoblástica inmadura. Ambas formas, mesenquimal o histoblástica posee también su variante secundaria o madura, de análoga estirpe como la matriz o célula principal.

La célula mesenquimal que forma el tumor atípico de Ewing es algo mayor en

tamaño que su homóloga alcanzando unas 14 micras. El núcleo es redondeado u oval, si bien presenta una o más escotaduras e incluso aisladas invaginaciones profundas de la membrana nuclear. Suele tener localización central en la célula. La cromatina es laxa y en forma granujienta. El nucléolo aunque evidente, no aparece tan manifiesto como en la variante histiocitaria. En el citoplasma existe glucógeno, si bien con menos abundancia que en las células principales del Ewing típico. Amplias áreas de la tumoración pueden estar totalmente vacías de glucógeno, o éste se descubre incluido en una pequeña cantidad sobre grupos más aislados de 20 a 40 células sin localización preferente dentro de la neoplasia.

Consideramos con un carácter histiocítico inmaduro (histioblasto) a aquellas células del sarcoma de Ewing que poseen las siguientes peculiaridades: núcleo grande redondeado u oval con una o dos invaginaciones, uno o dos grandes nucléolos muy prominentes y densos; citoplasma basófilo con moderada cantidad en glucógeno. En conjunto esta célula principal posee tamaño de unas 14 micras siendo más grande que la célula principal del Ewing típico. No hemos encontrado con microscopía óptica signos de actividad fagocitaria. Hay aisladas inclusiones de lípidos, en forma de finas gotas en el citoplasma. La actividad divisional es moderada.

Tanto la célula principal histiocitaria como la mesenquimal, poseen su correspondiente variante celular más densa («dark cell», célula oscura) equiparable con la descrita en el Ewing típico. Son, a nuestro entender, formas involutivas de la célula principal, no teniendo una personalidad específica propia. Esto volveremos a confirmarlo mediante microscopía electrónica.

Otras particularidades visibles en esta variante de tumor de Ewing atípico son las siguientes:

Los vasos son tan irregulares en su distribución y número como en el Ewing típico. Hay fuerte condensación de basales formado por material PAS positivo. Con independencia aparecen lagunas hemorrá-

gicas cubiertas por endotelios cuyas células tienen carácter tumoral. En algunos casos incluso parecen adoptar textura endoteliforme, aunque muy atípica justificando en cierto modo el criterio primitivo de Ewing

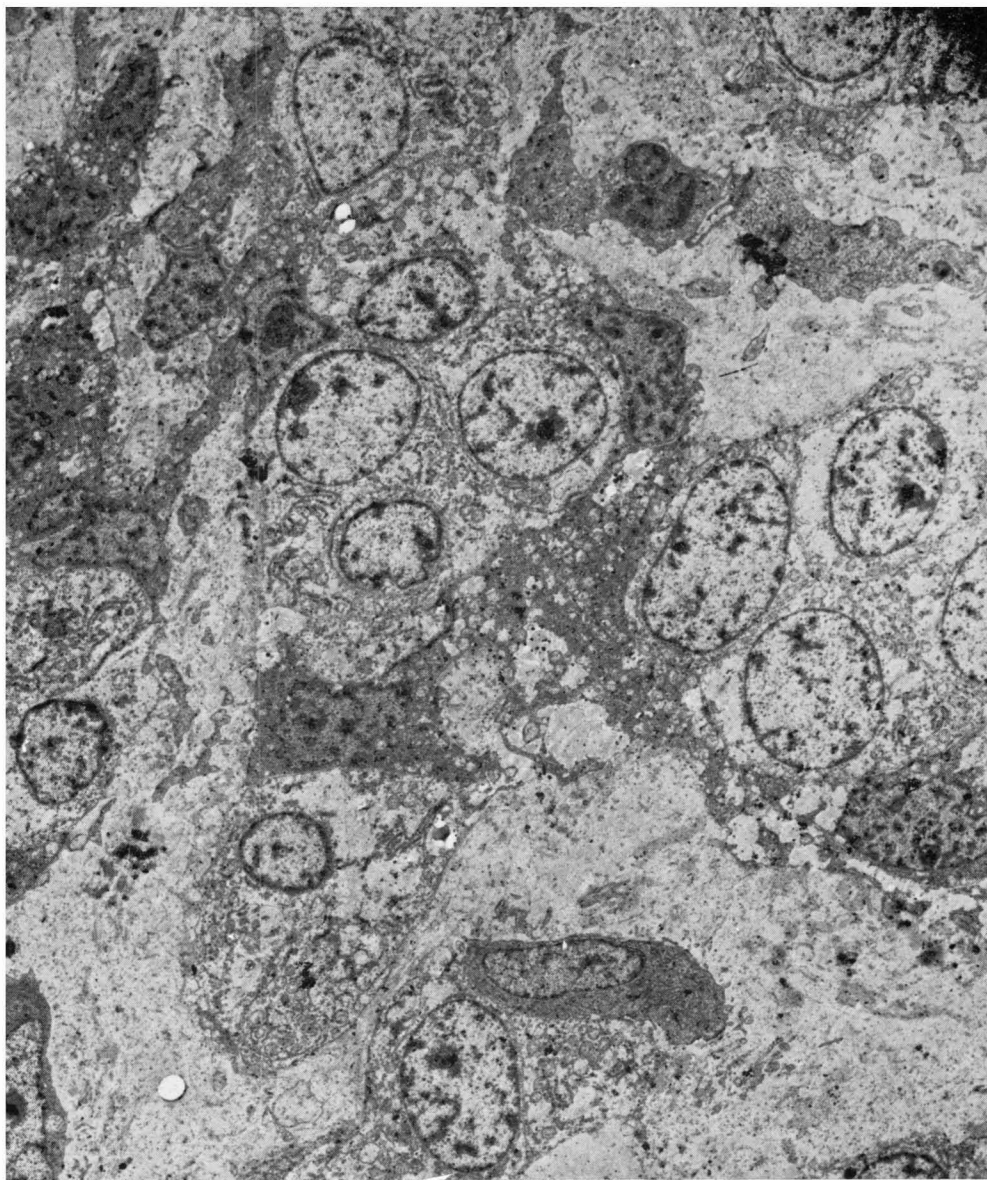


FIG. 11. —Sarcoma de Ewing atípico. Voluminosos núcleos y mayor grado de desarrollo citoplásmico aun conteniendo glucógeno (visión negativa). 1.600 \times .

(1921). No hemos visto verdaderos angiosarcomas o hemangioendoteliomas.

La trama reticular es más abundante en los Ewing atípicos y adopta una imagen moderadamente plexiforme o en canastilla englobando, no a células aisladas, sino a grupos celulares de 10 a 15 unidades agrupadas en bloques o en hileras. Se distribuye también en red perivascular y se funde con la trama conectiva lobular de la periferia tumoral.

Además existe una mayor amplitud y extensión de las necrosis tumorales, las cuales adoptan un cierto carácter de contorno geográfico. La participación inflamatoria es moderada.

La relación entre tumor y hueso en el sarcoma de Ewing es diversa y dependiente del grado de infiltración de la cortical ósea. Puede existir una infiltración del hueso esponjoso o laminar y se ven signos de osteolisis. Hay moderada osteogénesis reactiva en algún caso. No existe, sin embargo, relación alguna entre tumor, el estroma óseo o la medula hematopoyética.

La citología por improntas descubre en estas células del Ewing atípico una mayor heterogeneidad e irregularidad del contorno nuclear. El número y volumen de los nucléolos es más evidente.

Citoquímica enzimológica: Nuestra experiencia en este terreno ha sido hasta el presente limitada, si excluimos la sistemática observación del contenido en glucógeno mediante la técnica de PAS y carmín de Best, que descubre un variable, pero en general, intenso contenido en glucógeno de todos estos tumores. Es sensible a la acción de la diastasa desapareciendo tras su tratamiento.

La riqueza de glucógeno, como ya hemos indicado es mayor en el Ewing típico, siendo más escasa en el atípico. Esto no obsta para haber encontrado casos de

Ewing típico en que la ausencia de glucógeno fue total, tanto a nivel óptico como buscada con microscopía electrónica.

Todas las células neoplásicas en el Ewing muestran una actividad enzimológica muy intensa en diaforasas del NADH y NADPH, así como en láctico, málico, succínico e isocítrico deshidrogenasas. También mostraron fuerte actividad en ATP asas (ph 9'4) a nivel citoplásmico. Asociado con el metabolismo del glucógeno hemos encontrado actividad citoplásmica en glucosa-6-fosfatasa y en fosfatasa alcalinas y fosfatasa ácidas.

2. Microscopía electrónica

Vamos a revisar seguidamente la morfología de cada uno de los tipos celulares descritos previamente en microscopía óptica, señalando sus particularidades más sobresalientes:

Célula principal. — Es una célula muy indiferenciada e inmadura con núcleo redondo o moderadamente elongado. En ocasiones muestra invaginación fina y profunda de la membrana. La cromatina es muy fina, casi pulverulenta de modo que el núcleo aparece poco contrastado. Hay algunos grumos periféricos de heterocromatina. No hemos encontrado inclusiones o glucógeno intranuclear. El nucléolo es único o doble con dominio del componente estructurado filamentoso. No tiene un carácter especial.

Los límites celulares son precisos. La membrana externa es continua, generalmente está bien conservada y en íntimo contacto con la otra vecina. Aparecen desmosomas generalmente muy imperfectos, a modo de condensaciones de la membrana celular pero sin filamentos, ni tampoco sin sustancia intermedia intercelular de condensación. En algún caso hemos podido comprobar la aparición de largas uniones estrechas que recuerdan los *nexus* («gap

junction») los cuales se extienden durante largas porciones de la membrana.

En el citoplasma destaca la pobreza visible en orgánulos. Cuando la célula contiene glucógeno, esta disminución en orgánulos es todavía más llamativa. El glucógeno aparece formando masas amorfas y confluentes de preferente situación perinuclear. Hay abundantes células principales sin glucógeno. También se encuentran abundantes mitocondrias. Estas generalmente tienen escasas crestas y su matriz aparece vacuolizada. No es extraño ver signos involutivos mitocondriales y degeneración avanzada de sus crestas.

Hay ribosomas frecuentes en grupos polirribosómicos. Tienden ellos a aparecer asociados a algún sistema membranoso de retículo endoplasmático que esporádicamente y sin organización particular aparece per-

dido dentro del citoplasma celular. El aparato de Golgi no es prominente. Hemos hallado ocasionales vesículas de inclusión sin significado específico. También aparecen algunas vacuolas grasas, así como inclusiones de lípidos revestidos por membrana unitaria; se puede esporádicamente detectar lisosomas primarios, pero no hay signos de activación.

Estas células tienden, en general, rápidamente a degenerar y como consecuencia aparecen signos involutivos nucleares y citoplasmáticos que son la base ultraestructural de la llamada *célula secundaria* o también conocida como célula oscura. Su imagen electromicroscópica es la siguiente: aparece aislada o en grupos y en número variado, pero siempre en relación o íntima continuidad con las células principales con las que establece contactos de

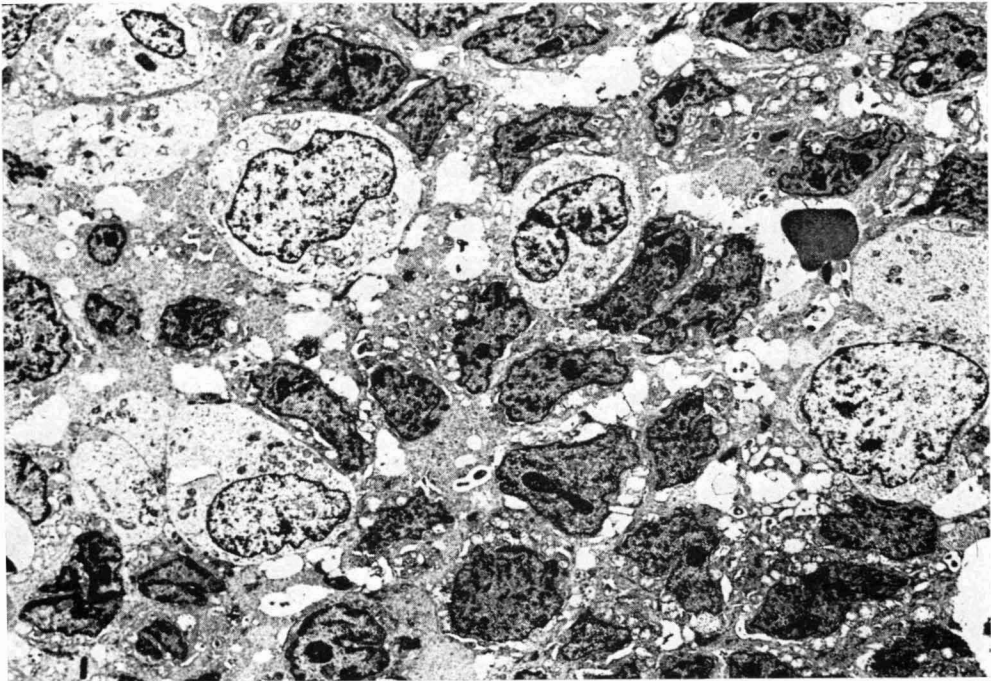


FIG. 12.—Sarcoma de Ewing típico con dominio de células secundarias ("dark cells") entre las cuales aparecen aisladas células principales. La distinta condensación cromática resalta en el componente tumoral que muestra una mayor irregularidad. 1.800 ×.

superficie de membrana equivalentes a los vistos entre las células principales. No hemos encontrado tipos de unión estrecha o desmosomas. En conjunto el grado de conservación de las membranas en todas estas células es todavía peor que en las anteriores.

El tamaño celular es algo más pequeño y especialmente la densidad nuclear y citoplásmica mucho más elevada. En efecto, el núcleo posee una cromatina densa en grumos o costras, mientras que sus límites son más irregulares e incluso presentan numerosas invaginaciones en dedo de guante; alguna de estas invaginaciones es profunda y da irregular contorno nuclear. El núcleo queda oculto en parte por la cromatina densificada.

En el citoplasma aparecen usualmente signos involutivos mitocondriales muy intensos. El desarrollo del retículo endoplasmático es más impreciso y aumenta conside-

rablemente el número de ribosomas no unidos a membranas. Hay frecuentes inclusiones de lípidos, si bien ello se produce sólo en algunas células. El glucógeno tampoco aparece de modo constante en todos los citoplasmas habiendo ocasiones en que la célula carece totalmente del mismo.

Hemos encontrado numerosas imágenes de transición entre las llamadas células principales y secundarias motivo por el cual consideramos a estas segundas como expresión involutiva y degenerativa de las primeras. No quiere ello significar, sin embargo, que todas las células principales se transforman en secundarias por un mecanismo de involución ya que también hemos visto frecuentes células principales en picnosis y lisis, lo cual indica que la transición desde célula principal a secundaria no es una condición obligada, pero sí frecuente. La existencia de células degenerativas necrobióticas es muy frecuente

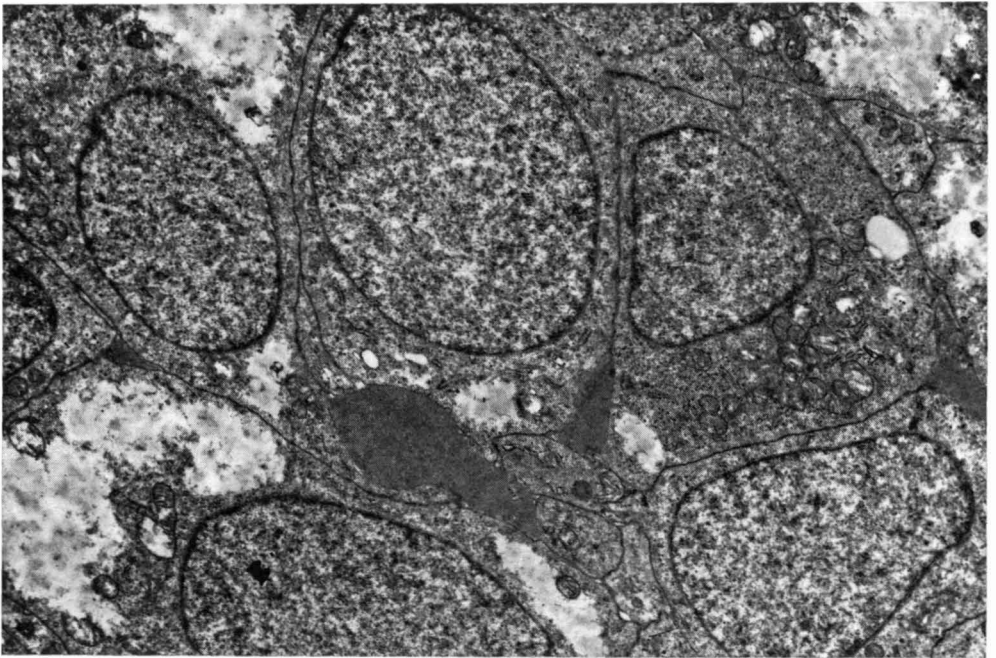


FIG. 13. — Sarcoma de Ewing típico: células principales mostrando delicada red cromática y citoplasma abundante pobre en orgánulos. Depósitos numerosos de glucógeno. 6.000 \times .

en este tumor. Aparecen signos de lisis de membranas así como condensación atípica de la cromatina. En un caso hemos encontrado inclusiones citoplásmicas como mitocondrias y retículo endoplasmático dentro del núcleo en la cariolinfa, considerándolo como expresión involutiva de la célula.

Tienen también carácter involutivo las vesiculaciones presentes tanto en la membrana nuclear como en las vesículas o vacuolas del citoplasma adoptando así la imagen que es conocida de tumefacción turbia y degeneración hidrópica. Finalmente también encontramos grupos o células aisladas en picnosis avanzada y con cariólisis o rexis nuclear.

El tipo de *célula mesenquimal* configurando la célula principal del Ewing atípico tiene muchas semejanzas con lo hasta ahora visto, presentando las siguientes particularidades más específicas: Núcleos más

grandes con mayor irregularidad de superficie y densificación mayor de la cromatina. Grandes nucléolos (uno o más). No hay alteraciones de la membrana nuclear. Ausencia de cuerpos de inclusión intranuclear. El citoplasma tiene bordes precisos y límites externos netos. Hay uno o varios desmosomas en contacto con células vecinas. El grado de elaboración de estos desmosomas es superior al descrito previamente. En el citoplasma los orgánulos son más abundantes y mejor elaborados. El número de mitocondrias es elevado y no presenta usualmente signos de involución. Sus crestas son numerosas y la matriz no está vacuolizada. El retículo endoplasmático es más abundante y los ribosomas también. Existen frecuentes complejos multivesiculares tipo Golgi.

Aislados en el citoplasma en forma de pequeños grupos de 20 ó 40 unidades y

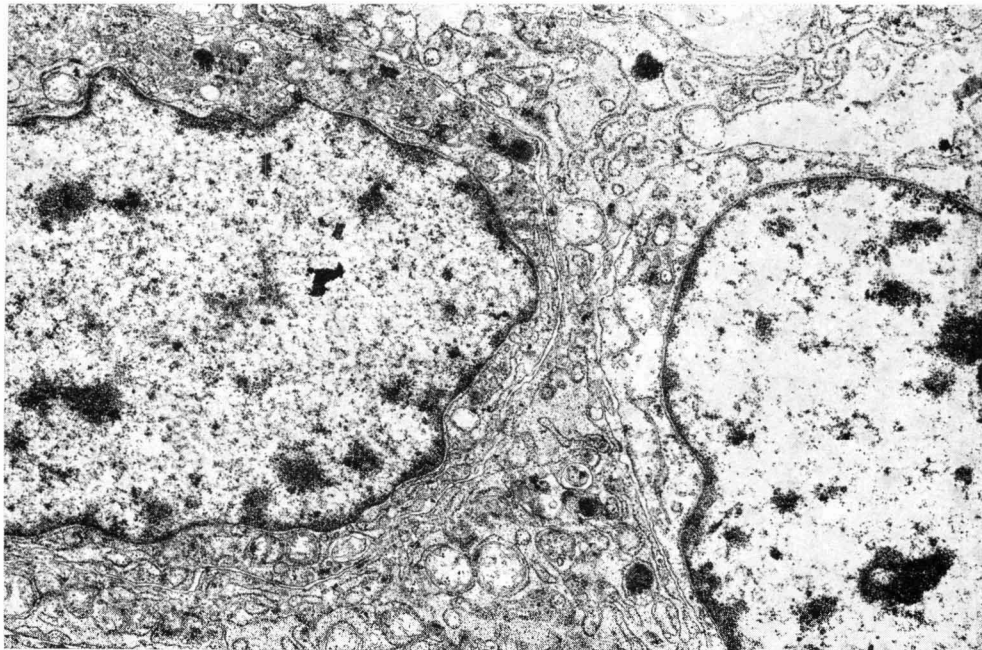


FIG. 14. — Sarcoma de Ewing atípico: Detalle de dos células tumorales demostrando mayor irregularidad cromática nuclear (cromatina condensada) y citoplasma con abundantes orgánulos. 10.000 \times .

con disposición paralela o en bandas aparecen acúmulos de filamentos con un grosor de 80 a 100 Å y una longitud variable. Estos sistemas de filamentos carecen de cualquier tipo de estriación y en ocasiones presentan una perfecta relación con sistemas mitocondriales, así como también con gotas de grasas neutras organizando lo que hemos llamado como «*complejos mitocondriales y fibrilares*». No hemos visto gránulos de secreción. El glucógeno aparece condensado en el citoplasma sin ninguna localización preferente. Es homogéneo, amorfo y en menos cantidad que el visto dentro de las células principales de Ewing típico.

Existen como en el caso anterior, células de tipo secundario, con mayor contraste microscópico electrónico pero en íntima continuidad con los anteriores. Hay transición entre ambos tipos y creemos nosotros que ambas células no son sino un distinto estadio evolutivo en el ciclo biológico de la célula principal al adquirir ésta un carácter más adulto o involutivo senil. Tampoco hemos visto mitosis en las células secundarias.

Las células con *diferenciación aparente histiocitaria (histioblástica)* carecen de actividad macrofágica. En tamaño y organización general semejan a las anteriores. Aquí lo más destacado a nivel electrónico microscópico es su gran desarrollo nucleolar, así como los grandes complejos de retículo endoplasma rugoso que aparecen en el citoplasma formando amplias bandas o redes de distribución más o menos paralelas. A ello se une una gran riqueza ribosómica. Las células tienen desmosomas en puntos de unión con las vecinas. Hay algunos lisosomas primarios sin activación. No existe evidencia alguna de activación macrofágica. Este tipo de célula contiene también eventualmente glucógeno si bien en pequeños grumos aislados dentro del citoplasma.

Todos estos tipos celulares que forman el componente básico del sarcoma de Ewing tanto en su forma convencional como en su variante más atípica no deben ser confundidos con otras células que esporádicamente aparecen en el tumor. Las más importantes son las siguientes: elementos hemáticos maduros e incluso células hematopoyéticas, así como asociación muy íntima entre células principales del sarcoma junto a osteoblastos reactivos en áreas de infiltración. Puede ello plantearse problema diagnóstico diferencial por cuanto estos osteoblastos contienen también glucógeno aunque en menor cantidad.

Los bordes del osteoblasto son irregulares, estrellados o digitiformes. El citoplasma es muy rico en orgánulos, especialmente retículo endoplasma, viéndose incluso dilataciones vesiculares del mismo y matriz interna más densa. Además el núcleo raramente es redondo y homogéneo sino que suele estar provisto de varias escotaduras.

También hay que tener presente la eventual existencia de macrófagos activos incluidos dentro del tumor entre las células neoplásicas y con una fuerte capacidad lítica. El número de lisosomas primarios y secundarios que aparecen en su citoplasma distingue fácilmente esta célula de las que configuran el sarcoma de Ewing.

Problema más difícil plantea la diferenciación vascular en su análisis electrónico microscópico. Las células endoteliales reactivas e hiperplásicas muestran un núcleo grande globoso y una cromatina extremadamente fina. El citoplasma es muy claro y vesiculado viéndose en superficie microvesículas de pinocitosis. Hay también cuerpos vesiculares múltiples tipo Weible-Palade. A pesar de todo en ocasiones hemos tenido dificultad en diferenciarlas de células tumorales.

También existen imágenes pseudovasculares de Ewing atípico. Un estudio deta-

llado de este problema fue publicado por nosotros hace unos años (LLOMBART-BOSCH y cols., 1970).

Comentarios

Las dificultades en tipificar el sarcoma de Ewing no sólo procede de su diversidad textural y microscópica electrónica sino también de la existencia de otros procesos neoplásicos óseos, como es el reticulosarcoma de Jackson y Parker (1939) que parece poseer nexos próximos en su organización biológica. Existen como es lógico diferencias en la presentación clínica, incidencia de edad y sexo, así como distribución anatómica con su correspondiente reflejo clínico que hacen la distinción posible, sin embargo, estos tumores a nivel óptico pueden presentar análogas morfologías que hacen su identificación dificultosa.

Por ello el análisis microscópico electrónico, así como la utilización de técnicas histoquímicas y de cortes semifinos ha venido a aclarar algo el amplio y a nuestro juicio todavía confuso cuadro existente en la actualidad a nivel de lo que clásicamente podríamos considerar como sarcomas de células redondas del hueso, con la lógica exclusión de los procesos sistematizados como es el caso de las leucemias y mielosarcomas.

El estudio microscópico electrónico de distintos autores como FRIEDMAN y GOLD (1968), LLOMBART BOSCH y cols. (1970), TAKAYAMA y SUGAWA (1970), HOU-JENSEN y cols. (1972), RICE y cols. (1972) ha llevado a confirmar la naturaleza blastemal indiferenciada de la célula principal del sarcoma de Ewing, en cuyo citoplasma aparece como distintivo especial el alto contenido en glucógeno (SCHAJOWICZ, 1959; SCHAJOWICZ y cols., 1972). Estas

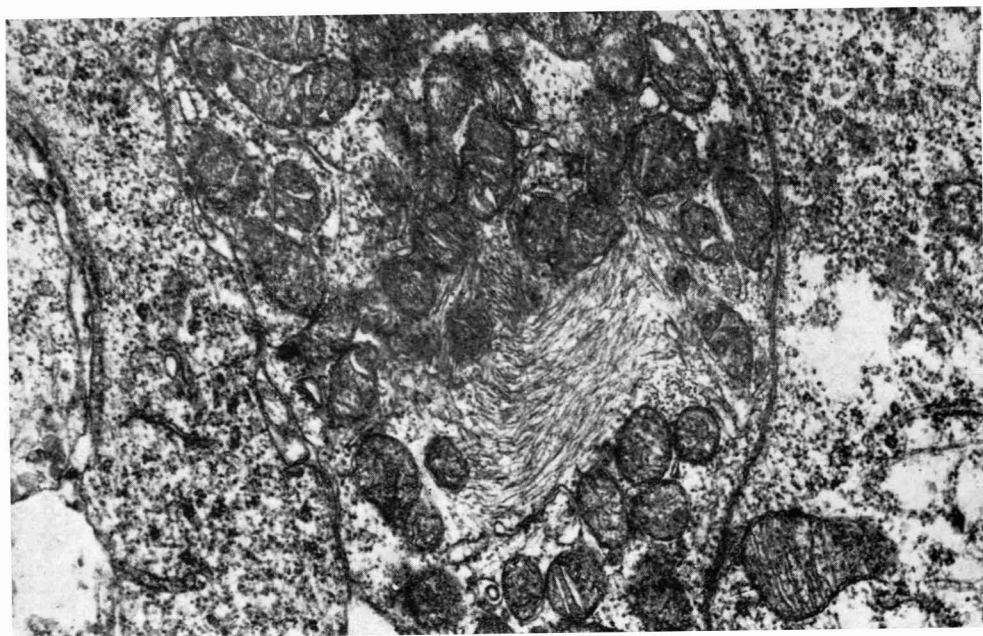


FIG. 15. — Sarcoma de Ewing atípico: Citoplasma de una célula neoplásica con asociaciones densas filamentosas y mitocondrias agrupadas en su periferia. 16.000 \times .

células principales se encuentran en una íntima asociación y continuidad con otras secundarias («dark cells») que poseen una distinta densidad electrónico microscópica y en apariencia un carácter más maduro. Suponiéndoles algunos autores incluso naturaleza reticular (OBERLING, 1928; FRIEDMAN y GOLD, 1968). También existen situaciones intermedias entre células principales y secundarias (LLOMBART BOSCH y colaboradores, 1970; LLOMBART BOSCH y BLACHE, 1974).

Basadas en estas experiencias y con un análisis de sarcomas de medula ósea con tipología celular redonda de los cuales 23 pueden encuadrarse bajo el subfijo de sarcoma de Ewing, hace unos años (1974) defendimos la existencia de distintas variantes dentro de este grupo celular que podrían condicionar hasta cuatro tipos distintos de tumor, extendiéndose desde una forma blastemal muy indiferenciada, hasta la reticular madura y próxima al reticulosarcoma de Jackson y Parker. Estas serían las características de los cuatro tipos de Ewing que fueron tomadas en consideración por nosotros en un principio:

Ewing tipo I: Formado por células principales de tipo blastemal indiferenciado con carácter dominante. Algunas células reticulares más maduras de tipo oscuro. Abundante glucógeno.

Ewing tipo II: Estaría compuesto por células de tipo blastemal pero predominantemente de tipo más oscuro (células secundarias) y tendrían un carácter más maduro. Su contenido en glucógeno sería menor.

Ewing tipo III: Tumor formado por células reticulares inmaduras pero con aparente diferenciación mesenquimal y angioendoteliomatosa. Menor riqueza en glucógeno celular. Mayor irregularidad nuclear y actividad ocasional macrofágica.

Ewing tipo IV: Correspondería a lo que llamábamos «forma dudosa de Ewing» en que las células adoptarían un aspecto reticular e histiocitario más activo y próximo al sarcoma de Jackson y Parker que tendría ya una verdadera naturaleza reticulosarcomatosa.

En este sentido nos hemos expresado en distintas comunicaciones a Congresos (Deutsche Gesellschaft für Pathologie Interlaken, 1974; SIOP, Stockholm, 1975) pero haciendo al mismo tiempo revisión crítica de nuestras propias observaciones y conceptos, que pueden fundamentalmente resumirse como hemos expuesto de nuevo muy recientemente (1976, 1976 bis), bajo las siguientes situaciones:

— La diferenciación de células principales y secundarias (oscuras) no indica una diferencia histogénica ni un significado biológico distinto, sino son simplemente estadios funcionales con representación morfológica distinta y posiblemente de carácter involutivo en dependencia con la edad celular. No está por ello justificado el considerar dos tipos distintos de neoplasia (Ewing I y II). Tampoco es cierto que la célula oscura sea de estirpe «reticular» madura.

— La aparición de senos vasculares, descritos por nosotros en un caso (A. LLOMBART BOSCH, 1970) y vistos en otro segundo, no está asociada a una definitiva transformación hemangioendotelial. Estos tumores poseen un carácter blastemal mesenquimatoso o histiocitario que permite diferenciarlo del grupo anterior. Basado en ello lo consideramos como forma atípica de sarcoma de Ewing.

— Hemos descartado una directa transición entre el sarcoma de Ewing y el discutido reticulosarcoma de Jackson y Parker. El tipo IV de Ewing (Ewing dudoso) ha sido anulado introduciéndose bien en el grupo de los reticulosarcomas de dife-



● EWING TIPICO = 15 CASOS

⊗ EWING ATIPICO = 8 CASOS

DISTRIBUCION ANATOMICA

DEL SARCOMA DE EWING

renciación histiomonocitaria, o bien en la forma atípica de sarcoma de Ewing.

Basados, pues, en nuestra actual experiencia creemos poder defender la existencia dentro del grupo de tumores de Ewing, de al menos dos variedades morfológicas distintas: el llamado Ewing típico y la forma atípica de Ewing.

Ewing típico: Es el tipo más frecuente de presentación del tumor de Ewing y actualmente estamos tratando de analizar con carácter retrospectivo un amplio material disponible sólo de microscopía óptica. Este tumor está formado por acúmulos sólidos o nidos compactos de células blastemales indiferenciadas de tipo principal las cuales aparecen íntimamente adosadas entre sí, conteniendo generalmente abundante glucógeno.

En muy íntima relación y en variada profusión aparecen las células secundarias más densas electromicroscópicamente y que tienen glucógeno en menor proporción. La proporcionalidad entre células principales y secundarias varía según el área estudiada dentro de un mismo tumor pudiendo invertirse la imagen y dominar las células

oscuras sobre las primeras en algunas áreas. El espacio intersticial es muy pobre careciendo de fibras. Hay ocasionales vasos con paredes hialinizadas e hiperplasia endotelial. Existen numerosos depósitos de fibrina.

Ewing atípico: Se caracteriza por las siguientes texturas: las células principales, aún manteniendo su naturaleza inmadura tienen mayor tamaño que las anteriores y una diferenciación incipiente en sentido mesenquimal o histiocitario. Sus núcleos aparecen algo más irregulares y el nucléolo es muy prominente. En el citoplasma hay una mayor basofilia así como presencia de un desarrollo manifiesto del retículo endoplasma granular y Golgi. Existen desmosomas y filamentos citoplásmicos llegando incluso a formar complejo de filamentos y mitocondrias en una íntima asociación.

La disposición arquitectónica de esta variante es análoga a la anterior aunque la trama reticular está mejor desarrollada y adopta configuración en cesta o panel de miel. Hay también una vascularización más intensa con pseudo-endotelios vasculares.

DISTRIBUCION POR EDAD DE 23 SARCOMAS DE EWING

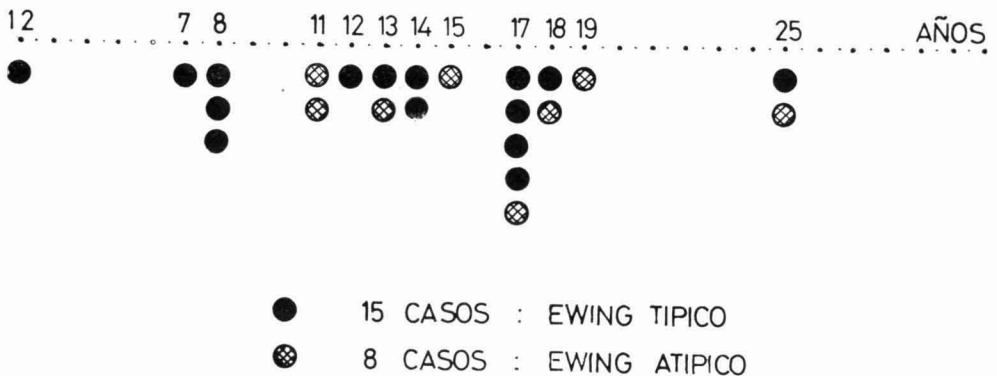


TABLA 3

Las necrosis son más frecuentes y extensas.

El contenido en glucógeno persiste en la mayoría de estas células si bien con menor intensidad que el Ewing típico.

El sarcoma de Ewing es considerado en la actualidad como uno de los tumores óseos que ofrece un peor pronóstico evolutivo. A pesar de ello revisando la literatura puede apreciarse una cierta discordancia en los resultados clínicos. Mientras algunos autores ofrecen resultados alentadores (BHANSALI y DESAI, 1963; MORTON, 1964; PHILLIPOS e HICIN-BOTHAM, 1967) otros logran sólo muy pobres supervivencias (SUTON y cols., 1971; PALMA y colaboradores, 1972; KOTZ y cols., 1974). Es indudable que en esta diversidad de resultados existen múltiples factores a tener en cuenta como es el estadio clínico en el momento diagnóstico, así como la localización anatómica del tumor o el tipo de terapéutica empleada (cirugía, radioterapia con o sin quimioterapia, etc.). Sin embargo, la evidencia aportada a través de estos trabajos de nuestro grupo demostrando una diversidad morfológica dentro del llamado «sarcoma de Ewing» creemos puede jugar un papel importante en comprender el porqué de esta discordancia en la respuesta clínica evolutiva.

Otras diferencias importantes en función de la edad, sexo o localización anatómica primitiva del tumor no parecen ser tan importantes, cuando se analizan en función del carácter típico o atípico del sarcoma de Ewing como se deduce a través de nuestros propios estudios (LLOMBART BOSCH, BLACHE, PEYDRÓ, 1976) (tablas 2, 3 y 4).

La escasa incidencia de este tumor hace

TABLA 4.—Distribución del sarcoma de Ewing en función del sexo

Ewing típico, varón/hembra. ...	14/1 casos
Ewing atípico, varón/hembra ...	4/4 casos

el análisis cuantitativo dificultoso, motivo por lo que creemos es necesario recoger en grupos de estudio cooperativo el mayor número de casos que puedan ampliar la presente experiencia sobre la verdadera identidad, significado y naturaleza histogénica de los muy todavía mal encuadrados sarcomas de células redondas de la medula ósea. Lo aportado aquí con el sarcoma de Ewing no es sino un primer paso en este sentido.

BIBLIOGRAFIA

- BHANSALI, S. K. y DESAI, P. B. (1963): Ewing's sarcoma. Observations on 107 cases. *J. Bone Jt. Surg.*, A 45, 541.
- EWING, J. (1921): Diffuse endotheliome of bone. *Proc. N. Y. Path. Soc.*, 21, 17.
- EWING, J. (1940): *Neoplastic Diseases*. A treatise on tumors. 4 Ed. V. B. Saunders Co. Philadelphia.
- FRIEDMAN, B. y GOLD, H. (1968): Ultrastructure of Ewing's Sarcoma. *Cancer*, 22, 307.
- FRÜLING, L. y CHADLI, A. (1957): Les tumeurs malignes de la moelle osseuse a evolution hematopoietique. Les sarcomes medullaires. *Ann. Anat. Path.*, 230-325, 23.
- HOU-JENSEN, K.; PRIORI, E., y DMOCHOWSKI, L. (1972): Studies on ultrastructure of Ewing's sarcoma of bone. *Cancer*, 29, 280.
- JAFFE, L. (1961): *Tumours and tumourous conditions of the bone and joints*. Lea and Febiger Ed. Philadelphia.
- KADIN, M. E. y BENCH, K. (1971): On the origin of Ewing's tumor. *Cancer*, 27, 257.
- KOTZ, R.; SALZER-KUNTSCHIK, M.; ZWEYMÜLLER, K., y SALZER, M. (1974): Therapy and Prognosis of Ewing-Sarcoma. *Austrian Jour. of Oncology*, 1, 15.
- LLOMBART, JR.; A. PEYDRÓ, A.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, A., y ZUZUARREGUI, C. (1970): Sur les sarcomes reticulaires de la moelle osseuse type Ewing. *Ann. Anat. Path.*, 15, 432.
- LLOMBART BOSCH, A. y BLACHE, R. (1974): Über die Morphologie und Ultrastruktur des Ewing-Tumors. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 58, 459.
- LLOMBART BOSCH, A. (1975): Morphological aspects of Ewing's Sarcoma of bone. SIOP meeting. Stockholm.
- LLOMBART BOSCH, A.; BLACHE, R., y PEYDRÓ, A. (1978): Ultrastructure of Ewing's Sarcoma of bone. An analysis of 28 cases. *Cancer*, 41, 1.362-1.373.
- MORTON, J. J. (1964): Treatment of Ewing's Sarcoma (Endothelial Myeloma of Bone). In PACK and ARIEL: Treatment of Cancer

- and Allied diseases. 2 Ed. Harper and Row. N. Y.
- OBERLING, CH. y RAILEANU, C. (1932): Nouvelles recherches sur les reticulosarcomes de la moelle osseuse (Sarcomes d'Ewing). *Bull. Cancer*, 21, 333.
- PALMA, J. y cols. (1972): Treatment of metastatic Ewing's Sarcoma with BCNU. *Cancer*, (Phil.), 30, 909.
- PARKER, F. JR. y JACKSON, H. (1939): Primary Reticulum Cell Sarcoma of Bone. *Surg. Gynec. and Obstet.*, 68, 45.
- PEYDRÓ-OLAYA, A. y LLOMBART-BOSCH, A. (1972): Sarcomas de células redondas de la médula ósea. Un estudio histoquímico y microscópico electrónico. *Sangre*, 17, 363.
- PHILLIPS, R. E. y HIGINBOTHAM, N. W. (1967): The curability of Ewing's endothelioma of bone in children. *J. Pediat.*, 70, 391.
- RICE, R.; CABOT, A. y JOHNSTON, A. (1973): The application of Electron Microscopy to the Diagnostic Differentiation of Ewing's Sarcoma and Reticulum cell Sarcoma of Bone. *Clinical Orthopedics*, 91, 174.
- SCHAJOWICZ, F. (1959): Ewing's Sarcoma and Reticulum cell Sarcoma of Bone. With special reference to the Histochemical Demonstration of Glycogen as an aid to Differential Diagnosis. *J. Bone and Joint Surg.*, A 41, 349.
- SCHAJOWICZ, F.; ACKERMAN, L. V., y SISSONS, H. A. (1972): Histological Typing of Bone Tumors. International Histological Classification of Tumours. WHO. Genf.
- SUTON, W. W. y cols. (1971): Evaluation of chemotherapy in children with metastatic Ewing's Sarcoma and osteogenic sarcoma. *Cancer chemotherapy reports*, part 1, vol. 55, 67.
- TAKAYAMA, S. y SUGAWA, I. (1970): Electron microscopic observations of Ewing's sarcoma. A case report. *Acta Path. Jap.*, 20, 87.