

# Neuroblastoma y citometría de flujo multiparamétrica, una nueva y posible herramienta diagnóstica. Caso clínico

## *Multi-parametric Flow Cytometry for Neuroblastoma, a new and possible diagnostic tool. Case report*

Bioq. Belén Manrique<sup>a</sup>, Dra. Jessica López Martí<sup>c</sup>, Dr. Walter Cacciavillano<sup>b</sup> y Dr. Jorge Rossi<sup>a</sup>

### RESUMEN

El neuroblastoma es el tumor sólido pediátrico extracranial más frecuente, que representa un 5,6% según el Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino. Se requieren, para su diagnóstico, varios métodos complementarios (radiológicos, biológicos y bioquímicos), entre los que la citometría de flujo multiparamétrica (CFM) surge con un potencial rol, aún no explorado. La CFM es una metodología que permite obtener información sobre el tamaño, la complejidad y la expresión antigénica de la célula mediante el uso de un láser y anticuerpos monoclonales fluorescentes. Existe un creciente número de trabajos en la literatura que dan cuenta de la relevancia de la aplicación de la CFM en el diagnóstico y seguimiento de tumores sólidos. El objetivo de esta presentación es destacar el rol fundamental que tuvo la CFM en el caso de una paciente con neuroblastoma, en la cual un diagnóstico precoz permitió administrar rápidamente un adecuado tratamiento inicial. **Palabras clave:** neuroblastoma, citometría de flujo, tumor no hematopoyético, niños, tumores.

### ABSTRACT

Neuroblastoma is the most frequent extracranial solid tumor in childhood, representing 5.6% according to the "Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino". For its diagnosis, several complementary methods (radiological, biological and biochemical) are required, and Multi-parametric Flow Cytometry (MFC) arises as a potential diagnostic method, despite not having been so far extensively explored. MFC is a method that allows to obtain several information about size, internal complexity and antigenic expression by the use of a laser and fluorescent monoclonal antibodies. There is an increasing number of reports in the literature which reveal the importance of using MFC for diagnosis and monitoring of solid tumors. The aim in this presentation is to highlight the fundamental role that MFC had in the case of a patient affected by neuroblastoma, in whom an early diagnosis using this methodology allowed prompt administration of adequate treatment.

**Key words:** neuroblastoma, flow cytometry, non-Hematopoietic neoplasms, children, neoplasms.

<http://dx.doi.org/10.5546/aap.2016.e100>

a. Inmunología y Reumatología.

b. Hemato-Oncología.

c. Anatomía Patológica.

Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan. CABA.

### Correspondencia:

Bioq. Belén Manrique: belen.manrique@gmail.com

Financiamiento: Ninguno.

Conflicto de intereses: Ninguno que declarar.

Recibido: 25-7-2015

Aceptado: 5-10-2015

### INTRODUCCIÓN

El neuroblastoma es el tumor sólido extracranial más frecuente en pediatría, que representa un 5,6% de todos los casos de tumores malignos pediátricos en Argentina según datos del Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino (ROHA), resultados 2000-2008.

Este tumor se origina a partir de células de la cresta neural y se localiza, más frecuentemente, a nivel abdominal y en las glándulas adrenales, pero también puede presentarse en el cuello, el tórax y la pelvis. La presentación clínica más habitual es la presencia de masa tumoral. El pronóstico es variable y depende de varios factores, tales como la edad de presentación, el subtipo histológico, la presencia o ausencia de factores biológicos (amplificación de oncogén n-myc, alteraciones cromosómicas: deleción del 1p, 11q, entre otras). Los neuroblastomas diseminados diagnosticados después del año de edad son siempre muy agresivos, con pronóstico de sobrevida desfavorable.

El neuroblastoma requiere, para su diagnóstico, varios métodos complementarios (radiológicos, biológicos y bioquímicos). La citometría de flujo multiparamétrica (CFM) se ha usado, sobre todo, para el diagnóstico y el seguimiento de neoplasias hematopoyéticas y, en tumores no hematopoyéticos (tumores sólidos), se ha limitado, principalmente, a la determinación de índice de ácido desoxirribonucleico (ADN) con fines pronósticos, sin explorar con claridad aún su potencial aplicación con fines diagnósticos. Esta metodología permite, mediante el uso de un láser y anticuerpos monoclonales fluorescentes, detectar características celulares, como tamaño, complejidad y expresión antigénica. Debido a la disponibilidad de nuevos marcadores celulares y a la capacidad de esta metodología de identificar células tumorales en forma rápida, aun en muestras de escasa celularidad con alta sensibilidad, la CFM surge como una potencial herramienta diagnóstica también en el área de tumores no hematopoyéticos.<sup>1</sup>

Una publicación reciente evaluó por CFM un panel de marcadores para *screening* diagnóstico

y posterior clasificación de diferentes tipos de tumores sólidos pediátricos, con el objetivo de establecer un diagnóstico diferencial entre muestras infiltradas por células tumorales y muestras reactivas, neoplasias hematológicas versus no hematológicas y subclasificación de los tumores sólidos.<sup>2</sup>

La CFM presenta la ventaja de proveer resultados inmediatos, con la posterior correlación con el estudio anatomopatológico, relevante en casos en que el estado clínico de los pacientes requiera la administración de un tratamiento de forma inmediata.

En el presente artículo, presentamos un caso clínico en el que tuvo relevancia diagnóstica el resultado obtenido por CFM.

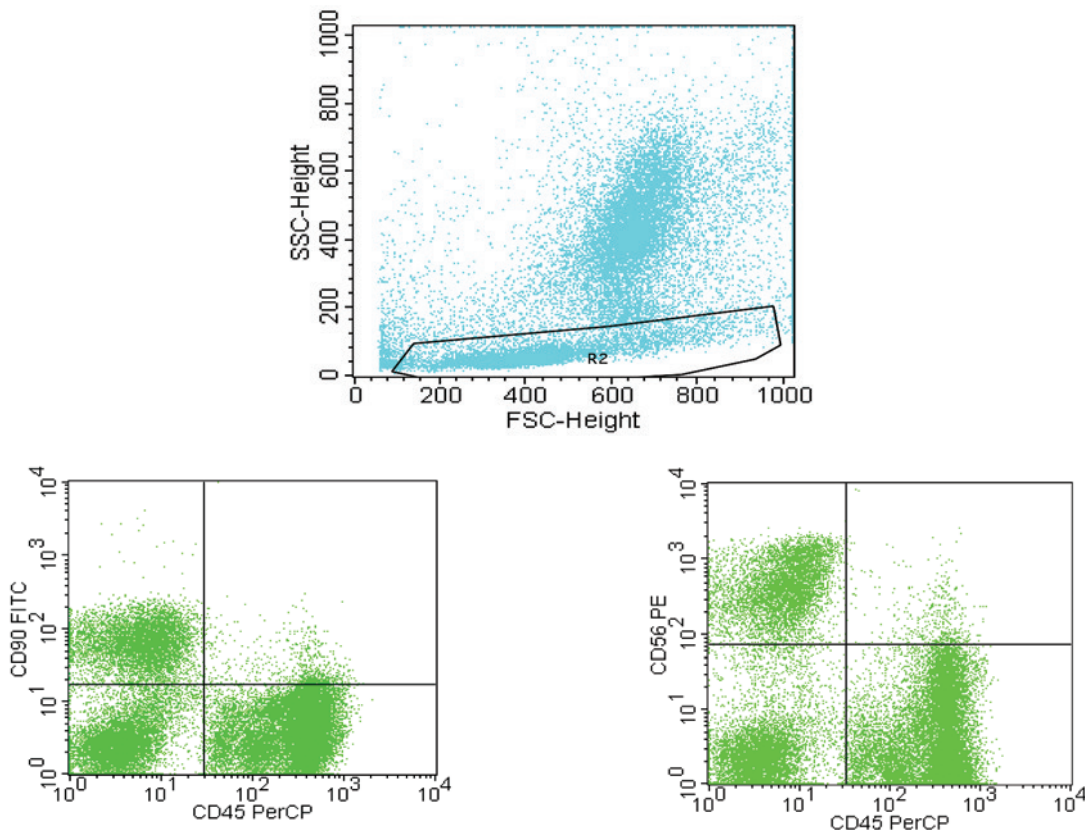
### PRESENTACIÓN CLÍNICA

Paciente de 9 meses de edad, que ingresó el 29/09/13 a nuestro hospital derivada desde otra

institución por un tumor cervical de tres semanas de evolución con rápido crecimiento en los días previos a la consulta. El diagnóstico presuntivo inicial fue de leucemia aguda sobre la base del informe de punción-aspiración de médula ósea (PAMO), que notificaba una población del 62% de blastos de aspecto mieloide en el centro que derivó a la paciente. Al momento del ingreso, se constató gran dificultad respiratoria secundaria a la compresión mecánica del tumor, por lo que se realizó una intubación endotraqueal. Se solicitó una nueva PAMO para corroborar los resultados antes de comenzar un tratamiento.

Se analizó la muestra de médula ósea por CFM, y se realizó la marcación con un panel de anticuerpos, que permitió descartar la presencia de una leucemia aguda y detectar una población de alrededor del 47% de células, que presentó el siguiente perfil de expresión antigénico: CD45-, CD56+ y CD90+ (coexpresión), el cual orientó a

FIGURA 1. Marcación de médula ósea por citometría de flujo multiparamétrica



Muestra de médula ósea del 29/9/13 analizada por citometría de flujo multiparamétrica. Se observa una población que cae en la región linfomonocítica según el tamaño y la complejidad (R2). Analizando particularmente la población R2 en el gráfico de CD56 (PE) vs. CD45 (PerCp), se observa que la población seleccionada no expresa CD45 y sí expresa CD56. Analizando la población R2 en el gráfico de CD90 (FITC) vs. CD45 (PerCp), se observa que la población seleccionada expresa CD90. La población tiene, entonces, el siguiente fenotipo de expresión: CD45-/CD56+/CD90+ y representa un 47% de la población total de la médula ósea.

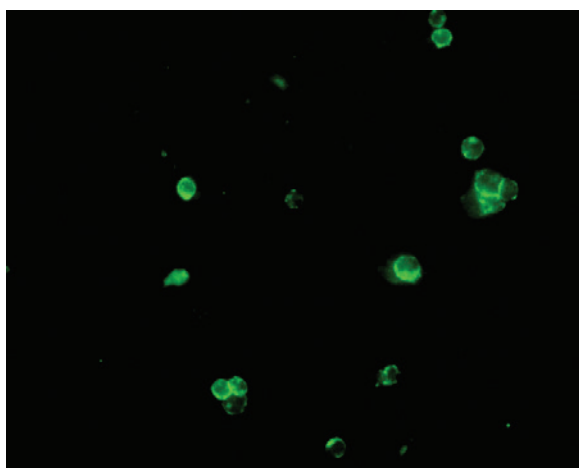
células tumorales de origen no hematopoyético (Figura 1). Teniendo en cuenta estos resultados, se evaluó la expresión de GD2 por microscopía óptica, utilizando una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), que arrojó un resultado intensamente positivo (Figura 2). Estos informes alertaron rápido a los oncólogos y permitieron descartar el diagnóstico de leucemia aguda y orientarlo al de neuroblastoma.

Debido a la gravedad del cuadro, y con la alta sospecha de neuroblastoma, se decidió comenzar quimioterapia con 6,6 mg/kg/día de carboplatino y 5 mg/kg/día de etopósido por tres días, como tratamiento inicial.

Posteriormente, se efectuó la estadificación de la paciente con estudios complementarios: tomografía axial computada y centellograma con metaiodobencilguanidina.

El día 16/10/13, se realizó la biopsia de la tumoración, cuyo informe de Anatomía Patológica fue de neuroblastoma pobremente diferenciado, con índice de mitosis cariorrexis mayor del 4%, lo que se tradujo en una histología desfavorable. Se evidenció, por hibridación fluorescente *in situ* (*fluorescent in situ hybridization*; FISH, por sus siglas en inglés) de interfase, amplificación del oncogén n-myc y deleción 1p36.

FIGURA 2. Marcación de GD2 por inmunofluorescencia indirecta



GD2 por inmunofluorescencia indirecta de microscopía óptica realizado en médula ósea. Se observan células sueltas y en rosetas, características del neuroblastoma, con una positividad intensa y continua a lo largo de toda la membrana plasmática celular. Se realizó mediante una marcación indirecta, utilizando como anticuerpo primario un antigangliósido (3F8) y, como anticuerpo secundario, un anti-ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína.

Se clasificó a la paciente como de alto riesgo por lo siguiente: menor de 18 meses, estadio M según el International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS),<sup>3</sup> histología desfavorable, amplificación del oncogén n-myc y 1p36 deleciónado.

Luego del ciclo inicial, la paciente continuó el tratamiento con quimioterapia combinada intensiva. Fue refractaria a él y falleció como consecuencia de la progresión de la enfermedad a los 6 meses del diagnóstico.

## DISCUSIÓN

El neuroblastoma es el tumor sólido extracranial más frecuente en pediatría. Esta neoplasia se origina a partir de células de la cresta neural. Se localiza, más frecuentemente, a nivel abdominal (glándulas adrenales), pero puede tener otras localizaciones, como el cuello, el tórax y la pelvis. El pronóstico es variable y depende de varios factores, como la edad de presentación, el subtipo histológico y la presencia o ausencia de factores biológicos (amplificación de oncogén n-myc, deleción 1p36 y 11q, entre otras).

La evolución clínica del neuroblastoma también es variable: puede presentar regresiones espontáneas, diferenciación a componente maduro, responder, progresar o ser refractario a los tratamientos convencionales.

El neuroblastoma es clasificado en bajo, intermedio y alto grado según la edad de presentación, la localización, los hallazgos radiológicos, los factores biológicos y la patología.<sup>3</sup> Los pacientes caracterizados como de riesgo bajo e intermedio tienen muy buen pronóstico al ser tratados con quimioterapia, cirugía, radioterapia. En los pacientes de alto riesgo, que son aquellos mayores de 18 meses que presentan enfermedad metastásica o con amplificación del oncogén n-myc, el enfoque de tratamiento es multimodal: quimioterapia en dosis convencionales o altas, cirugía, radioterapia, mantenimiento con ácido retinoico y/o inmunoterapia. A pesar de la intensificación de los tratamientos, el pronóstico sigue siendo malo, con sobrevividas menores del 40%.<sup>4</sup> Los niños con este tipo de presentación constituyen el mayor grupo dentro de los pacientes con diagnóstico de neuroblastoma. Mientras que la mitad de los casos se presentan con enfermedad localizada y tienen altas chances curativas, el restante 50% de los pacientes se presentan con enfermedad diseminada y tienen un pronóstico de sobrevivida desfavorable (excepto para los pacientes menores de 18 meses).

El diagnóstico precoz en Oncología es muy

importante, ya que determina la decisión terapéutica inicial.

En el último tiempo, el conocimiento de biomarcadores en el cáncer se ha incrementado drásticamente y ha generado nuevas herramientas para mejorar el manejo de los pacientes mediante el aumento de la eficiencia de detección y, por ende, la eficacia del tratamiento.

El uso de la CFM en neoplasias se ha expandido de modo sustancial en los últimos años. Durante mucho tiempo, fue utilizada en la definición de los perfiles antigénicos de leucemias y linfomas para establecer el linaje y estadio madurativo de los blastos, información crucial para su tratamiento. Luego, se incorporó a los protocolos de tratamiento la determinación de la enfermedad mínima residual (EMR) y se establecieron grupos de riesgo más precisos para los pacientes, lo que, finalmente, redundó en una mejor supervivencia.<sup>5</sup>

En la actualidad, hay evidencia de la utilidad de la CFM en neuroblastomas tanto para el diagnóstico y la evaluación de la enfermedad diseminada en médula ósea como para el seguimiento de la enfermedad y la respuesta al tratamiento mediante la búsqueda de EMR en médula ósea, a través de la combinación de marcadores adecuados.<sup>6,7</sup>

Se sabe que el perfil de expresión antigénica del neuroblastoma es CD45-/CD56+/CD81+/CD9+/CD90+/GD2+.<sup>2</sup>

En el presente caso, la detección del tumor sólido por CFM comenzó por la visualización de una población CD45 negativa, debido a que este antígeno se expresa en células de origen hematopoyético y no en tumores no hematopoyéticos.

De los marcadores evaluados hasta ahora en los tumores sólidos, el CD56 es el más investigado. A pesar de que la mayoría de estos tumores lo expresan, la intensidad con que lo hacen es diferente entre ellos. Los neuroblastomas y los tumores neuroectodérmicos primitivos (*primitive neuroectodermal tumor*; PNET, por sus siglas en inglés) expresan los niveles más altos de CD56.

El GD2 es un disialogangliósido que se expresa en células de origen neuroectodérmico, por lo tanto, su expresión está asociada al neuroblastoma y al PNET. La expresión de GD2 en el neuroblastoma es característicamente intensa.

El CD90 es un antígeno marcador de *stem cell like* y de células en proliferación y también está asociada su expresión al neuroblastoma.

## CONCLUSIÓN

En resumen, en el campo de los tumores sólidos, la CFM podrá constituir una metodología que posibilitará obtener resultados que orienten rápidamente un diagnóstico e iniciar un tratamiento adecuado en forma precoz. La evaluación de la presencia de infiltración tumoral en médula ósea al momento del diagnóstico ayudará a definir la estadificación inicial y, durante el tratamiento, podrá definir, junto con otros métodos, la respuesta a este, a través de la evaluación de la enfermedad mínima residual o la detección de recaída de la enfermedad de base. Nuevos estudios en una cohorte prospectiva de pacientes con tumores sólidos pediátricos son necesarios para establecer definitivamente el aporte de esta metodología e incluirla como una de las herramientas diagnósticas y de seguimiento en tumores sólidos. ■

## REFERENCIAS

1. Varma N, Naseem S. Application of flow cytometry in pediatric hematology-oncology. *Pediatr Blood Cancer* 2011;57(1):18-29.
2. Ferreira-Facio CS, Milito C, Botafogo V, Fontana M, et al. Contribution of multiparameter flow cytometry immunophenotyping to the diagnostic screening and classification of pediatric cancer. *PLoS One* 2013;8(3):e55534.
3. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009;27(2):289-97.
4. Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, et al. Long term results for children with high risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J Clin Oncol* 2009;27(7):1007-13.
5. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, Dworzak MN, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol* 2009;27(31):5168-74.
6. Bozzi F, Gambirasio F, Luksch R, Collini P, et al. Detecting CD56+/NB84+/CD45-immunophenotype in the bone marrow of patients with metastatic neuroblastoma using flow cytometry. *Anticancer Res* 2006;26(5A):3281-87.
7. Köksal Y, Reisli I, Dogu F, Ucar C, et al. Can flow-cytometry be used at diagnosis and follow-up in neuroblastoma with bone marrow involvement? *Turkish Journal of Cancer* 2006;36(1):27-30.