



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA DE RABDOMIOSARCOMAS DE CABEZA Y CUELLO EN PACIENTES PEDIÁTRICOS

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS BÁSICAS**

PRESENTA

MARIANA PAULINA RODRÍGUEZ VARGAS.

TUTOR: DR. FRANCISCO GERMÁN VILLANUEVA SÁNCHEZ. ENES LEÓN

 VoBo

León, Gto. México, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD LEÓN

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA DE
RABDOMIOSARCOMAS DE CABEZA Y CUELLO EN PACIENTES
PEDIÁTRICOS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS BÁSICAS**

PRESENTA

MARIANA PAULINA RODRÍGUEZ VARGAS.



**ENES UNAM
UNIDAD LEÓN**

TUTOR: DR. FRANCISCO GERMÁN VILLANUEVA SÁNCHEZ.

 VoBo

León, Gto. México, 2022

Agradecimientos

Agradezco a Dios por su provisión, por todos sus favores y bendiciones que me ha concedido para llegar hasta aquí; y permitirme concluir con este proyecto.

A mis hermanas por su compañía y amor. A mis papás, porque siempre he contado con su apoyo incondicional.

Gracias a mis excelentes maestros. A mi tutor, el Dr. Germán Villanueva por sus valiosas enseñanzas, su dirección en este trabajo y su calidad humana. Agradezco también a Ulises Vázquez por toda su ayuda e instrucción en el laboratorio, y por su gran compañerismo.

ÍNDICE

Resumen.....	5
Summary.....	6
Introducción.....	8
Marco teórico.....	8
I. Clasificación.....	8
II. Características clínicas e imagenológicas.....	9
III. Asociaciones clínicas.....	10
IV. Aspectos histopatológicos.....	13
V. Diagnóstico inmunohistoquímico.....	14
VI. Análisis molecular.....	19
Planteamiento del problema.....	22
Justificación.....	22
Objetivos.....	23
Variables.....	23
Material y métodos.....	24
I. Recolección de las muestras.....	25
II. Obtención de datos de las muestras.....	26

III.	Valoración de las muestras mediante microscopía óptica.....	26
IV.	Técnica tricrómico de Masson.....	27
V.	Obtención de fotomicrografías de los cortes histológicos.....	28
VI.	Técnica de inmunohistoquímica.....	30
VII.	Descripción de la identificación de inmunomarcaje, conteo celular y obtención del índice de inmunomarcaje.....	31
VIII.	Análisis estadístico.....	35
	Resultados.....	35
I.	Características del grupo.....	36
II.	Descripción histomorfológica de las muestras mediante tinción de hematoxilina y eosina	37
III.	Descripción del análisis del marcaje inmunohistoquímico.....	37
IV.	Análisis de los resultados.....	40
	Discusión.....	44
	Conclusión.....	49
	Referencias.....	51

Resumen

Los rhabdomiomas son neoplasias malignas que se derivan de células mesenquimales primitivas dirigidas hacia miogénesis. Es el sarcoma de tejidos blandos más común durante la infancia. Un 40% se localizan en región de cabeza y cuello. Los patrones histológicos suelen ser variados. En la confirmación diagnóstica se evalúa la expresión de marcadores como MyoD1 y miogenina.

Objetivo: Identificar características histomorfológicas e inmunohistoquímicas en muestras de rhabdomiomas de población pediátrica.

Metodología: Muestra de diez tejidos. Análisis microscópico para identificar características histomorfológicas para diagnóstico y clasificación. Inmunohistoquímica con los anticuerpos MyoD1 y miogenina. Cálculo del porcentaje de inmunoreactividad para cada caso.

Resultados: Se identificaron 6 rhabdomiomas embrionarios y 4 alveolares. Se observaron 7 casos positivos para MyoD1, y 4 positivos para Myog. En el análisis estadístico la prueba Chi-cuadrada mostró que la positividad para MyoD1 y Myog es independiente del tipo histológico. La prueba U de Mann-Whitney mostró que no hay asociación entre el tipo histológico y el grado de positividad para MyoD1 o Myog. El análisis de varianza mostró que no es posible asegurar que exista diferencia en el grado de inmunopositividad para MyoD1 y Myog dependiendo del tipo de rhabdomioma.

Conclusiones: Una consideración esencial es la evaluación de características histomorfológicas. Además del empleo de anticuerpos específicos. En los casos incluidos se identificaron las características histológicas, mas no fue posible establecer una relación entre el

tipo de rhabdomiosarcoma y la expresión de los marcadores empleados. Resulta necesario continuar investigando estas neoplasias, aunque de incidencia baja, representan un reto diagnóstico y terapéutico.

Summary

Rhabdomyosarcomas are malignant neoplasms derived from primitive mesenchymal cells directed towards myogenesis. It is the most common soft tissue sarcoma during childhood. About 40% are located in the head and neck region. Histologic patterns are usually varied. In the diagnostic confirmation, the expression of markers such as MyoD1 and myogenin is evaluated.

Objective: To identify histomorphologic and immunohistochemical features in rhabdomyosarcoma samples from pediatric population.

Methodology: Sample of ten tissues. Microscopic analysis to identify histomorphologic features for diagnosis and classification. Immunohistochemistry with MyoD1 and myogenin antibodies. Calculation of the percentage of immunoreactivity for each case.

Results: 6 embryonal and 4 alveolar rhabdomyosarcomas were identified. 7 cases were positive for MyoD1 and 4 positive for Myog. In the statistical analysis the Chi-square test showed that positivity for MyoD1 and Myog is independent of histological type. The Mann-Whitney U test showed that there is no association between histologic type and the degree of positivity for MyoD1 or Myog. Analysis of variance showed that it is not possible to ensure that there is a difference in the degree of immunopositivity for MyoD1 and Myog depending on the type of rhabdomyosarcoma.

Conclusions: The evaluation of histomorphologic features is an essential consideration. In addition to the use of specific antibodies. Histological characteristics were identified in the included cases, but it was not possible to establish a relationship between the type of rhabdomyosarcoma and the expression of the marked used. It is necessary to continue researching these neoplasms, although of low incidence, they represent a diagnostic and therapeutic challenge.

Introducción

El rabdomiosarcoma (RMS) es el sarcoma de tejidos blandos más común durante la infancia. En la población pediátrica se reportan en promedio 4.5 casos por cada millón de niños, anualmente. Se presenta de manera ligeramente más común en varones, con una relación niño/niña de 1.4:1. Aproximadamente 50% de casos son diagnosticados en la primera década de la vida. (1) De acuerdo a la guía de práctica clínica de la Secretaría de Salud “Diagnóstico y Tratamiento de Sarcomas de Partes Blandas (Rabdomiosarcoma) en el Paciente Pediátrico”, se ha encontrado que los sarcomas de tejidos blandos representan el 5.5% de las neoplasias en población pediátrica mexicana.

Los RMS se derivan de células mesenquimales primitivas dirigidas hacia miogénesis, y pueden aparecer en una variedad de sitios anatómicos del cuerpo. (2) Aproximadamente 40% de los rabdomiosarcomas tienen una localización en la región de la cabeza y el cuello, 20% en región genitourinaria, 20% en extremidades y el 20% restante en otros sitios. (3)

MARCO TEÓRICO

I. Clasificación

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), los rabdomiosarcomas pueden clasificarse histológicamente de la siguiente manera:

Rabdomiosarcoma embrionario, con sus variantes botrioide y anaplásico; rabdomiosarcoma alveolar con el subtipo sólido; rabdomiosarcoma pleomórfico y rabdomiosarcoma de células fusiformes/esclerosante. (4)(5)

Por definición, según la OMS, el rabdomiosarcoma embrionario es aquel tumor maligno de tejido blando que semeja las características morfológicas e inmunofenotípicas de músculo esquelético

embrionario. Por otra parte, define al rabdomiosarcoma alveolar como una neoplasia maligna compuesta de una población monomórfica de células redondas primitivas que muestran diferenciación a músculo esquelético. (5) Dentro de la cuarta edición de la clasificación de tumores de tejidos blandos y óseos de la OMS, publicada en febrero de 2013, se incluyeron cambios en la clasificación del grupo de los tumores de músculo esquelético; enlistando al rabdomiosarcoma esclerosante/de células fusiformes como una categoría separada. Previamente, en la edición del año 2002, esta se consideraba una variante del rabdomiosarcoma embrionario. (6) Para mayo de 2020 se publicó la quinta, y más reciente edición de la clasificación de tumores de tejidos blandos y óseos, de la Organización Mundial de la Salud, cuyas modificaciones se mencionan a continuación: al tipo histológico de rabdomiosarcoma de células fusiformes/esclerosante, se lo describe con tres subgrupos debido a características clinicopatológicas y moleculares; enlistados en seguida: aquellos con mutaciones en MYOD1; tumores con fusiones de genes en VGLL2, NCOA2 o CITED2, que usualmente se manifiestan en pacientes pediátricos; y en tercer lugar, los tumores que no presentan alguna de estas alteraciones. (7)

II. Características clínicas e imagenológicas

El cuadro clínico depende del sitio inicial de presentación. En concordancia con la diversidad de orígenes anatómicos, puede existir una variedad de síntomas clínicos; generalmente relacionados con la presencia de una masa que puede acompañarse o tener como resultado datos de obstrucción, compresión y dolor. Luego entonces, las tumoraciones de las regiones de la cabeza y el cuello pueden provocar proptosis, diplopía, sinusitis, cefalea, entre otras. En el área genitourinaria suele presentarse retención urinaria, hematuria y constipación. En las

extremidades, con aumento de volumen de la región afectada, en ocasiones cambios en la piel y dolor. Los RMS tienen características macroscópicas distintas; generalmente se presentan como masas infiltrativas poco circunscritas, blancas, blandas o firmes. Los tumores en su mayoría miden más de 5 cm al momento del diagnóstico. Aproximadamente del 15 al 25% de los casos al diagnóstico presentan enfermedad metastásica. Los sitios más frecuentes de metástasis son pulmones, médula ósea, ganglios y hueso. (8)

Los estudios de imagen permiten identificar la localización y tamaño del tumor; extensión, límites anatómicos y estructuras afectadas. Pueden emplearse radiografías simples del tumor primario y tórax, donde existe generalmente una zona radiolúcida en la extensión en tejidos blandos y observarse erosión ósea de estar presente. La segunda mencionada con el fin de detectar enfermedad a distancia. Tomografía computarizada del tumor primario, provee datos del tamaño y la extensión. Las masas suelen presentarse como imágenes hipodensas o isodensas, cuyos bordes generalmente no son definidos. En imágenes por resonancia magnética son en su mayoría isointensas en T1W; en T2W hiperintensidad con homogeneidad muy variable. (9)

III. Asociaciones clínicas

En su mayoría los RMS se consideran de aparición esporádica o *de novo*, sin embargo existen condiciones genéticas bien identificadas que han sido asociadas con RMS, dentro de ellas se encuentran los síndromes de Li-Fraumeni, Beckwith-Wiedeman, Noonan, Costello y la neurofibromatosis tipo I. (10)

Actualmente, se considera que los pacientes con RMS logran tener una supervivencia a cinco años de más de 70% después del diagnóstico, lo cual en parte se ha logrado al pasar de las

décadas con la creación de grupos de estudio, como lo es el *Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS)*; que han aportado la identificación de factores pronóstico y esquemas terapéuticos de acuerdo al grupo clínico, ya que se identificó la presencia de heterogeneidad en la biología y la clínica de los tumores; existiendo variaciones en el sitio primario, en la histología y la extensión de la enfermedad al momento del diagnóstico. (11)(12)

Los rhabdomiosarcomas son estadificados de manera pre-operatoria y se los agrupa en el pos-operatorio, según el IRS y reportado por la Asociación Americana de Cirugía Pediátrica (APSA), las etapas o estadios se enuncian en seguida: (13)

Tabla 1. Clasificación de los rhabdomiosarcomas por etapa preoperatorio.

ETAPA (PREOPERATORIO)	
I Órbita Cabeza y cuello (no parameningeo) Genitourinario (no vejiga/próstata) Tracto biliar	Cualquier tamaño, nódulos
II Vejiga/Próstata Extremidades Tronco parameningeo, retroperitoneo	<5cm, nódulos negativos
III Mismas que en el II	>5cm y/o nódulos positivos
IV Todas las localizaciones	Metástasis

Tabla 2. Clasificación de los rhabdomiosarcomas por grupo intraoperatorio.

GRUPO (INTRAOPERATORIO)	
I Enfermedad localizada, completamente resecada a Limitado al músculo de origen b Involucramiento contiguo	III Enfermedad macroscópica residual a Únicamente biopsia b Resección densa/macroscópica (>50%)

<p>II Resección densa total</p> <p>a Enfermedad microscópica residual, nódulos(-)</p> <p>b Sin enfermedad microscópica residual, nódulos(+)</p> <p>c Enfermedad microscópica residual, nódulos(+)</p>	<p>IV Metástasis</p>
---	-----------------------------

Dentro de la estadificación es importante el uso del sistema TNM (Tumor, Nódulos, Metástasis), que complementa al agrupamiento clínico, puesto que son utilizados con el fin de evaluar el pronóstico y selección terapéutica. (14)

Tabla 3. Clasificación TNM (Tumor, Nódulos, Metástasis)

<p>TUMOR</p> <p>1 Confinado al sitio anatómico de origen</p> <p>a <5cm de diámetro</p> <p>b ≥5cm de diámetro</p> <p>2 Extensión y/o fijado a tejido circundante</p> <p>a <5cm de diámetro</p> <p>b ≥5cm de diámetro</p>
<p>NÓDULOS REGIONALES</p> <p>N0 Nódulos regionales clínicamente no involucrados</p> <p>N1 Nódulos regionales clínicamente involucrados</p> <p>Nx Estatus clínico desconocido de los nódulos regionales (especialmente sitios que imposibilitan la evaluación de los nódulos linfáticos).</p>
<p>METASTASIS</p> <p>M0 Sin metástasis</p> <p>M1 Metástasis presente</p>

La estadificación pronóstico de RMS clasifica a los pacientes basado en los sistemas mencionados con anterioridad, en bajo, intermedio o alto riesgo. La estadificación de riesgo se

basa en el grupo clínico, sitio, tamaño, histología, metástasis y estatus de los nódulos linfáticos.

(14) Con base en los hallazgos de *Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS) I-IV*, los grupos de riesgo han sido establecidos para tratamiento en el IRS-V. El estudio IRS-V combina grupo, estadio y subtipo histológico para colocar a los pacientes en tres diferentes protocolos terapéuticos internacionales de acuerdo al riesgo de recurrencia. (15)

Tabla 4. Clasificación de los rbdomiosarcomas por grupo de riesgo

GRUPO DE RIESGO	
Riesgo bajo	Etapa 1: grupos clínicos I y II y N0. Sitios favorables Etapa 2: grupo clínico III, N0 y Nx. Sólo órbita Etapa 2: grupo clínico I, N0 y Nx. Todos los otros sitios (desfavorables), tumor ≤5cm en su diámetro más amplio.
Riesgo intermedio	Etapa 1: grupo clínico II y N1. Todos los sitios favorables Etapa 1: grupo clínico III, N0, Nx y N1. Todos los sitios favorables excepto órbita Etapa 2: grupos clínicos II y III, N0, Nx o N1. Todos los otros sitios Estadio 3: grupos clínicos II y III, N0, Nx o N1. Todos los otros sitios
Riesgo alto	Etapa 4: grupo clínico IV, N0, Nx o N1. Cualquier sitio con metástasis, incluyendo células tumorales en líquidos cefalorraquídeo; pleural o peritoneal

IV. Aspectos histopatológicos

Los patrones histológicos y las características celulares en los rbdomiosarcomas pueden variar desde una neoplasia de células pequeñas, redondas y azules, por su aspecto primitivo o embrionario, con núcleos azules con escaso citoplasma con la tinción hematoxilina-eosina; que les hace carecer de marcadores morfológicos para su identificación específica, lo que conduce a recurrir a métodos como el inmunofenotipo y el análisis genético para su determinación, hasta

lesiones con características celulares avanzadas que evocan al rabdomioma. (16) La histología en el RMS, muestra elementos celulares que se relacionan a las estructuras que semejan células del desarrollo del músculo estriado. Los rabdomioblastos con diverso nivel de atipia son las células clave para el diagnóstico. (4) Los dos principales tipos histológicos de RMS son el alveolar y el embrionario, que difieren en prevalencia, localización, características clínicas y desenlace. El RMS embrionario representa aproximadamente el 70% de todos los rabdomiosarcomas en niños, usualmente entre los 0 y 4 años de edad. Se presenta con frecuencia en tracto genitourinario y regiones de cabeza y cuello. (10) Contiene grados variables de rabdomiogénesis, de células redondas, pequeñas indiferenciadas, hasta células estriadas o rabdomioblastos totalmente diferenciados. El rabdomiosarcoma alveolar suma cerca del 30% de los RMS en la infancia. Comúnmente involucrado en adolescentes, con frecuente aparición en tejidos profundos de las extremidades. Histológicamente con un patrón alveolar que está dividido por septos fibrosos delgados. (17)

V. Diagnóstico Inmunohistoquímico

La identificación histológica de los rabdomiosarcomas en ocasiones es compleja, dado que suelen encontrarse similitudes entre esta entidad y otros tumores de células redondas y azules presentes en la infancia, como linfoma, osteosarcoma de células pequeñas, condrosarcoma mesenquimal y sarcoma de Ewing. Con el fin de confirmar el resultado, la inmunohistoquímica resulta sumamente útil para establecer el diagnóstico certero. Los rabdomiosarcomas son usualmente positivos para miogenina, desmina, actina sarcomérica y mioglobina. (14)

La clasificación de los tumores únicamente basada en el reporte histológico en su mayoría es ambigua, por lo que se recurre a la inmunohistoquímica; ampliamente aceptada como una

herramienta estándar para el diagnóstico de tumores. En el caso de los RMS, varios marcadores inmunohistoquímicos permiten la discriminación de los otros tumores de células pequeñas, redondas y azules; incluyendo la desmina, miogenina y MyoD1. Sin embargo, con el fin de obtener una clasificación de los subgrupos de rhabdomioma no siempre son tan definidos los marcadores proteicos inmunohistoquímicos. Se ha propuesto como marcador de subgrupos a la miogenina que ha mostrado asociación con RMS alveolar por su marcada positividad. Además, debido a la expresión baja o incluso ausente de miogenina en el RMS embrionario, se hace uso de la desmina en el diagnóstico de rutina de rhabdomioma. La mayoría de los RMS alveolares manifiestan una translocación típica entre PAX3 o PAX7/FOXO1; misma que juega un papel importante en el comportamiento tumoral y estadificación del riesgo. Dentro del diagnóstico inmunohistoquímico se ha encontrado que una combinación entre una fuerte expresión de miogenina y AP2 β estaría relacionado con RMS positivo para translocación; mientras que una fuerte expresión inmunohistoquímica de HMGA2 y fibrilina-2 se encuentra con más frecuencia asociado a RMS negativo para translocación. (18)

Reguladores miogénicos

En la confirmación del diagnóstico de los RMS se emplean inmunomarcadores, donde se considera la expresión de marcadores de músculo esquelético, tales como los factores de transcripción MyoD y miogenina, así como proteínas estructurales, dentro de las que se encuentran la desmina, la actina y miosina. (19)

Dentro de la heterogeneidad en las células que conforman los RMS se encuentran distintos grados de diferenciación celular. De manera que es sobresaliente reconocer los mecanismos

involucrados en la falta de capacidad de diferenciación terminal de las células que forman parte de estos sarcomas.

Uno de los factores involucrados en la diferenciación de músculo esquelético es el gen de determinación miogénica número 1 (Myod1), este codifica un factor de transcripción del tipo hélice-bucle-hélice (bHLH), mismo que forma parte de una familia de factores de regulación miogénica (MRFs), que en conjunto controlan la determinación y diferenciación del músculo esquelético. Los miembros que conforman dicha familia incluyen el factor miogénico 5 (Myf5), factor regulador miogénico 4 (Mrf4 o Myf6), Miogenina (Myog) y Myod. (20)

Los factores de diferenciación miogénica que juegan un papel crucial durante el desarrollo son MYF5, MYOD y MRF4; que dirigen a las células hacia el linaje de músculo esquelético. Corriente abajo, genéticamente, se encuentra MYOG, que junto con MYOD y MRF4 activan la diferenciación miogénica. (21)

La estructura proteica de los factores de regulación miogénica se encuentra muy relacionada. Los factores de transcripción básicos hélice-bucle-hélice contienen tres dominios conservados: el dominio de transactivación amino terminal, la región central con el motivo bHLH, que incluye el dominio básico α -helicoidal y Hélice I y II; y otro dominio de transactivación carboxilo terminal que contiene Hélice III. (22) La unión eficiente al DNA requiere dimerización con otras proteínas bHLH. MYOD forma heterodímeros con productos de una familia de genes bHLH, proteínas E: E2A, E2-2, o HEB. Los heterodímeros MYOD-E se unen ávidamente a los sitios blancos de la caja E (CAGGTG), que son elementos funcionalmente importantes en las secuencias reguladoras corriente arriba de muchos genes de diferenciación terminal específicos de músculo. (23) (24)

Es preciso que la expresión de los factores de regulación miogénica se encuentre bajo un estricto control espaciotemporal durante el desarrollo. Una gran cantidad de la expresión de MyoD está controlada por dos potenciadores, que se conocen como potenciador del núcleo (región de 258 pares de bases; situada a 30kb corriente arriba del sitio de inicio de transcripción) y una región distal reguladora (región de 714 pares de bases, localizada a 5kb corriente arriba), junto con una región proximal inmediatamente corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. (25)

Estudios sugieren que es probable que la desregulación en la actividad de MyoD explique el bloqueo en la diferenciación de rhabdomyosarcomas; y no su nivel de expresión. Hallazgos revelaron que MyoD era capaz de unirse como heterodímero a su sitio de unión de DNA, pero en las células de RMS mostró un potencial de transactivación deficiente. (19) Se encontró que la inhibición de la actividad de MyoD se producía a partir de la unión con proteínas represoras de bHLH. La musculina (MyoR), una forma empalmada de E2A, reprime la expresión génica inducida por MyoD al competir por unirse a las proteínas de la caja E. (26)

MyoD se ha implicado en la regulación transcripcional de varios genes; la mayoría de los cuales están involucrados en que el programa de diferenciación se lleve a cabo con eficiencia. Estos genes generalmente no tienen injerencia directa en el desarrollo de RMS. No así, al parecer en lo concerniente al gen microRNA no codificante, miR-206, que se ha asociado en gran manera con RMS. (27) La expresión en músculo esquelético de miR-206 (MyomiR, por su habilidad de controlar el destino de las células miogénicas) está dada en gran parte por la regulación transcripcional directa de MyoD. Se ha reportado su funcionamiento al inhibir la proliferación y los factores de señalización que actúan como reguladores negativos de la diferenciación de

músculo estriado. Los rhabdomiomas se han asociado con el silenciamiento de la expresión de miR-1/miR-206. (19) (28) Se ha sugerido que el nivel de expresión de miR-206 está relacionado de manera directa con el comportamiento clínico de los rhabdomiomas. (29) Como se mencionó, MyoD se une como heterodímero a su sitio de unión de DNA, sin embargo se ha reportado un potencial de transactivación deficiente en células de rhabdomioma. Se encontró que la inhibición de la actividad de MyoD es producida por la unión con proteínas represoras de bHLH. Musculina (MyoR, forma empalmada de E2A) reprime la expresión inducida por MyoD al competir por unirse a las proteínas de la caja E. (26)

La expresión de la proteína MyoD es útil como marcador inmunológico fiable para el diagnóstico clínico de rhabdomioma, pero su expresión no refleja su función, ya que estos sarcomas por lo general tienen MyoD con su actividad de transactivación alterada directa o indirectamente.

Por su parte la miogenina, gen específico músculo esquelético, como se ha venido mencionando, codifica un factor de transcripción de la familia de proteínas bHLH. Y que se expresa en puntos críticos del desarrollo donde funge de manera esencial en la formación de miofibras.

La miogenina suele estar muy controlada durante la miogénesis; presentándose muy escasamente en mioblastos en proliferación; y de manera aumentada en la salida del ciclo celular, con máxima expresión en el programa de diferenciación miogénica. En algunas células de rhabdomiomas, la expresión de Myog puede ser constitutiva, aunque no manifiesta la capacidad de promover la diferenciación miogénica de las células en dichos sarcomas. (30)

Myog se transcribe del gen de unos 2.5 kb de longitud, cuyo locus es 1q32.1. Da lugar a tres exones, que resulta en un mRNA de 1.5kb. (31) La secuencia primaria de DNA del sitio proximal (-130 a +18bp) de la región del promotor posee varios elementos conservados de unión a DNA. Se incluyen la caja TATA (TFIID o TAF3/TRF3), Sitio Mef2 (Myocyte enhancer factor 2 o factor potenciador de miocito 2) (Mef2A, Mef2C o Mef2D), sitio Mef3 (Six1 o Six4), Pbx (Pbx1 o MSY3) y una caja-E (proteína MyoD/E, proteína-Myf5, o proteína Myog/E). Pueden existir tres potenciadores adicionales a -4.5 kb, 5.5 kb, y -6.5 kb corriente arriba del sitio de inicio de transcripción (TSS). La caja TATA es necesaria para la unión de TFIID, que dirige el ensamblaje de la maquinaria de transcripción general en la región promotora. (32)

La caja E (E1) presente entre la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción, es el sitio de unión para los complejos proteínicos bHLH, incluyendo las proteínas heterodímeras MyoD/E y Myog/E. MYOD1 es el único factor de regulación miogénica cuya expresión decrece con la pérdida de MYOG. Este último es requerido para mantener la expresión de MYOD1 y cooperar con MYOD1 para activar los genes musculares. (33)

Dado que la miogenina es esencial para la diferenciación a células musculares, cualquier circunstancia que afecte o impida la transcripción de esta, resultará en células con diferenciación alterada.

VI. Análisis molecular

Es sabido que las mutaciones genéticas conducen a diferentes efectos biológicos a través de la modificación de rutas que involucran diferenciación miogénica, crecimiento y apoptosis. El rhabdomyosarcoma ha sido asociado con aberraciones genéticas específicas, que tienen como

resultado la formación de nuevas fusiones de genes, amplificaciones y mutaciones de genes. (34)

Ha sido notorio que los pacientes diagnosticados con rhabdomyosarcoma alveolar presentan un pronóstico desfavorable. La mayoría de estos alberga una recurrente translocación cromosómica, $t(2; 13)(q35; q14)$ o $t(1; 13)(p36; q14)$. Las translocaciones 2; 13 y 1; 14 codifican para un factor de transcripción quimérica, la cual consiste en una unión del dominio N-terminal de PAX3 o PAX7, fusionado al dominio C-terminal de FOXO1; considerándose crucial como factor pronóstico en la enfermedad. (35) Los pacientes con diagnóstico de rhabdomyosarcoma embrionario generalmente manifiestan un mejor pronóstico al estar localizado. De este último tipo se han reportado un rango amplio de aberraciones genéticas, dentro de las que se incluyen la pérdida de heterocigocidad, mutaciones en TP53, y en receptores tirosina-quinasa NRAS, KRAS, HRAS, PIK3CA, CTNNB1 y FGFR4. (36)

A pesar de las terapias agresivas, el pronóstico de los pacientes con rhabdomyosarcoma de alto riesgo continúa siendo desfavorable, lo que sugiere la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas con objetivo en las vías moleculares que resultan relevantes en la patogénesis del rhabdomyosarcoma.

Seki y cols. (37) mencionan la sugerencia del involucramiento de otros mecanismos como alteraciones epigenéticas, que de acuerdo al Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano, hace referencia a los cambios en la función de los genes que son hereditarios y que no se pueden atribuir a alteraciones en la secuencia de ADN. Las marcas epigenéticas cambian la forma como se expresan los genes. De acuerdo a la secuencia realizada se identificaron ambas mutaciones: previamente reconocidas; incluyendo las mutaciones en las vías

FGFR4/RAS/AKT y una nueva mutación de genes tales como PTEN, GAB1 y ROBO. (37) PTEN es uno de los supresores tumorales más frecuentemente mutado en cánceres en humanos y es también esencial para el desarrollo embriológico. PTEN modula la progresión a la fase G1 en el ciclo celular por medio de la regulación negativa del eje FGFR4/PI3K/AKT. (38)

Se ha mostrado que regiones funcionales de varios genes están involucradas en el desarrollo de RMS. En su estudio Liu y cols. (39) usaron un arreglo de alta resolución de hibridación genómica comparativa con el fin de explorar las variaciones de números de copias y genes en RMS. Sus análisis revelaron que todos los rhabdomyosarcomas muestran ganancias o pérdidas específicas; mostrando que la amplificación o delección de genes se encuentran con frecuencia involucrados en la tumorigénesis y/o la progresión del tumor.

La amplificación de 2p24 que contiene el locus MYCN ha sido reportada en un 25 a 40% de los casos de rhabdomyosarcoma alveolar y se ha asociado con un desenlace desfavorable. Un amplicón en 8q24.12 que contiene MYC ha sido identificado en RMS alveolar. MYC es altamente expresado en RMS embrionario. Está involucrado en importantes procesos celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación celular y apoptosis. (40)

Los tumores del tipo RMS embrionario han sido caracterizados por perfiles de número de copias hiperploides con combinación de ganancia de cromosomas 2, 8 y 12. En contraste, el rhabdomyosarcoma alveolar muestra perfiles diploides con mayor énfasis en pérdidas cromosomales, especialmente de 15q. La pérdida de heterocigocidad en 11p ha sido observada característicamente en RMS embrionario. Nishimura y cols. realizaron análisis de arreglos de polimorfismo de nucleótido simple (SNP) que revelaron lesiones genéticas

incluyendo desequilibrio alélico en RMS e identificación de varios genes blanco candidatos para la terapéutica. (41)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mayoría de los rabdomiosarcomas han sido aceptados como sarcomas de alto grado. Los patrones histológicos y las características celulares en los rabdomiosarcomas pueden variar desde una neoplasia de células pequeñas, redondas y azules, por su aspecto primitivo, con núcleos azules y con escaso citoplasma, con la tinción hematoxilina-eosina; que les puede hacer carecer de marcadores morfológicos para su identificación específica, lo que conduce a recurrir a métodos como el inmunofenotipo. Debido a este reto diagnóstico, es necesario identificar las características histológicas y correlación inmunohistoquímica de rabdomiosarcomas en la región de cabeza y cuello, como marcadores del comportamiento biológico de dicha neoplasia en población pediátrica mexicana.

JUSTIFICACIÓN

El rabdomiosarcoma es el tumor maligno de tejidos blandos más frecuente en la edad pediátrica, siendo la región de cabeza y cuello sitio primario de aparición. La identificación histológica de los rabdomiosarcomas en ocasiones es compleja, dado que suelen encontrarse similitudes entre esta entidad y otros tumores de células redondas y azules, presentes en la infancia; asimismo el plan de tratamiento se fundamenta en el tipo histológico y comportamiento biológico, por lo que es de suma importancia contar con marcadores biológicos útiles para la toma de decisiones por parte de los oncólogos quirúrgicos y médicos. De igual forma, se pretende aportar información adicional a la que existe en la actualidad.

OBJETIVO GENERAL

Identificar las características histomorfológicas e inmunohistoquímicas en muestras de pacientes con rhabdomiomas de población pediátrica mexicana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar las características del grupo etario

Describir los patrones morfológicos e inmunohistoquímicos según el subtipo de rhabdomioma en este grupo de pacientes

Establecer probables asociaciones entre las variables en relación a edad, sitio de localización de la neoplasia, tipo histológico e inmunomarcación.

VARIABLES

Dependiente: rhabdomioma

Independientes: sexo, edad, localización tumoral, marcador de inmunohistoquímica

Tabla 4. Tabla de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Medición
Sexo	Condición orgánica, masculina o femenina, de los animales y las plantas. (RAE)	Sexo expresado por el paciente en la historia clínica o de manera directa como masculino o femenino	Cualitativa, dicotómica nominal	1 Femenino 2 Masculino
Edad	Lapso de tiempo que transcurre desde el nacimiento hasta el momento de referencia	Años expresados por el paciente de manera directa o en la historia clínica	Cuantitativa, discreta de razón	Años cumplidos
Localización	Zona anatómica de	Sitio anatómico de	Cualitativa,	Sitio

tumoral	origen del tumor primario	localización del tumor, referido en la historia clínica	politómica nominal	anatómico
Inmunohistoquímica (marcador)	Técnica de laboratorio que se fundamenta en la interacción de un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario, y su visualización mediante diaminobencidina en receptores de tumores anaplásicos o indiferenciados, y como auxiliar en comportamiento biológico de algunas lesiones.	Inmunomarcaje visualizado en microscopía óptica mediante la diaminobencidina en donde se contabiliza por campos las áreas de color café o marrón de inmunomarcaje positivas en las células de los tejidos estudiados.	Cualitativa Politómica ordinal	0 sin marcaje/negativo 1 Débil 2 Moderado 3 Fuerte
Tipo de rhabdomiosarcoma	Clasificación de sarcoma de tejidos blandos de células mesenquimales primitivas dirigidas a miogénesis de acuerdo a la OMS	Clasificación/subclasificación de rhabdomiosarcoma según la OMS	Cualitativa Politómica nominal	1 RMSE 2 RMSA 3 RMS S/S
Rhabdomiosarcoma	Sarcoma de tejido blando primitivo maligno que semeja las características del músculo esquelético	Neoplasia primitiva maligna de tejido blando que muestra diferenciación parcial de músculo esquelético a la visualización por microscopía óptica con tinción H&E	Cualitativa	Presencia de RMS

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Observacional, descriptivo, comparativo y ambispectivo

Universo de estudio: Casos de rabdomiosarcomas del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío

Muestra: Muestra no paramétrica por conveniencia (total de casos disponibles: diez tejidos con diagnóstico de rabdomiosarcoma).

Criterios de inclusión: muestras biológicas procesadas histológicamente, de pacientes mexicanos en edad pediátrica con diagnóstico re-confirmado de rabdomiosarcoma. Especímenes tomados con fines diagnósticos, material biológico suficiente incluido en parafina en buenas condiciones.

Criterios de exclusión: muestras biológicas insuficientes, poco material incluido en parafina o en malas condiciones generales.

Criterios de eliminación: muestras biológicas que presenten indiferenciación celular y/o que al momento de la evaluación histológica no corresponda al diagnóstico de rabdomiosarcoma.

Consideraciones éticas: en el presente estudio han de emplearse muestras biológicas procesadas en parafina, por lo que a este grado no resulta invasivo para los pacientes; asimismo se entiende que se ha otorgado su consentimiento y asentimiento para realizar investigación científica al momento de la firma en el reporte de patología para su estudio, por tanto, se siguen los lineamientos de ética e investigación en humanos en materia de salud.

METODOLOGÍA

I. Recolección de las muestras

Se estudiaron muestras provenientes de casos de rabdomiosarcomas de la región de cabeza y cuello de pacientes en edad pediátrica, del archivo de histopatología del Servicio de Anatomía

Patológica del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío. Casos registrados en el periodo comprendido entre los años 2014 y 2021. Dado que en este proyecto se consideró una muestra no paramétrica por conveniencia: el total de los casos disponibles entre las fechas mencionadas, y que cumplieron con los criterios de inclusión fue de diez tejidos con diagnóstico de rabdomiosarcoma.

Una vez obtenidos los bloques de parafina fueron llevados al laboratorio de investigación interdisciplinaria del servicio de diagnóstico histopatológico de la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León de la UNAM, para ser procesados y evaluados por dos especialistas en patología oral y maxilofacial para la estandarización por los observadores para el adecuado análisis de los casos y re confirmación del diagnóstico de rabdomiosarcoma.

II. Obtención de datos de las muestras

A partir de la información obtenida de los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío se obtuvieron datos tales como: edad, género y localización anatómica del tumor primario. Como se encuentran contenidos dentro de la tabla "Descripción histomorfológica de los casos" en el apartado de resultados.

III. Valoración de las muestras obtenidas mediante microscopía óptica

Para la evaluación y confirmación histopatológica de las muestras de los casos de rabdomiosarcomas se realizaron cortes histológicos de los bloques de parafina con técnica estandarizada a 3 micras para su procesamiento con tinción con hematoxilina y eosina, montaje y visualización mediante microscopía óptica. Con el apoyo de dos expertos en patología bucal y maxilofacial, se identificaron y describieron rubros relevantes en cuanto a las características histomorfológicas para el diagnóstico y clasificación del subtipo de tumor; tales como: la

morfología celular y nuclear; presencia y grado de pleomorfismo celular; presencia de mitosis; existencia de estroma mixoide; y la existencia permeación o infiltración hacia estructuras adyacentes. Para lo cual se revisaron todas las laminillas en su totalidad.

IV. Técnica tricrómica de Masson

Se realizó adicionalmente la tinción tricrómica de Masson con técnica estandarizada, (Fig. 1) que permite la identificación de tejido conjuntivo entre otras estructuras adyacentes que no sean fácilmente identificables con tinción convencional por su disposición espacial. En esta técnica de coloración especial se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo, el citoplasma y las fibras de colágeno. A continuación se describe el procedimiento:

-Se realizaron cortes histológicos de 3 micras, de tejido fijado en formaldehído y embebido en parafina.

-Se desparafinó y se hidrató hasta llegar al agua destilada. Las secciones al ser fijadas, se trataron con solución de Bouin por una noche a temperatura ambiente. Se lavaron con agua corriente hasta aclarar, y se enjuagaron con agua destilada. Se montaron en Coverplate.

-Se preparó solución de hematoxilina de Weigert en tubo de eppendorf (solución hematoxilina alcohólica y cloruro férrico 1:1) y se agregó a la laminilla 2 gotas (100µl) durante 10 minutos.

-Se lavó con agua corriente por 10 minutos, y se enjuagó con agua destilada. Se coloreó con fucsina ácida y escarlata de Biebrich 2 gotas (100µl) durante 15 minutos. En seguida diferenciar con solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico 2 gotas (100µl) por 10 minutos. Y contraste con 2 gotas de (100µl) solución de azul de anilina durante 15 minutos. Diferenciar con 2 gotas

(100µl) de ácido acético al 1% por 5 minutos. Por último deshidratación y aclaramiento a través de alcohol 96, alcohol absoluto, se dejaron secar y se cubrieron.

De esta manera es posible observar la diferencia entre colágeno/tejido conjuntivo y músculo. El colágeno y tejido conjuntivo se tiñe en azul, a verde. El músculo se tiñe en rojo, y los núcleos en negro. (42)

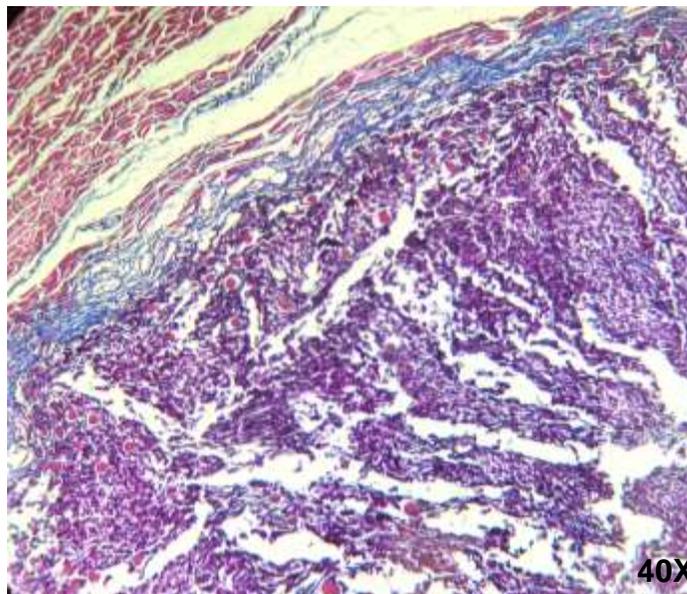


Fig. 1 Fotomicrografía con tinción tricrómica de Masson, con aumento de 40x. Fascículos musculares en color rojo. Células neoplásicas pleomórficas. Fibras colágena en azul.

V. Obtención de fotomicrografías de los cortes histológicos

Se realizó la toma y el respaldo de fotomicrografías de los casos de rhabdomyosarcomas obtenidos, donde pueden identificarse las estructuras histológicas características. Para tal fin se hizo uso de microscopio óptico (Leica DM750 con cámara CMEX DC. 5000) De las zonas más representativas se tomaron fotografías con el objetivo a 4X, 10X y 40X. (Fig. 2 a 5)

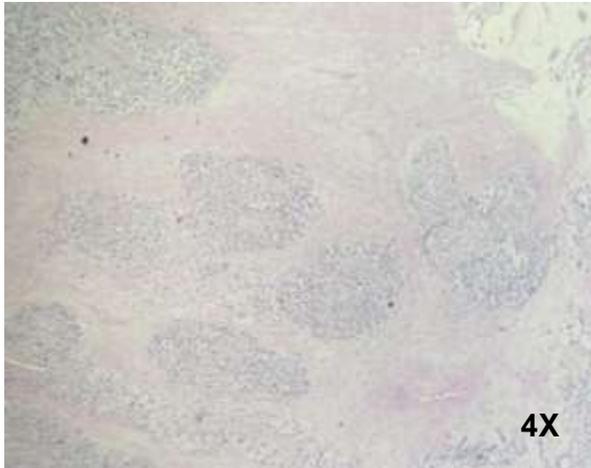


Fig.2 Fotomicrografía a 4X tinción H&E. Células neoplásicas redondas, azules. Septos fibrosos que separan las células en nichos.

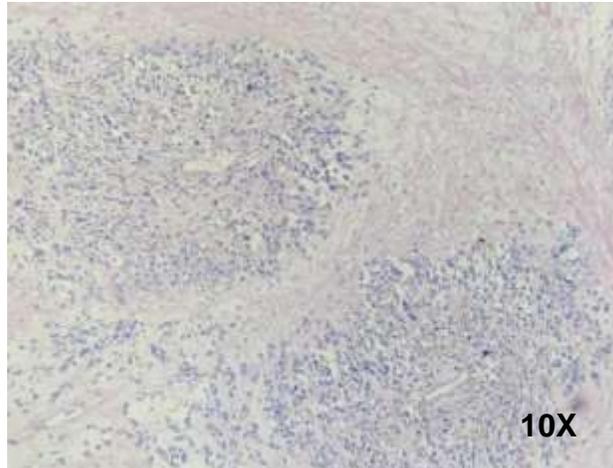


Fig. 3 Fotomicrografía a 10X tinción H&E. Células neoplásicas redondas. Núcleos hiper cromáticos. Septos fibrosos.

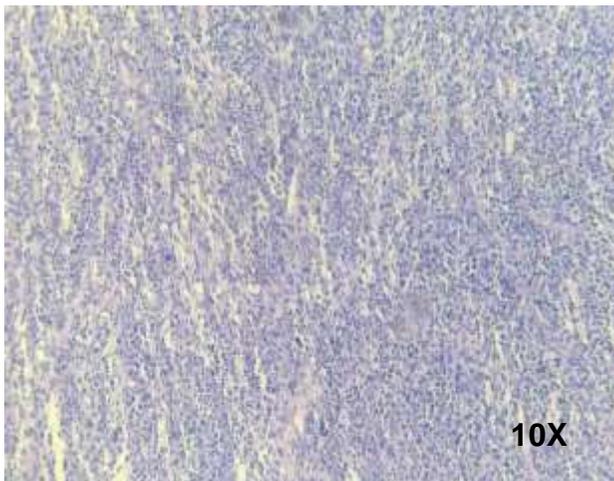


Fig. 4 Fotomicrografía a 10X teñida con H&E. Células neoplásicas redondas, azules.

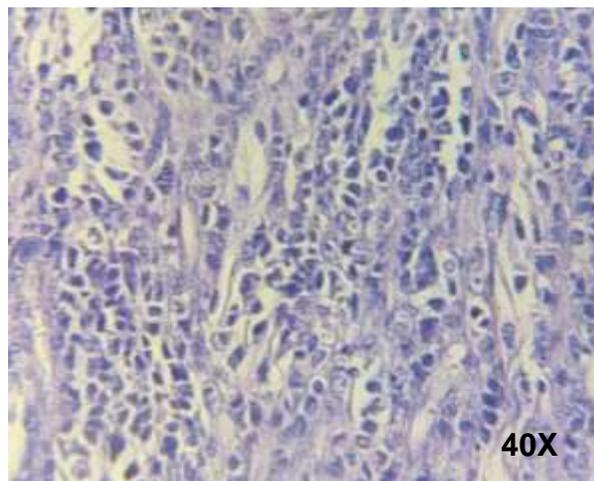


Fig. 5 Fotomicrografía a 40X teñida con H&E. Células redondas, ovals, de aspecto poligonal. Con pleomorfismo. Estroma de tejido conjuntivo.

VI. Técnica de inmunohistoquímica

Por su valor diagnóstico para rhabdomyosarcoma, en cuanto a sensibilidad y especificidad, se emplearon como marcadores inmunohistoquímicos, los anticuerpos contra las proteínas mioirreguladoras MyoD1 y miogenina. Para tal fin se llevó a cabo estandarización previa de técnica de inmunohistoquímica de acuerdo a la que se realizó en el laboratorio de patología de la ENES UNAM León, mediante la utilización de tejidos de enseñanza con anticuerpos S100 y vimentina. Se realizaron cortes de 3 micras para los tejidos diagnosticados de nuestra muestra y se montaron en laminillas electrocargadas.

Se llevó a cabo el proceso e inmunohistoquímica bajo la siguiente técnica:

-Desparafinación de las láminas e hidratación como sigue: dos cambios de xilol, 2 cambios de alcohol absoluto, 2 cambios de alcohol al 96% y por último enjuague en agua destilada (todo esto después de que estuvieran en el horno a una temperatura de 100 grados por media hora para desparafinar).

Después de la recuperación que se lleva a cabo en la olla de presión en un vaso copli con recuperador de un pH 9 y a llegar a una temperatura de 110°C por 15 minutos, se deja que disminuya la presión para sacarlas de la olla y dejarlas enfriar hasta que lleguen a una temperatura de 37°C para no correr el riesgo de que se desprendan los tejidos. Se procede a:

- bloqueo con peroxidasa con solución de peróxido de hidrógeno-metanol para que no existan residuos de sangre o hemoglobina por un tiempo de 5 a 10 minutos recomendado por el inserto de este reactivo. Enjuagar con agua destilada.

- bloqueo con background snaper para evitar fondo inespecífico por un tiempo de 10 minutos tiempo recomendado por el inserto del producto. Enjuagar con agua destilada.

- se procede a delimitar el tejido con un lápiz hidrofóbico sin dejar que la laminilla se seque

- se coloca anticuerpo ya diluido (MyoD1 y miogenina dilución 1:100) y estandarizado (200 microlitros) se deja incubar a una temperatura ambiente por espacio de 30 a 45 minutos tiempo recomendado por el inserto de este producto.

Enjuague con PBS (buffer de fosfatos para lavado, pH 7.4)

- Colocación de anticuerpo secundario, mejor conocido como polímero conformado por un sistema de biotina, avidina (en este sistema se presentan juntos, por lo que es de 1 solo paso) para ello permanecen las laminillas por un tiempo de 30 a 45 minutos tiempo recomendado en indicaciones de este producto.

Enjuagamos con solución salina de fosfato estabilizadora (PBS) y se dejan en PBS evitando que se seque la laminilla para evitar datos poco confiables.

- Se procede a revelar mediante un sistema de cromógeno o diaminobencidina, este se prepara 1 gota de este por un mililitro del diluyente de este producto y se deja incubando por espacio de 5 a 10 minutos.

Enjuague con PBS y se procede a realizar contraste con solución de hematoxilina de Mayer, se enjuaga en agua destilada, posteriormente se pasa por 2 cambios de alcohol al 96%, 2 cambios de alcohol absoluto y xilol, por último se monta la laminilla. Observación al microscopio óptico. Se utilizó un control positivo en cada corte de rabdomiosarcomas diagnosticado.

Myod1 casa comercial: cell marque, clona 5.2 y miogenina clona MyG007.

VII. Descripción de la identificación de inmunomarcaje, conteo celular y obtención del índice de inmunomarcaje

En el análisis del inmunomarcador MyoD1 se considera como positivo el marcate nuclear cuando se observó tinción de color marrón o pardo oscuro. De acuerdo a Kokko, L .et al. (43)

se clasificó la intensidad del inmunomarcaje, en las categorías: negativa, débilmente positiva y fuertemente positiva. Se tomaron microfotografías de áreas tisulares representativas. Para el conteo celular nos basamos en el método de conteo manual publicado por Bologna, R. et al. (44). Las células fueron cuantificadas utilizando fotomicrografías tomadas a 40x, para su visualización por campos. Las imágenes se abrieron utilizando el programa Microsoft Power Point, y empleando la función de insertar tabla, se elaboró una tabla de 6x6, la cual fue colocada de manera superpuesta en cada fotomicrografía, abarcando la totalidad de estas en su superficie. De esta manera se contabilizaron por cada uno de los pequeños 36 campos en cada imagen, las células con marcaje positivo, así como aquellas sin inmunoreactividad. (Fig. 6) Para tal actividad se tomó el mismo orden en cada fotografía, comenzando el conteo celular en el extremo superior izquierdo y finalizando en el extremo inferior derecho. De esta manera para calcular el porcentaje de positividad se multiplicó por cien el número de células teñidas, y el resultado se dividió entre el total de células. Se otorgaron categorías de acuerdo al porcentaje de inmunopositividad, se asignó el símbolo – para las muestras negativas, + para la categoría positiva leve (con una expresión celular menor al 10%), ++ positiva moderada (inmunomarcaje del 10 al 50%), y +++ positiva fuerte (con una inmunoexpresión mayor al 50%). Basándose en la categorización descrita por Zhao, Z. et al. (45). Y de acuerdo a la medición de la variable, con los valores 0, 1, 2 y 3 respectivamente.

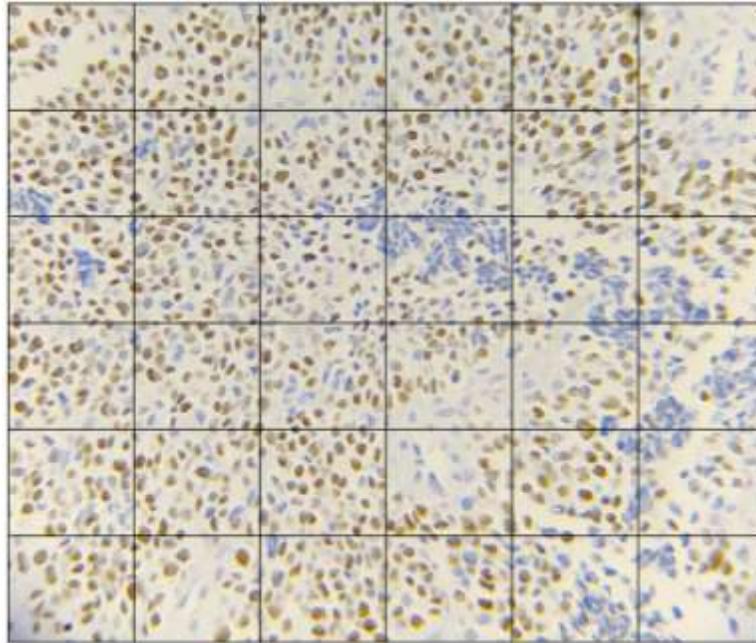


Fig. 6 Fotomicrografía a 40x con celdas para la cuantificación celular y determinación del porcentaje de inmunopositividad MyoD1.

De igual manera en cuanto al análisis del inmunomarcador para miogenina, se consideró como positivo el marcaje nuclear cuando se observó tinción de color marrón o pardo oscuro. Se clasificó la intensidad del inmunomarcaje, en las categorías: negativa, débilmente positiva y fuertemente positiva. Se tomaron microfotografías de campos celulares representativos. El conteo celular también se llevó a cabo con base en el método de conteo manual descrito por Bologna, R. et al. (44). Las células fueron cuantificadas utilizando fotomicrografías tomadas a 40x, para su visualización por campos. Las imágenes se abrieron utilizando el programa Microsoft Power Point, y empleando la función de insertar tabla, se elaboró una tabla de 6x6, la cual fue colocada de manera superpuesta en cada fotomicrografía, abarcando la totalidad de estas en su superficie. (Fig. 7) De esta manera se contabilizaron por cada uno de los pequeños 36 campos en cada imagen, las células con marcaje positivo, así como aquellas sin

inmunoreactividad. Para tal actividad se tomó el mismo orden en cada fotografía, comenzando el conteo celular en el extremo superior izquierdo y finalizando en el extremo inferior derecho. De esta manera para calcular el porcentaje de positividad se multiplicó por cien el número de células teñidas, y el resultado se dividió entre el total de células. Se otorgaron categorías de acuerdo al porcentaje de inmunopositividad, se asignó el símbolo – para las muestras negativas, + para la categoría positiva leve (con una expresión celular menor al 10%), ++ positiva moderada (inmunomarcaje del 10 al 50%), y +++ positiva fuerte (con una inmunoexpresión mayor al 50%). Basándose en la categorización descrita por Zhao, Z. et al. (45). Y de acuerdo a la medición de la variable, con los valores 0, 1, 2 y 3 respectivamente.

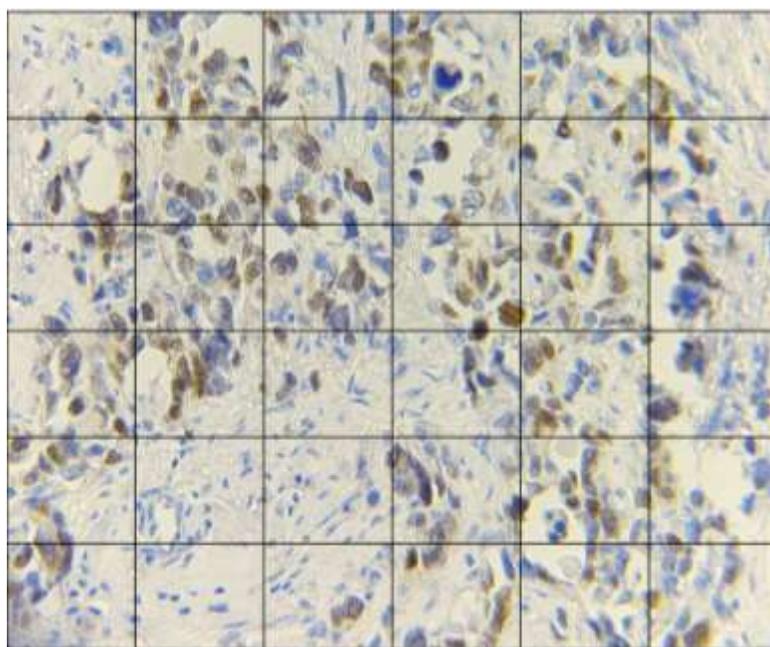


Fig. 7 Fotomicrografía a 40x con celdas para la cuantificación celular y determinación del porcentaje de inmunopositividad para miogenina.

IX. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se empleó la prueba Chi-cuadrada, con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$), mediante el uso del programa IBM®SPSS. Con el fin de buscar si en esta muestra existía asociación entre el tipo de rhabdomyosarcoma (embrionario o alveolar) y la positividad para MyoD1 y para Myog en las pruebas de inmunohistoquímica.

También así se llevó a cabo la prueba estadística U de Mann-Whitney para conocer si existía diferencia estadísticamente significativa que indicara la existencia de asociación entre el tipo histológico de RMS y el grado de positividad para MyoD1; así como para Myog.

RESULTADOS

I. Características del grupo

De los diez casos incluidos en este proyecto se cuentan siete pacientes del sexo masculino y tres del sexo femenino. Se observa un rango de edad variado, entre los uno y diecisiete años de edad. Dos pacientes con un año de edad, uno con dos años de edad; uno con tres, el siguiente en orden ascendente, con once años de edad; otro más con doce; tres con catorce; y finalmente un paciente con diecisiete años de edad. En cuanto a la localización del tumor primario se tiene registro de dos ocurrencias en el maxilar, dos casos con aparición en la cavidad nasal, un caso en órbita; uno en región parotídea, y cuatro casos con reporte en cabeza, sin especificar la localización anatómica (Tabla 5).

II. Descripción histomorfológica de las muestras mediante tinción de hematoxilina y eosina

Una vez contando con las muestras de los tejidos con diagnóstico re confirmado de rhabdomioma, cuyas características se consideraron adecuadas para su evaluación, se realizó la identificación y descripción de las características histológicas relevantes y propias del diagnóstico de rhabdomioma para la clasificación, es este caso en sus dos principales subtipos: rhabdomioma alveolar y rhabdomioma embrionario. De acuerdo a la observación histomorfológica de las diez muestras evaluadas, se identificaron seis rhabdomiomas del tipo embrionario y cuatro del tipo alveolar. Cada uno de los casos analizados se describe a continuación:

Tabla 5. Características de las muestras evaluadas

No. caso	Edad	Localización	Sexo	morfología celular	Núcleo	Pleomorfismo	Mitosis	Estroma mixoide	Permeación de estructuras adyacentes	Subtipo
09-1761	14 años	maxilar superior	F	oval, redonda, ahusada	hipercromático	severo	presentes	ausente	Permeación a tejido adiposo y discreta a	Embrionario
09-1586	3 años	cavidad nasal	M	oval, redonda, poligonal	hipercromático	moderado	ausentes	presente	Permeación vascular. infiltración	Alveolar
11-2031	1 año	región parotídea	M	oval, algunas poligonales	hipercromático	moderado	ausentes	ausente	Infiltración de tejido adiposo, permeación	Alveolar
13-047	11 años	NE	M	oval, pleomórfico	central, hipercromático	moderado	presentes	presente	Infiltración a tejido adiposo y tejido	Alveolar

19-2590	14 años	NE	M	Oval	Hipercromático, cromatina granular	moderado	presente	ausente	Infiltración a nervio, tejido adiposo y	Alveolar	Embrionario
19-1500	1 año	NE	F	Oval ahusada	Hipercromático, cromatina granular	moderado	presente	ausente	Infiltración a nervio, tejido adiposo y	Embrionario	Embrionario
27-0619	14 años	cavidad nasal	M	oval	hipercromáticos	moderado	presentes	ausente	Permeación vascular	Embrionario	Embrionario
18-2037	17 años	NE	M	oval, poligonales	hipercromático, cromatina granular	severo	presentes	ausente	Infiltración a nervio y tejido adiposo,	Alveolar	Embrionario
15-3291	12 años	Órbita	F	oval, ahusadas, poligonales	hipercromáticos, hacia la periferia	severo	presentes	presente	Permeación vascular, infiltración	Embrionario	Embrionario
14-816	2 años	Maxilar superior	M	oval, pleomórfico	hipercromático, algunas multinucleadas	severo	presentes	presente	Infiltración vascular, tejido	Embrionario	Embrionario

NE (No especificado) M (Masculino) F (Femenino)

III. Descripción del análisis del marcaje inmunohistoquímico

De la evaluación de los casos seleccionados tenemos estos resultados: 4 casos con inmunopositividad fuerte para MyoD1, 3 con positividad moderada, y 3 negativos para myoD1.

De aquellas muestras en las que se observó un inmunomarcaje negativo, 2 correspondieron al tipo histológico alveolar y uno al tipo embrionario. En los casos del marcaje fuertemente positivo, 3 casos correspondieron al tipo embrionario, y uno al alveolar. Para el marcaje moderadamente positivo, 2 fueron del tipo embrionario, y 1 con tipo alveolar.

En cuanto a la evaluación inmunohistoquímica para miogenina, se observaron los resultados siguientes: 3 casos mostraron inmunopositividad fuerte para miogenina, 1 con positividad moderada, y los 6 restantes resultaron negativos para tal marcaje. De aquellas muestras en las que se observó un inmunomarcaje negativo, 2 correspondieron al tipo histológico alveolar y 4 al tipo embrionario. En los casos del marcaje fuertemente positivo, 2 casos correspondieron al tipo embrionario, y 1 al alveolar. Para el marcaje moderadamente positivo, correspondió al tipo alveolar.

Por otra parte, con respecto a la intensidad observada en los casos con inmunopositividad para ambos marcadores, se evaluó de manera visual en las fotomicrografías, donde se reporta que para MyoD1, en cuanto a la intensidad del marcaje, se reportan cuatro casos fuertemente positivos, y tres débilmente positivos. Además de los cuatro casos negativos, previamente mencionados.

Para el caso de la miogenina, se encuentran cuatro casos con inmunoreactividad fuertemente positiva y seis casos negativos.

Tabla 6. Resumen de la inmunoreactividad para las muestras incluidas.

CASO NÚMERO	MyoD1	Myog	SUBTIPO
09-1761	++	---	Embrionario
09-1586	---	---	Alveolar
11-2031	---	---	Alveolar
13-047	+++	+++	Alveolar
14-816	+++	---	Embrionario

15-3291	++	--	Embrionario
18-2037	+++	++	Alveolar
17-0619	--	--	Embrionario
19-1500	+++	+++	Embrionario
19-2590	++	+++	Alveolar

– Negativo -, Positivo 1 Leve +, 2 Moderado ++, 3 Fuerte +++

Tabla 7. Resumen de resultados, con porcentaje de inmunoreactividad para las muestras incluidas

Caso	Tipo de RMS	Positividad para MyoD	Positividad para Myog	MyoD1 Categoría de inmunoreactividad	Myog Categoría de inmunoreactividad	MyoD %	Myog %	Sitio	Edad	Sexo
09-1761	E	Sí	No	2	0	42%	0%	Maxilar	14	F
09-1586	A	No	No	0	0	0%	0%	Cavidad nasal	3	M
11-2031	A	No	No	0	0	0%	0%	Región parotídea	1	M

19-2590	A	SÍ	SÍ	2	3	37%	62%	NE	14	M
19-1500	E	SÍ	SÍ	3	3	89%	67%	NE	1	F
17-0619	E	No	No	0	0	0%	0%	Cavidad nasal	14	M
18-2031	A	SÍ	SÍ	3	2	51%	30%	NE	17	M
15-3291	E	SÍ	No	2	0	33%	0%	Órbita	12	F
14-816	E	SÍ	No	3	0	80%	0%	Maxilar	2	M
13-047	E	SÍ	SÍ	3	3	75%	51%	NE	11	M

IV. Análisis de los resultados

Se llevó a cabo el análisis de los datos obtenidos mediante el empleo de la prueba estadística Chi-cuadrada, con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$), para esto se hizo uso del programa IBM®SPSS. Se muestran las tablas de contingencia creadas para cada marcador, en relación con los tipos de rabdomiosarcomas.

Tabla de contingencia RMS * MYOD

		MYOD		Total	
		"SI"	"NO"		
RMS	"Embrionario"	Recuento	5	1	6
		% dentro de MYOD	71.4%	33.3%	60.0%
	"Alveolar"	Recuento	2	2	4
		% dentro de MYOD	28.6%	66.7%	40.0%
Total	Recuento	7	3	10	
	% dentro de MYOD	100.0%	100.0%	100.0%	

Con esta prueba se pretendía buscar si en esta muestra existía asociación entre el tipo de rhabdomyosarcoma (embrionario o alveolar) y la positividad para MyoD1 en la prueba de inmunohistoquímica.

Se obtuvo un valor de significancia de 0.26, por lo que en este caso, no se puede asegurar con 95% de confianza que la positividad para el marcador MyoD1 está relacionado al tipo de RMS.

Se realizó la misma prueba para evaluar la asociación entre el inmunomarcaje positivo para Myog y el tipo de RMS (embrionario y alveolar). Se obtuvo un valor de significancia de 0.598, por lo que se concluye que la positividad para Myog en esta muestra, es independiente del tipo de RMS. No se encuentra relación entre estas variables (sig. 0.598>0.05).

Tabla de contingencia RMS * MYOG

		MYOG		Total	
		"SI"	"NO"		
RMS	"Embrionario"	Recuento	2	4	6
		% dentro de MYOG	50.0%	66.7%	60.0%
	"Alveolar"	Recuento	2	2	4
		% dentro de MYOG	50.0%	33.3%	40.0%
Total	Recuento	4	6	10	
	% dentro de MYOG	100.0%	100.0%	100.0%	

Por otra parte, con el fin de evaluar si existe asociación entre el tipo de rhabdomyosarcoma (embrionario y alveolar), y la variable ordinal correspondiente al grado de inmunoreactividad para MyoD1, a los que se les otorgó los valores de 0 para la muestra negativa para el marcador; 1 para la positividad débil; 2 para la positividad moderada; y 3 para la positividad fuerte. Se llevó a cabo la prueba estadística U de Mann-Whitney, obteniendo un valor de significancia de 0.309, que demuestra que no hay diferencia estadísticamente significativa que indique la existencia de asociación entre el tipo histológico de RMS y el grado de positividad para MyoD1.

Estadísticos de contraste

	MyoD1
U de Mann-Whitney	7.500
Sig. asintót. (bilateral)	0.309

a. Variable de agrupación: RMS

De la misma manera se llevó a cabo la prueba para conocer si existe asociación entre el tipo de rhabdomyosarcoma y el grado de positividad para el marcador Myog. Se obtuvo un p-value de 0.807, por lo que se concluye que el grado de positividad para Myog en esta muestra, es independiente del tipo de RMS. No se encuentra relación entre estas variables (sig. $0.807 > 0.05$).

Estadísticos de contraste

	Myog
U de Mann-Whitney	11.000
Sig. asintót. (bilateral)	0.807

a. Variable de agrupación: RMS

Se realizó un análisis de varianza para determinar si el tipo de RMS influye sobre el grado de positividad para ambos inmunomarcadores empleados.

Para el caso del grado de inmunopositividad para MyoD1 se obtuvo un grado de significancia de 0.162, lo que deja de manifiesto que no es posible asegurar con un 95% de confianza que exista diferencia en el grado de inmunopositividad dependiendo del tipo de rhabdomiosarcoma (embrionario y alveolar).

Estadísticos de grupo

	RMS	N	Media
Inmunoreactividad MyoD	Embrionario	6	53.17
	Alveolar	4	22.00

Para el caso del grado de inmunopositividad para Myog, se obtuvo un grado de significancia de 0.869, lo que demuestra que no es posible asegurar con un 95% de confianza que exista diferencia en el grado de inmunopositividad para este marcador, dependiendo del tipo de rhabdomioma (embrionario y alveolar).

Estadísticos de grupo

	RMS	N	Media
Inmunoreactividad Myog	Embrionario	6	19.67
	Alveolar	4	23.00

DISCUSIÓN

Anualmente se reporta una incidencia de entre 850 a 900 casos de rhabdomiomas en pacientes en edad pediátrica. (De acuerdo a la Guía de Práctica Clínica “Diagnóstico y tratamiento de Sarcomas de Partes Blandas (Rhabdomioma) en el paciente pediátrico. (8) De acuerdo a esta misma referencia, en México la frecuencia de cáncer no está bien establecida; no obstante, se conoce que los sarcomas de tejidos blandos representan el 5.5% de las neoplasias en la población pediátrica mexicana; y además, más de la mitad de este tipo de sarcomas en este grupo de pacientes.

En este mismo tenor, de manera reciente, se cuenta con el Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes (RCNA) con datos para el año 2019. (46) Para el caso del Estado de Guanajuato, tomando en cuenta el Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío, considerada como Unidad Médica Acreditada (UMA); y que fue el hospital de referencia, de donde procedieron las muestras de los casos incluidos para este estudio. Esta se localiza en el puesto número trece de cincuenta y dos UMAs incluidas en el reporte, en cuanto al número de notificaciones de casos de neoplasias malignas en pacientes pediátricos. Por distribución de neoplasias reportadas a tal Registro, los sarcomas de tejidos blandos ocuparon el sexto lugar. Dentro de este grupo se reportan 90 casos, de los cuales 44 fueron rhabdomiosarcomas, que representa el 49% de los sarcomas de tejidos blandos. Y de manera general, en cuanto al porcentaje de los tumores sólidos, de un total de 973 casos, 44 se trataron de rhabdomiosarcomas, lo que corresponde a un 4.5%. El rhabdomiosarcoma ocupó el primer lugar en los menores de un año, en los grupos de 1 a 4 y de 5 a 9 años (con respecto a los otros sarcomas de tejidos blandos), y particularmente también, en este reporte de 2019, el grupo de edad donde se registraron mayor número de casos de rhabdomiosarcomas, fue el grupo de entre 1 a 4 años de edad; seguido por el de 5 a 9. Existe un ligero predominio en todos los grupos etarios del sexo masculino, en cuanto a la distribución de los casos. En cuanto a los tumores sólidos, de los sarcomas de tejidos blandos, el 56.12% correspondieron al sexo masculino. Para la localización anatómica, los tejidos blandos de la cabeza, cara y cuello, en este reporte, ocupó el segundo lugar para la aparición de sarcomas de tejidos blandos. En cuanto a la distribución según la histología, el tipo embrionario fue el más frecuente.

Dentro de los casos incluidos en el presente trabajo, encontramos que la mayoría de los pacientes pertenecen al sexo masculino, sumando 7, de las 10 muestras incluidas, y por

consiguiente 3 pertenecen al sexo femenino. Para los grupos de edad: se observaron 4 casos para el grupo de 1 a 4 años; ningún caso para el grupo de 5 a 9 años; 5 casos en el grupo de 10 a 14 años, siendo este el grupo en el que se contabilizaron más casos; y finalmente un caso en el grupo de 15 a 18 años de edad. Por parte de la distribución acorde al tipo histológico, en esta muestra se encontraron mayor número de casos del tipo embrionario, contando 6 casos, de 10, y 4 del tipo alveolar.

En cuanto a la presentación histológica de los rhabdomyosarcomas suele ser heterogénea, con variedad celular. Machado et al. (47) reportan sobre esta amplia variedad en la histología; que a pesar de que provee la mayoría, o mucha de la información para conducir al diagnóstico, no siempre es suficiente para que este sea conclusivo. En relación a las características histomorfológicas observadas en la mayoría de los casos los rhabdomioblastos conservaban sus patrones morfológicos a la célula que les dio origen, sin embargo en 2 casos se presentaron cierto grado de indiferenciación por lo que constituía un reto diagnóstico que se corroboró al momento de realizar la tricrómica de Masson y los anticuerpos anti-miogenina y anti-MyoD1. Esto nos indica que el espectro de presentación de los patrones histomorfológicos puede variar de acuerdo a la biología de cada individuo, así como el mismo comportamiento biológico de la neoplasia que aunado a las características sistémicas y el estado general del paciente será un factor determinante en la evolución de la enfermedad. Un punto importante a destacar es que independientemente del tipo de rhabdomyosarcoma embrionario o alveolar, la mayoría de los casos presentó infiltración neoplásica a tejidos adyacentes como el cartilaginoso, adiposo, nervioso y vascular lo que nos permite inferir que el comportamiento biológico de estos rhabdomyosarcomas en esta población pediátrica se comportaba de una manera invasiva y agresiva, que independientemente del tiempo en el que se diagnosticó, el potencial de

permeación de las células neoplásicas en torno al microambiente tumoral fue potencialmente invasivo. En este sentido Kaseb H. et al. (48) publican que estos tumores generalmente se presentan como masas infiltrantes de manera local, así como la eventual extensión a ganglios linfáticos regionales, donde después de la resección es muy posible la existencia de enfermedad residual microscópica.

Por otra parte, se puede decir que es posible que algunos rhabdomiomas sean diagnosticados con secciones con tinciones de rutina, sin embargo, muchos sarcomas poco diferenciados pueden semejar rhabdomiomas, y de manera contraria, se encuentran rhabdomiomas compuestos de células poco diferenciadas, que pueden aparentar otro tipo de neoplasia maligna. Con relación a lo anteriormente mencionado Chen, E. et al. (49) han publicado que los rhabdomiomas, particularmente los del tipo embrionario y alveolar pueden mostrar a la observación microscópica células pequeñas redondas, de apariencia primitiva, por lo que se deben tomar en cuenta dentro del diagnóstico diferencial, otros tumores de células pequeñas redondas. Por lo tanto, los procedimientos de diagnóstico auxiliares son a menudo esenciales para un diagnóstico fiable. De manera que, las tinciones especiales convencionales, como por ejemplo, la tinción tricrómica de Masson, han sido sustituidas principalmente por análisis por inmunohistoquímica.

Se han usado varios marcadores de inmunohistoquímica como auxiliares en la confirmación del diagnóstico de rhabdomioma. De acuerdo a Goldblum, J.R. et al. (50), el valor diagnóstico, la sensibilidad y especificidad, pueden variar substancialmente.

Como se describió, la desmina es empleada como un marcador sensible para rhabdomioma, no obstante, aquellos tumores compuestos casi en su totalidad por células

primitivas, podrían resultar negativos para este inmunomarcador, por lo que no se considera muy específica. Así también la actina músculo específica, aunque sensible para rhabdomiosarcoma, también se expresa en leiomiomasarcoma. Estas por mencionar unos ejemplos.

Por otra parte, se ha usado de manera satisfactoria, como marcadores más sensibles y específicos para rhabdomiosarcoma, la expresión mediante inmunohistoquímica de las proteínas mio-reguladoras. Dentro de ellas, miogenina y MyoD1, Goldblum, J.R. et al. (50) mencionan un estudio donde el 91% de los casos de rhabdomiosarcomas resultaron positivos para MyoD1, por consiguiente, con un 9% de los casos negativos para este marcador. Dentro de las diez muestras incluidas en este trabajo, 3 de ellas resultaron negativas para este mismo marcador. En adición a este enunciado también Ahmed, A. et al (51) en su trabajo reportan tinción positiva para MyoD1 en el 76% de sus casos y ausencia de esta en el 23%. En su publicación mencionan que se ha sugerido que la tinción con MyoD no es uniforme con diferentes patrones. Se ha llegado a conocer que MyoD1 se transloca al núcleo y activa la miogenina y otros miembros de la familia de factores de transcripción mio-génica. Por lo tanto, la ausencia de proteína en núcleo sugiere la falta o alteración de la diferenciación mio-génica y un fenotipo proliferativo más primitivo.

De manera importante, Morotti, R.A. et al. (52) reportan que la expresión de MyoD1 y miogenina fue de manera inversamente relacionada al grado de diferenciación celular, con una tinción positiva en aquellas células que se mostraban más primitivas, y que esa inmunoreactividad disminuía o estaba ausente en rhabdomioblastos más diferenciados, pero podemos inferir que en relación al grado de diferenciación será significativamente positivo en aquellas células rudimentarias debido a que los receptores de MyoD1 se encuentran expresados de manera

natural y constitutiva ya que en estas células que no han sufrido procesos de diferenciación, de mutagénesis o de colocaciones por lo que es totalmente lógico que el grado de inmunoreactividad sea mayor en los rhabdomyosarcomas con una población neoplásica más primitiva.

En el presente estudio se encontraron más muestras que presentaron inmuno positividad para MyoD1 que para miogenina. Sin embargo, según el análisis estadístico de esta muestra, no se encontraron diferencias que mostraran que el tipo de anticuerpo expresado estuviera relacionado al tipo de rhabdomyosarcoma. Es importante recalcar que a pesar de que los anticuerpos seleccionados tienen un grado aceptable de sensibilidad y especificidad, los factores que corresponden a la neoplasia per se, como la evolución, el sitio de localización, el comportamiento biológico, cambios epigenéticos entre otros serán preponderantes para el grado y positividad de la inmunoreacción en la muestra biológica tomada y que en todo momento será necesario realizar la correlación histomorfológica, clínica e imagenológica.

CONCLUSIÓN

Podemos concluir que el rhabdomyosarcoma es el tumor de tejidos blandos más frecuente en la edad pediátrica, que tiene una predilección por el género masculino y como lo reporta la literatura al momento del diagnóstico los pacientes se encuentran en un estadio clínico avanzado. Los reportes científicos mencionan que el tipo embrionario es el más frecuente, en esta casuística de pacientes del Bajío, de la misma manera, la mayoría de los casos correspondieron a rhabdomyosarcomas embrionarios, cabe destacar en relación a los factores

pronósticos que el tamaño de la neoplasia, así como el estadio, la metástasis y las condiciones sistémicas serán factores de mal pronóstico, una herramienta importante en estos tumores como en la gran mayoría es evaluar los factores de comportamiento biológico que incluyen las características histomorfológicas, el grado de pleomorfismo tanto nuclear como celular, las variaciones en la proporción del citoplasma, el núcleo, los nucléolos, la diferenciación celular, así como el índice de infiltración a tejidos adyacentes que aunado a los anticuerpos específicos permite mostrar de manera objetiva al oncólogo médico y quirúrgico como se está comportando el tumor, para que con base en esta evidencia objetiva se puedan tomar decisiones en relación al abordaje terapéutico basadas en evidencia médica científica, esto traerá como resultado que tanto el tratamiento como el pronóstico del paciente sea muy favorable desde todas las aristas. Por lo que es necesario que se siga profundizando en la investigación en estas neoplasias de cabeza y cuello en donde la prevalencia e incidencia es baja, pero el reto diagnóstico y de tratamiento sigue siendo como hasta hace algunas décadas, sin que se pueda tener un avance significativo en el abordaje terapéutico que sea altamente efectivo en controlar la enfermedad y que el índice de supervivencia se incremente.

REFERENCIAS

1. Shern, J.F., Yohe, M.E., & Khan, J. (2015) Pediatric Rhabdomyosarcoma. *Critical reviews in oncogenesis*, 20(3-4): 227–243. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2015013800>
2. Sun, X., Guo, W., Shen, J., Mankin, H.J., Hornicek, F.J., & Duan, Z. (2015) Rhabdomyosarcoma: Advances in Molecular and Cellular Biology. *Sarcoma*, 2015, 232010. <https://doi.org/10.1155/2015/232010>
3. Eguía-Aguilar, P., López-Martínez, B., Retana-Contreras, C., Perezpeña-Diazconti, M. (2016) Alveolar rhabdomyosarcoma: origin and prognostic implications of molecular findings. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 73(6), 405-410. <https://doi.org/10.1016/j.bmhmx.2016.09.001>
4. Dziuba, I., Kurzawa, P., Dopierala, M., Larque, A.B., & Januszkiewicz-Lewandowska, D. (2018) Rhabdomyosarcoma in Children-current pathology and molecular classification. *Polish journal of pathology: official journal of the Polish Society of Pathologists*. 69 (1). 20-32. <https://doi.org/10.5114/pjp.2018.75333>
5. WHO Classification of Tumours 5th Editorial Board. Soft tissue and bone tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2020. WHO Classification of tumours series, 5th ed. Vol. 3. <https://publications.iarc.fr/588>
6. Rudzinski, E.R., Anderson, J.R., Hawkins, D.S., Skapek, S.X, Parham, D.M. & Teot L.A. (2015) The World Health Organization Classification of Skeletal Muscle Tumors in Pediatric Rhabdomyosarcoma: A report From the Children's Oncology Group. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 139(10), 1281–1287. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0475-OA>
7. Anderson, W. & Doyle, L. (2021) Updates from the 2020 World Health Organization Classification of Soft Tissue and Bone Tumours. *Histopathology*, 78(5), 644-657. <https://doi.org/10.1111/his.14265>
8. Diagnóstico y Tratamiento de Sarcomas de Partes Blandas (Rabdomiosarcoma) en el Paciente Pediátrico (2010) México: Secretaría de Salud.
9. Zhu, J., Zhang, J., Tang, G., Hu, S., Zhou, G., Liu, Y., Dai, L., & Wang, Z. (2014). Computed tomography and magnetic resonance imaging observations of

- rhabdomyosarcoma in the head and neck. *Oncology letters*, 8(1), 155–160. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2094>
10. El Demellawy, D., McGowan-Jordan, J., de Nanassy, J., Chernetsova, E., & Nasr, A. (2017). Update on molecular findings in rhabdomyosarcoma. *Pathology*, 49(3), 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2016.12.345>
 11. Figueroa-Carbajal, J.J., Cárdenas-Cardós, R., Rivera-Luna, R., Castellanos-Toledo, A. (2010) Rbdomiosarcoma, experiencia de siete años en el Instituto Nacional de Pediatría. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 9(5), 198-207.
 12. Maurer, H. M., Beltangady, M., Gehan, E. A., Crist, W., Hammond, D., Hays, D. M., Heyn, R., Lawrence, W., Newton, W., & Ortega, J. (1988). The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-I. A final report. *Cancer*, 61(2), 209–220. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19880115\)61:2<209::aid-cnrcr2820610202>3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19880115)61:2<209::aid-cnrcr2820610202>3.0.co;2-l)
 13. Cancer Committee of the American Pediatric Surgical Association. Handbook for Children with Rhabdomyosarcoma 2018.
 14. Kaseb H, Khun J, Babiker H. Cancer, Rhabdomyosarcoma. NCBI Bookshelf. From the National Library of Medicine, National Institutes of Health. Last Update: November 13, 2019.
 15. Hayes-Jordan, A., & Andrassy, R. (2009). Rhabdomyosarcoma in children. *Current opinion in pediatrics*, 21(3), 373–378. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32832b4171>
 16. Parham, D. M., & Barr, F. G. (2013). Classification of rhabdomyosarcoma and its molecular basis. *Advances in anatomic pathology*, 20(6), 387–397. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3182a92d0d>
 17. Ognjanovic, S., Linabery, A. M., Charbonneau, B., & Ross, J. A. (2009). Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer*, 115(18), 4218–4226. <https://doi.org/10.1002/cncr.24465>
 18. Machado, I., Mayordomo-Aranda, E., Giner, F., & Llombart-Bosch, A. (2015). The Role of Immunohistochemistry in Rhabdomyosarcoma Diagnosis Using Tissue Microarray Technology and a Xenograft Model. *Fetal and pediatric pathology*, 34(5), 271–281. <https://doi.org/10.3109/15513815.2015.1042604>

19. Keller, C., & Guttridge, D. C. (2013). Mechanisms of impaired differentiation in rhabdomyosarcoma. *The FEBS journal*, 280(17), 4323–4334. <https://doi.org/10.1111/febs.12421>
20. Esteves de Lima, J., & Relaix, F. (2021). Master regulators of skeletal muscle lineage development and pluripotent stem cells differentiation. *Cell regeneration (London, England)*, 10(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13619-021-00093-5>
21. Comai, G., & Tajbakhsh, S. (2014). Molecular and cellular regulation of skeletal myogenesis. *Current topics in developmental biology*, 110, 1–73. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405943-6.00001-4>
22. Zammit P. S. (2017). Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, 72, 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.11.011>
23. Fong, A. P., Yao, Z., Zhong, J. W., Cao, Y., Ruzzo, W. L., Gentleman, R. C., & Tapscott, S. J. (2012). Genetic and epigenetic determinants of neurogenesis and myogenesis. *Developmental cell*, 22(4), 721–735. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.01.015>
24. Conerly, M. L., Yao, Z., Zhong, J. W., Groudine, M., & Tapscott, S. J. (2016). Distinct Activities of Myf5 and MyoD Indicate Separate Roles in Skeletal Muscle Lineage Specification and Differentiation. *Developmental cell*, 36(4), 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.01.021>
25. Wardle F. C. (2019). Master control: transcriptional regulation of mammalian Myod. *Journal of muscle research and cell motility*, 40(2), 211–226. <https://doi.org/10.1007/s10974-019-09538-6>
26. Yang, Z., MacQuarrie, K., Analau, E., et al. (2009) MyoD and E-protein heterodimers switch rhabdomyosarcoma cells from an arrested myoblast phase to a differentiated state. *Genes & Development*. 23(6):694-707. <https://doi.org/10.1101/gad.1765109>
27. McCarthy J. J. (2008). MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. *Biochimica et biophysica acta*, 1779(11), 682–691. <https://doi.org/10.1016/j.bbaggm.2008.03.001>
28. Rao, P. K., Missiaglia, E., Shields, L., Hyde, G., Yuan, B., Shepherd, C. J., Shipley, J., & Lodish, H. F. (2010). Distinct roles for miR-1 and miR-133a in the proliferation and differentiation of rhabdomyosarcoma cells. *FASEB journal : official publication of the*

- Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(9), 3427–3437.
<https://doi.org/10.1096/fj.09-150698>
29. Horak, M., Novak, J., & Bienertova-Vasku, J. (2016). Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Developmental biology*, 410(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.12.013>
30. Pruller, J., Hofer, I., Ganassi, M., Heher, P., Ma, M. T., & Zammit, P. S. (2021). A human Myogenin promoter modified to be highly active in alveolar rhabdomyosarcoma drives an effective suicide gene therapy. *Cancer gene therapy*, 28(5), 427–441.
<https://doi.org/10.1038/s41417-020-00225-0>
31. NIH National Center for Biotechnology Information (2022). MYOG Myogenin [Homo sapiens (human)]
32. Faralli, H., & Dilworth, F. J. (2012). Turning on myogenin in muscle: a paradigm for understanding mechanisms of tissue-specific gene expression. *Comparative and functional genomics*, 2012, 836374. <https://doi.org/10.1155/2012/836374>
33. Adhikari, A., Kim, W., & Davie, J. (2021). Myogenin is required for assembly of the transcription machinery on muscle genes during skeletal muscle differentiation. *PLoS one*, 16(1), e0245618. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245618>
34. Shukla, N., Ameer, N., Yilmaz, I., Nafa, K., Lau, C. Y., Marchetti, A., Borsu, L., Barr, F. G., & Ladanyi, M. (2012). Oncogene mutation profiling of pediatric solid tumors reveals significant subsets of embryonal rhabdomyosarcoma and neuroblastoma with mutated genes in growth signaling pathways. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(3), 748–757.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2056>
35. Calhabeu, F., Hayashi, S., Morgan, J. E., Relaix, F., & Zammit, P. S. (2013). Alveolar rhabdomyosarcoma-associated proteins PAX3/FOXO1A and PAX7/FOXO1A suppress the transcriptional activity of MyoD-target genes in muscle stem cells. *Oncogene*, 32(5), 651–662. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.73>
36. Shern, J. F., Chen, L., Chmielecki, J., Wei, J. S., Patidar, R., Rosenberg, M., et al. (2014). Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative

- tumors. *Cancer discovery*, 4(2), 216–231. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0639>
37. Seki, M., Nishimura, R., Yoshida, K., Shimamura, T., Shiraishi, Y., Sato, et al. (2015). Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nature communications*, 6, 7557. <https://doi.org/10.1038/ncomms8557>
38. Stefano, S., & Giovanni, S. (2019). The PTEN Tumor Suppressor Gene in Soft Tissue Sarcoma. *Cancers*, 11(8), 1169. <https://doi.org/10.3390/cancers11081169>
39. Liu, C., Li, D., Jiang, J., Hu, J., Zhang, W., Chen, Y., et al. (2014). Analysis of molecular cytogenetic alteration in rhabdomyosarcoma by array comparative genomic hybridization. *PloS one*, 9(4), e94924. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094924>
40. Lynn, M., Shah, N., Conroy, J., Ennis, S., Morris, T., Betts, D., & O'Sullivan, M. (2014). A study of alveolar rhabdomyosarcoma copy number alterations by single nucleotide polymorphism analysis. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology: AIMM*, 22(3), 213–221. <https://doi.org/10.1097/PDM.0000000000000030>
41. Nishimura, R., Takita, J., Sato-Otsubo, A., Kato, M., Koh, K., Hanada, R., et al. (2013). Characterization of genetic lesions in rhabdomyosarcoma using a high-density single nucleotide polymorphism array. *Cancer science*, 104(7), 856–864. <https://doi.org/10.1111/cas.12173>
42. Lindberg, M. (2017) Diagnostic Pathology: Normal Histology. (2nd Ed.) Elsevier. (p. 25).
43. Kokko, L. L., Hurme, S., Maula, S. M., Alanen, K., Grénman, R., Kinnunen, I., & Ventelä, S. (2011). Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous-cell carcinoma. *Oral oncology*, 47(6), 510–516. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.03.026>
44. Bologna-Molina, R., Damián-Matsumura, P., & Molina-Frechero, N. (2011). An easy cell counting method for immunohistochemistry that does not use an image analysis program. *Histopathology*, 59(4), 801–803. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03954.x>
45. Zhao, Z., Yin, Y., Zhang, J., Qi, J., Zhang, D., Ma, Y., Wang, Y., Li, S., & Zhou, J. (2015) Spindle cell/sclerosing rhabdomyosarcoma: case series from a single institution

- emphasizing morphology, immunohistochemistry and follow-up. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(11), 13814–13820.
46. Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes. Resultados 2019. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/632369/RNCA_2019.pdf
47. Machado, I., Mayordomo-Aranda, E., Giner, F., Llombart-Bosch A. (2015) The Role of Immunohistochemistry in Rhabdomyosarcoma Diagnosis Using Tissue Microarray Technology and a Xenograft Model. *Fetal and pediatric pathology*, 34(5), 271-81. doi: 10.3109/15513815.2015.1042604.
48. Kaseb, H., Kuhn, J., Babiker, HM. Rhabdomyosarcoma. [Updated 2022 Jul 18]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507721/>
49. Chen, E., Ricciotti, R., Futran, N., & Oda, D. (2017). Head and Neck Rhabdomyosarcoma: Clinical and Pathologic Characterization of Seven Cases. *Head and neck pathology*, 11(3), 321-326. <https://doi.org/10.1007/s12105-016-0771-0>.
50. Goldblum, J.R., Folpe, A.L., Weiss, S.W. (2021) Enzinger y Weiss. Soft Tissue Tumors. (7th Ed.) Elsevier. (p. 680)
51. Ahmed, A. A., Habeebu, S., Farooqi, M. S., Gamis, A. S., Gonzalez, E., Flatt, T., Sherman, A., Surrey, L., Arnold, M. A., Conces, M., Koo, S., Dioufa, N., Barr, F. G., & Tsokos, M. G. (2021). MYOD1 as a prognostic indicator in rhabdomyosarcoma. *Pediatric blood & cancer*, 68(9), e29085. <https://doi.org/10.1002/pbc.29085>
52. Morotti, R. A., Nicol, K. K., Parham, D. M., Teot, L. A., Moore, J., Hayes, J., Meyer, W., Qualman, S. J., & Children's Oncology Group (2006). An immunohistochemical algorithm to facilitate diagnosis and subtyping of rhabdomyosarcoma: the Children's Oncology Group experience. *The American journal of surgical pathology*, 30(8), 962–968. <https://doi.org/10.1097/00000478-200608000-00005>