



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI**

HOSPITAL DE PEDIATRIA

JULIO 2011

**Detección de Enfermedad Mínima Residual en
Tumores Embrionarios Cerebrales mediante
Citometría de Flujo**

Tutores:

Enrique López Aguilar¹

Ana Carolina Sepúlveda Vildósola²

Tesista:

María Soledad Galván Luna³

1. Médico oncólogo, Jefe del Servicio de Oncología del HP CMN Siglo XXI
 2. Maestra en medicina y educación médica, Directora del servicio de Enseñanza e Investigación en Salud del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI
 3. Médico residente de pediatría médica con sede en el HP CMN Siglo XXI
-



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mis papás y a mi hermanita Pili, que son la mayor bendición que Dios me ha concedido y prueba de su infinito amor.

A mi abuela Luz, Lulú, Nina, Chelo, Bere y tía Delia, que siempre me han alentado para seguir adelante.

Al doctor Enrique López, por todas las oportunidades que me ha dado y a quien tanto quiero y admiro.

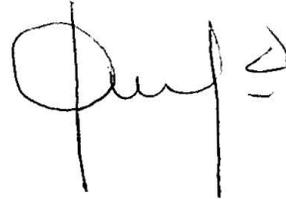
Al equipo de Oncología, que me ha brindado tanto apoyo, así como a la doctora Ana Carolina Sepúlveda, quien se sumó a este esfuerzo y me invitó a hacer nuevas reflexiones.

A Roberto Solares y a mis amigos que llenan de alegría mi vida.

Al Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, que cultivó en mí la pasión por el estudio y el amor por los más pequeñitos.

JURADO DE EXAMEN FINAL DE ESPECIALIZACIÓN DE PEDIATRIA

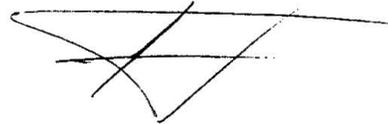
DR. FERNANDO CERECEDO
DIAZ.
Médico adscrito al servicio de
Oncología del Hospital de Pediatría
CMN Siglo XXI



DRA. ANA PAULINA RIOSCOVIAN
SOTO.
Médico adscrito al servicio de
Oncología del Hospital de Pediatría
CMN Siglo XXI



DR. HÉCTOR JAIME GONZÁLEZ
CABELLO.
Profesor Titular de Pediatría sede
Hospital de Pediatría de CMN Siglo XXI



DRA. ANA CAROLINA SEPÚLVEDA
VILDÓSOLA.
Directora de Enseñanza e Investigación
en Salud del Hospital de Pediatría del
CMN Siglo XXI



DR. ENRIQUE LÓPEZ
AGUILAR.
Jefe del servicio de Oncología del
Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI



2011

Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI

“Detección de Enfermedad Mínima Residual
en Tumores Embrionarios Cerebrales
mediante Citometría de flujo”

Tutores:

Dr. Enrique López Aguilar.

Dra. Ana Carolina Sepúlveda Vildósola.

Colaboradores:

Dra. Alma Griselda Ramírez Reyes.

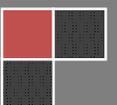
Dra. Ana Paulina Rioscovian Soto.

Dra. Alicia Georgina Siordia Reyes.

QFB. Leticia Figueroa Rosas.

Tesista:

María Soledad Galván Luna.



CONTENIDO

RESUMEN.....	4
ANTECEDENTES.....	5
Clasificación de los Tumores Cerebrales	
Tumores con diseminación vía líquido cefalorraquídeo	
Ependimomas	
Meduloblastoma	
Pineoblastomas	
Tumores de células germinales	
Tratamiento	
Técnicas de estudio de la enfermedad mínima residual	
Citometría de flujo	
Inmunocitología	
FISH (Hibridación in situ con fluorescencia)	
RT-PCR (Transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de polimerasa)	
JUSTIFICACION.....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	15
OBJETIVOS.....	16
Objetivo general	
Objetivos específicos	
HIPÓTESIS.....	17
MÉTODO.....	18
A) Universo y muestra.....	18
Tipo de estudio	
B) Criterios de inclusión, no inclusión y eliminación.....	18
C) Desarrollo del estudio.....	19
<i>Metodología para determinar número de células tumorales por Citometría de flujo</i>	
<i>Preparación de muestra para su lectura en citómetro</i>	
<i>Reacción antígeno-anticuerpo</i>	
<i>Metodología para determinar presencia de células tumorales por citomorfológico</i>	
D) Definición y clasificación de las variables.....	22
E) Cálculo de tamaño de muestra.....	23
F) Plan de análisis estadístico.....	23
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIONES.....	31
Anexo 1	32
Anexo 2	35
Bibliografía	37

Dr. Enrique López Aguilar, Dra. Ana Carolina Sepúlveda Vildósola, Dra. Alicia Georgina Siordia Reyes, Dra. Alma Griselda Ramírez Reyes, Dra. Ana Paulina Rioscovian Soto, QFB. Leticia Figueroa Rosas, Dra. María Soledad Galván Luna.

“Detección de Enfermedad Mínima Residual en Tumores Embrionarios Cerebrales mediante Citometría de flujo”

ANTECEDENTES. Los tumores del sistema nervioso central son los tumores sólidos más comunes en los niños, siendo responsables de más de 500 casos nuevos por año en México. La citometría de flujo se utiliza para analizar y definir el perfil inmunofenotípico de las células neoplásicas a través de la aplicación de anticuerpos monoclonales específicos, y establecer así la presencia de fenotipos aberrantes. Al momento actual, la respuesta tumoral y la evolución de los pacientes con un tumor cerebral se evalúa mediante un estudio de resonancia magnética y un citomorfológico de LCR. Existen dudas razonables de la persistencia de enfermedad microscópica a pesar que los estudios referidos no revelen positividad. Por esta razón ha resultado necesario la realización de este estudio debido a que podría detectar la presencia de células neoplásicas residuales, a pesar de la negatividad de los métodos referidos, y por ende pudiera replantear los criterios para definir el cese del tratamiento.

OBJETIVO. Cuantificar la respuesta microscópica al tratamiento mediante detección de enfermedad mínima residual por Citometría de flujo en paciente con meduloblastomas, ependimomas, pineoblastomas y tumores germinales de la región pineal.

MATERIAL Y METODOS. Ingresaron al estudio pacientes de ambos sexos entre 1 y 17 años de edad con tumores embrionarios cerebrales. Una vez realizado el diagnóstico histopatológico de su tumoración, se realizó punción lumbar como parte de los estudios de extensión rutinaria para este tipo de neoplasias y se determinó la enfermedad residual por Citometría de flujo; posteriormente recibieron esquema de quimioterapia protocolizada de acuerdo al tipo de tumor cada 28 días, y previo a cada curso subsiguiente se realizó punción lumbar. Se obtuvo 1mL en cada punción y se procesó la muestra por citómetro de flujo para determinación cuántica de células malignas, con anticuerpos anti *Bcl-2*.

RESULTADOS. Se incluyeron un total de 20 pacientes, de los cuales 5 fueron eliminados por no contar con los valores completos posterior al segundo y cuarto curso de quimioterapia. De los 15 pacientes restantes, 9 fueron masculinos (60%) y 6 femeninos (40%) con una relación M:F de 1.5:1. La mediana de edad fue de 105.5 meses. De los tipos de tumores embrionarios de SNC el 33.33% fueron ependimomas, 33.33% meduloblastomas, y 33.33% tumores germinales mixtos.

Los resultados de la citometría de flujo mostraron que en la determinación inicial, 11 pacientes (73%) no presentaron células neoplásicas, mientras que en la 2ª determinación (post 2º curso de quimioterapia) sólo cinco pacientes (33%) fueron negativos. En la 3ª determinación (post 4º curso de quimioterapia) cuatro pacientes (26%) fueron negativos. Hasta el momento sólo cinco pacientes cuentan con celularidad normal por citometría.

Respecto a los resultados del citomorfológico, en la determinación inicial, 13 pacientes fueron reportados como negativos (87%), 14 fueron negativos en las 2ª y 3ª determinaciones (93% respectivamente).

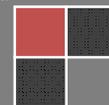
La concordancia para ambos métodos para determinar positividad en LCR, de los 15 pacientes, fue, de trece determinaciones en el estudio basal (concordaron 86%, Exacta de Fisher $p=0.057$). En la 2ª determinación seis de quince (40%, Exacta de Fisher $p=0.667$). En la 3ª determinación cinco de quince concordaron (33%, Exacta de Fisher $p=0.733$).

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los rangos de las tres determinaciones (Friedman $p=0.011$), encontrando que la diferencia se encuentra entre las determinaciones de la fase basal y posterior al cuarto curso de quimioterapia (Wilcoxon $p=0.022$).

En 11 pacientes, se encontró incremento en la determinación de células neoplásicas por Citometría de flujo, correlacionando con la imagen por RMN en 8 pacientes (72%).

CONCLUSIONES. Se encontró un aumento estadísticamente significativo en la celularidad neoplásica posterior a seis cursos de quimioterapia. A partir de este protocolo no será ético iniciar vigilancia en un paciente que tenga positividad en citometría, aún a pesar que de que tanto en el citomorfológico de LCR como en los estudios de neuroimagen no se detecte actividad tumoral.

Palabras clave: citometría de flujo, tumores embrionarios cerebrales, enfermedad mínima residual



Detección de Enfermedad Mínima Residual en Tumores Embrionarios Cerebrales mediante Citometría de Flujo

ANTECEDENTES

El estudio de las neoplasias en niños comprende los casos de cáncer que se presentan en el grupo de menores de 15 años, aunque algunos autores han señalado que la edad debería extenderse hasta los menores de 20 años. Las neoplasias en los menores de 15 años representan entre 1% y 5% del total de las neoplasias en la población con cáncer, por lo que existen razones importantes que justifican su investigación¹.

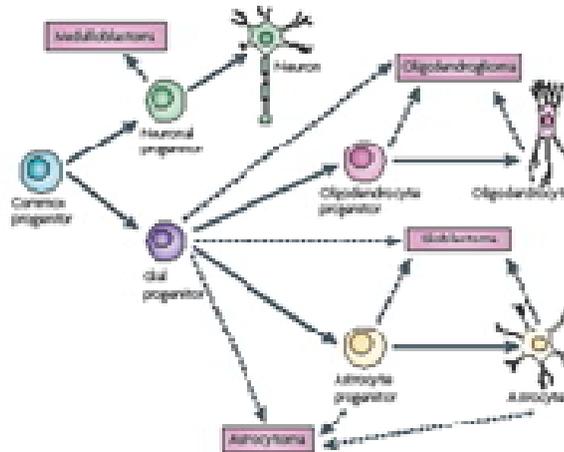
En México, (1990) la mortalidad por cáncer en la población derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) ocupó el décimo lugar en el grupo de menores de 1 año, el quinto lugar en el de 1 a 4 años y el primero en el de 5 a 14 años².

Los tumores del sistema nervioso central son los tumores sólidos más comunes en los niños, siendo responsables de más de 500 casos nuevos por año en México.

Ocupan el segundo lugar en frecuencia después de las leucemias y los linfomas. En México la incidencia es de 17 por millón cada año. La mortalidad es alta, es la sexta causa de muerte en la edad preescolar, y la novena causa en la edad escolar. La mortalidad en estos pacientes ha disminuido 23% desde 1975 debido a los avances en el tratamiento con quimioterapia³.

En la niñez los tumores cerebrales son biológica e histológicamente heterogéneos, y varían de lesiones localizadas de bajo grado a tumores de alto grado con diseminación en el neuroeje. Alrededor del 50% de los tumores cerebrales pediátricos se presentan por encima del tentorium y 50% en la fosa posterior. Se clasifican de acuerdo a la célula de origen en tumores gliales como astrocitomas, y no gliales como los neuroblastomas⁴.

Los tumores cerebrales se clasifican según su histología, pero la localización del tumor y el grado de diseminación son factores importantes que afectan el tratamiento y el pronóstico. Para el diagnóstico y la clasificación tumoral, se usan cada vez más los análisis inmunohistoquímicos, los hallazgos citogenéticos y genético-moleculares, y las mediciones de la actividad mitótica⁵.



Huse J, Holland E. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. NATURE REVIEWS CANCER 2010; 10: 319-331.

Clasificación de los Tumores Cerebrales

La clasificación de los tumores cerebrales en niños se basa actualmente en su histología y localización⁶. Los tumores se categorizan clásicamente en infratentoriales, supratentoriales, selares o supraselares.

Los **tumores infratentoriales** comunes (fosa posterior) son los siguientes: **a)** Astrocitomas cerebelares (generalmente pilocíticos, pero también fibrilares y, con menor frecuencia, de grado alto); **b)** Medulloblastomas (tumores neuroectodérmicos primitivos [TNEP]); **c)** Ependimomas (celulares, papilares, de células claras, tancíticos o anaplásicos); **d)** Los gliomas del tronco encefálico son normalmente gliomas pontinos intrínsecos o tumores intrínsecos difusos de grado alto que se diagnostican por neurorradiografía sin biopsia. Por lo general, los tumores focales, tectales y exofíticos son de grado bajo; **e)** Tumores teratoideos/rabdoideos atípicos.

Los **tumores supratentoriales** son los siguientes: **a)** Astrocitomas cerebrales hemisféricos de grado bajo (de grado 1 [pilocíticos] o de grado 2); **b)** Astrocitomas de grado alto o malignos (astrocitomas anaplásicos, glioblastomas multiformes [de grado 3 o de gado 4]). **c)** Gliomas mixtos (de grado bajo o de grado alto); **d)** Oligodendriomas (de grado bajo o de grado alto). **e)** TNEP (neuroblastomas cerebrales, pineoblastomas y ependimoblastomas); **f)** Tumores teratoideos/rabdoideos atípicos;

g)Ependimomas(celulares o anaplásicos); **h)**Meningiomas; **i)**Tumores del plexo coroides (papilomas y carcinomas); **j)**Tumores del parénquima pineal (pineocitomas, tumores mixtos del parénquima pineal y tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia); **k)**Tumores neuronales y tumores gliales neuronales mixtos (gangliogliomas, gangliogliomas desmoplásicos infantiles y tumores neuroepiteliales disembríoplásicos); **l)**Metástasis (poco frecuentes) de neoplasias malignas extraneurales.

Los **tumores selares y supraselares** son los siguientes: **a)**Craneofaringiomas; **b)**Astrocitomas diencefálicos (tumores centrales que comprometen el quiasma, el hipotálamo o el tálamo) que son generalmente de grado bajo (incluidos los astrocitomas de grado 1 [pilocítico] o de grado 2); **c)**Tumores de las células germinales (germinomas o tumores no germinomatosos).

Sin embargo, está en constante aumento el uso del análisis inmunohistoquímico, los hallazgos citogenéticos y genéticos moleculares, así como las mediciones de la actividad mitótica; este incremento del uso probablemente altere la clasificación y la nomenclatura en el futuro.

Tumores con diseminación vía líquido cefalorraquídeo

Ependimomas

Los ependimomas representan del 2-9% de los tumores neuroepiteliales, representan del 6-12% de los tumores intracraneales en edad pediátrica y más del 30% en niños menores de 3 años de edad. Se presentan desde 1 mes hasta los 81 años de edad; sin embargo su incidencia depende del tipo histológico y su localización. Los ependimomas infratentoriales predominan en niños con una media de edad de 6.4 años y un rango de edades entre los 2 meses y 16 años de edad. Un segundo pico se presenta entre los 30 y 40 años de edad. Los tumores supratentoriales afectan a edad pediátrica y adultos. Afectan a ambos sexos por igual⁷.

Estos tumores se observan en cualquier sitio del sistema ventricular y el canal espinal. Principalmente se localizan en el cuarto ventrículo y médula espinal, seguido de los ventrículos laterales y el tercer ventrículo. Tienen acceso hasta el líquido

cefalorraquídeo (LCR). Por lo tanto, estos tumores se pueden diseminar por todo el eje cerebromedular, aunque la diseminación solo se nota en menos de 10% de los pacientes con ependimomas de grado II o grado III⁸.

Se debe evaluar a cada paciente de ependimoma con imagenología diagnóstica por resonancia magnética (RMN) con gadolinio para detectar metástasis a columna vertebral y cerebro⁹.

Los determinantes moleculares de los desenlaces de los ependimomas recién se están identificando. En los estudios se identificaron numerosas aberraciones cromosómicas y cambios genéticos moleculares relacionados. La ganancia de 1q25, la sobreexpresión de EGFR, la expresión de hTERT, las concentraciones altas de nucleolina, la activación de la vía Notch o Tenascina C, y otros se relacionaron con un pronóstico más precario¹⁰.

Los ependimomas ocupan el 2º lugar después de los meduloblastomas en radiosensibilidad. La radioterapia se administra posterior a la resección quirúrgica, dosis de 45-48 Gy (recurrencia tratada con dosis adicional 15-20 Gy). Mejorando la tasa de supervivencia a 2 años hasta en el 50% de los casos, y a 5 años en el 20-40%¹¹.

Tumores embrionarios de Sistema Nervioso Central

La clasificación histopatológica de los tumores embrionarios de sistema nervioso central (SNC) aún es controversial: se ha propuesto que éstas neoplasias se clasifican dentro del denominado grupo de tumor neuroectodérmico primitivo, sin embargo tumores histológicamente similares que se encuentran en localizaciones diferentes del SNC, presentan diversas alteraciones genéticas¹².

Meduloblastoma

Los meduloblastomas se originan a partir de células granulares del cerebelo cerca del techo del cuarto ventrículo. Se pueden diseminar por contigüidad hacia el pedúnculo cerebelar, a lo largo del piso del cuarto ventrículo, hacia la médula cervical o cerca del tentorium¹³.

En el momento del diagnóstico existe una diseminación a través del líquido cefalorraquídeo hacia otros sitios intracraneales, la médula espinal, o ambos en el 20-30% de los pacientes¹².

Es obligado que en los pacientes de reciente diagnóstico se realice estudio de neuroimagen y citología de LCR para determinar la extensión de la enfermedad.

Los factores de riesgo que influyen en la evolución natural de esta tumoración incluyen: la ploidía celular, la expresión del receptor de neurotrofina-3 (TrkC), expresión del MYCC y/o ERBB2, delección del p17, sobreexpresión del PDGF, expresión del p53 y survivina^{14,15}.

Asimismo en estudios retrospectivos se ha determinado que el pronóstico de la enfermedad se relaciona con la variedad celular, anaplasia y desmoplasia y sobre todo la presencia de diseminación en neuroeje^{16,17}.

Pineoblastomas

Es un tumor embrionario maligno primitivo de la glándula pineal, que afecta principalmente al grupo en edad pediátrica, frecuentemente asociado con diseminación vía LCR. Se compone de capas gruesas de células pequeñas con núcleos redondos de contorno irregular y escaso citoplasma. En cuanto a la incidencia los pineoblastomas son raros, constituyen aproximadamente el 40% de los tumores parenquimatosos de la región pineal. Se presentan a cualquier edad, pero la mayoría se presenta en las primeras dos décadas de vida con una media de edad de 18.5 años; sin predominio de género. La media de supervivencia varía de 24 a 30 meses^{18,19}.

En el estudio de neuroimagen en la RMN se observa una imagen heterogénea hipo o isoíntensa^{20,21}. Es un tumor potencialmente agresivo, con siembra a líquido cefalorraquídeo^{22,23}.

La extensión de la enfermedad al momento del diagnóstico mediante detección vía LCR o RMN, determina la supervivencia del paciente. La extensión de la resección y la radioterapia determina el pronóstico²⁴. Siendo las metástasis a SNC y columna vertebral la principal causa de muerte²⁵. En ocasiones, el tumor pineal permanece asintomático y se detecta como hallazgo incidental en estudios de imagenología; en estos casos el pronóstico mejora.

El inmunofenotipo de los pineoblastomas está determinado por marcadores entre los que se encuentran receptores neurogénicos de la glía. Positividad para sinaptofisina, tubulina- β III y cromogranina A^{26,27}.

Tumores de células germinales

Los tumores de células germinales son morfológica e inmunofenotípicamente homólogos a tumores gonadales y otros tumores de células germinales extraneuroaxiales. Según la Organización Mundial de la Salud del 2007, se clasifican: a) Germinomas; b) Teratomas; c) Teratomas maduros; e) Teratoma con transformación maligna; f) Tumor del saco de Yolk; g) Carcinoma embrionario; y h) Coriocarcinoma. La incidencia varía de acuerdo a la situación geográfica. En occidente, éstas neoplasias constituyen del 0.3-0.6% de los tumores primarios intracraneales, y aproximadamente del 3-4% de éstos afectan a niños^{28,29,30}.

Aproximadamente el 80% de los tumores de células germinales de SNC afecta a sujetos menores de 25 años de edad, con un pico de incidencia entre los 10-14 años de edad, y predomina principalmente en varones^{31,32,33}.

La proporción con la que se presenta en varones:mujeres varía de acuerdo a la localización e histología del tumor. Mientras que la mayoría de los tumores de la región pineal predominan en varones; los tumores supraselares de células germinales son más frecuentes en mujeres.

Como otros tumores de células germinales extragonadales, las variantes de SNC afectan principalmente la línea media: 80% o más se desarrolla en estructuras cerca del tercer ventrículo, siendo la región de la glándula pineal el principal sitio de origen, seguido del compartimento supraselar³⁴. Otros sitios pueden ser la región intraventricular, periventricular difusa, ganglios basales, tálamo, intramedular e intraselar.

Los hallazgos de imagenología son inespecíficos^{35,36}. En la RMN se observan como masas sólidas iso o hipertensas similares a la materia gris; también existen hallazgos como hidrocefalia, invasión a estructuras vecinas y metástasis óseas vía LCR; éstas últimas se visualizan como zonas lineares o nodulares que se extienden sobre la superficie ventricular o en el espacio subaracnoideo.

Tratamiento

Al momento actual se han logrado avances importantes en el tratamiento de los tumores cerebrales del SNC logrando supervivencia en el 60% de ellos³⁷. Sin embargo el 40% de ellos aún queda sin responder al tratamiento convencional; es de especial

importancia mencionar que estos tumores, ya referidos, presentan recaídas inclusive después de 5 años suponiendo que al inicio de la vigilancia de éstos, pudieran existir células malignas a nivel microscópico (EMR) que posteriormente terminarían desarrollando un tumor a neuroeje o SNC.

Entre 1975 y 2002, la mortalidad infantil por cáncer disminuyó en más de 50%. Si bien más del 70% de los niños a los que se diagnostican tumores cerebrales sobreviven más de cinco años a partir del diagnóstico, las tasas de supervivencia varían ampliamente según el tipo de tumor y el estadio. Por ejemplo, en el caso de los endimomas la tasa de supervivencia a 5 años es del 20-30%; y el riesgo de recurrencia aumenta cuando se realiza resección parcial³⁷.

En cuanto los meduloblastomas se reporta pobre pronóstico en menores de 4 años de edad: sin datos de tumor residual en RMN o LCR negativo tienen una sobrevida de 5 años en el 75% de los casos; aquellos con tumor residual o diseminación a cerebro o médula espinal la sobrevida a 5 años sólo es del 35-50%¹¹. Son comunes las secuelas a largo plazo relacionadas con la presencia inicial del tumor y el tratamiento posterior.

Técnicas de estudio de la enfermedad mínima residual

Los métodos de estudio para detectar Enfermedad Mínima Residual (EMR) deben cumplir ciertos requisitos para poder ser considerados útiles. Dichos requisitos incluyen una elevada sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y aplicabilidad de la técnica. Los procedimientos que actualmente cumplen estos requisitos son la inmunofenotipificación por citometría de flujo, la inmunocitología y la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real³⁸.

En el momento actual el mayor conocimiento, tanto de los marcadores inmunológicos (inmunofenotipo), con la utilización de una amplia batería de anticuerpos monoclonales, así como de las alteraciones cromosómicas analizadas a través de técnicas de citogenética o biología molecular (FISH y RT-PCR), han permitido profundizar en el concepto de remisión en diferentes cánceres infantiles mediante el estudio de la EMR³⁹.

Citometría de flujo

Tecnología utilizada para analizar y definir el perfil inmunofenotípico de las células neoplásicas y establecer así la presencia de fenotipos aberrantes. Se utiliza principalmente en leucemias. Se basa en la *aplicación de anticuerpos monoclonales específicos, dirigidos contra proteínas de membrana o intracitoplasmáticas, que llevan apareado un fluorocromo para su detección y visualización* mediante un sistema informático apropiado. Posee una sensibilidad superior a 1×10^{-4} , es decir, es capaz de detectar una célula tumoral entre 10,000 células normales⁴⁰.

Inmunocitología

El objetivo de esta técnica es la identificación de estructuras antigénicas que permitan detectar células neoplásicas en un tejido (médula ósea, sangre periférica y/o productos de aféresis), mediante anticuerpos monoclonales “tumores específicos”⁴¹. Se utiliza principalmente en neuroblastoma. Posee una sensibilidad de 1×10^{-5} .

En diferentes estudios se ha observado que la detección de gangliósidos GD2 (utilizando anticuerpos monoclonales anti-GD2), es muy útil para la detección de EMR, viendo que si es positiva se relaciona fuertemente con la progresión de la enfermedad. Los anti-GD2 se fijan a la membrana de la célula tumoral y permiten identificar células aisladas en una suspensión células en médula ósea (MO) o sangre periférica (SP)⁴².

FISH (Hibridación in situ con fluorescencia)

Técnica molecular que utiliza sondas de ADN marcadas con fluorocromos, que ponen de manifiesto la presencia o ausencia de un determinado fragmento genético, así como su localización cromosómica. Mediante un microscopio de fluorescencia se capta la imagen de la señal y la célula. Esta metodología puede aplicarse tanto en núcleos interfásicos como directamente en cromosomas. Puede hallar alteraciones cromosómicas específicas muy por debajo del nivel de detección de los estudios citogenéticos de bandeado tradicionales⁴³.

RT-PCR (Transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de polimerasa)

La PCR es una técnica molecular que permite amplificar secuencias específicas de ADN o ARN expresadas en las células tumorales, multiplicando por 100 el número de copias que podemos obtener de un determinado fragmento de ADN⁴³. Con la RT-PCR,

se puede analizar el ARN de transcripción expresado en dichas células. Esto nos permite el estudio de los genes alterados por traslocaciones primarias y de otros genes característicos asociados a determinados tipos de tumor. En la monitorización de la EMR es importante la cuantificación de ésta mediante la RT-PCR en tiempo real, de manera que la comparación de su nivel de amplificación con los estándares adecuados, proporciona una medida cuantitativa del grado de afectación. Posee una sensibilidad que se sitúa entre 1×10^{-5} y $1 \times 10^{-6(41)}$.

La detección de EMR midiendo el GD2 por RT-PCR utiliza células mononucleares criopreservadas y puede reproducirse en múltiples ocasiones y para múltiples marcadores.

La síntesis de los GD2 depende de la enzima GD2 sintetasa, cuyo RNA-m supone un potencial marcador tumoral de EMR analizada mediante RT-PCR. El papel de la monitorización de la GD2 sintetasa resulta de gran utilidad debido a que el GD2 se expresa homogéneamente en todos los estadios del TNEP.

JUSTIFICACION

Debido a los avances en el tratamiento de niños con cáncer, actualmente se ha incrementado la supervivencia a 5 años. Al momento actual, la respuesta tumoral y la evolución de los pacientes con un tumor cerebral se evalúa mediante un estudio de resonancia magnética, y un estudio citomorfológico de LCR. Sin embargo el primer estudio solamente evalúa aspectos macroscópicos de la tumoración y deja inadvertido por completo aspectos microscópicos de la misma, y en segundo se evalúa solamente por microscopía de luz la presencia de células neoplásicas en LCR. Por esta razón resulta necesario la realización de este estudio debido a que permitirá detectar la presencia de células neoplásicas residuales mediante citometría de flujo para evaluar más a fondo la presencia de células neoplásicas en LCR, y por ende permitirá replantear los criterios para definir el cese del tratamiento; o bien en caso de detectarse incremento de la enfermedad mínima residual posterior a cada curso de quimioterapia, marcará la pauta para determinar falla terapéutica y poder modificar el tratamiento disminuyendo con esto el riesgo de recaídas en los pacientes.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las últimas décadas, los avances en quimioterapia y radioterapia han mejorado de forma considerable las posibilidades de supervivencia de los niños afectados de patología oncológica. Sin embargo, el riesgo de recurrencia continúa siendo un obstáculo importante para su curación. La determinación de enfermedad mínima residual es de suma importancia para poder determinar si la enfermedad ha sido realmente erradicada o requiere un incremento en las dosis o cursos de quimioterapia, o cambio de esquemas de tratamiento.

En este sentido, la detección de enfermedad mínima residual (EMR) constituye un procedimiento de gran interés con objeto de adecuar los requerimientos terapéuticos y evaluar la trascendencia pronóstica.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿La Citometría de Flujo en líquido cefalorraquídeo es un método útil para evaluar la evolución de pacientes con tumores embrionarios cerebrales, así como determinar la presencia de enfermedad mínima residual?

OBJETIVOS

Objetivo general:

Cuantificar la respuesta microscópica al tratamiento mediante detección de enfermedad mínima residual por Citometría de flujo en paciente con meduloblastomas, ependimomas, pineoblastomas y tumores germinales de la región pineal.

Objetivos específicos:

1. Determinar mediante citometría de flujo la reducción del número de células tumorales posterior a cada curso de quimioterapia.
2. Identificar la persistencia o no de enfermedad mínima residual después de seis cursos de quimioterapia.
3. Asociar los resultados obtenidos por citometría de flujo y citomorfológico de los pacientes con tumores embrionarios cerebrales.

HIPÓTESIS

Existirá una disminución exponencial de al menos 20% posterior a cada curso de quimioterapia en el conteo de células neoplásicas en LCR por Citometría de flujo.

1. Existirá una disminución de más del 80% de las células neoplásicas determinada por citometría de flujo posterior al cuarto curso de quimioterapia.
2. Se detectará en al menos 20% de estos pacientes enfermedad mínima residual, posterior a haber terminado tratamiento, (lo cual es causa de una futura recidiva en los pacientes).
3. Existirá una asociación menor del 40% entre citometría de flujo y citomorfológico en los pacientes con tumores embrionarios de sistema nervioso central.

MÉTODO

A) Universo y muestra

La población que se examinó, estuvo constituida por pacientes con tumores embrionarios cerebrales: ependimomas, meduloblastomas, y tumores germinales de la región pineal, los cuales se diseminan por líquido cefalorraquídeo, que fueron diagnosticados en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI entre diciembre del 2010 y febrero del 2011.

Tipo de estudio

Estudio observacional, prospectivo, longitudinal, constituido por una cohorte de pacientes que se caracterizaron porque presentaron diseminación de su enfermedad a nivel de neuroeje y líquido cefalorraquídeo pudiéndose cuantificar éstas células a este nivel mediante la toma de líquido por punción lumbar.

B) Criterios de inclusión, no inclusión y eliminación

Criterios de inclusión

- Pacientes de cualquier sexo, entre 1 y 17 años de edad.
- Pacientes con diagnóstico histopatológico de ependimoma, meduloblastoma y tumores germinales de la región pineal, realizado durante el periodo comprendido entre diciembre del 2010 y febrero del 2011.
- Expediente completo para establecer curso clínico de la enfermedad.
- Pacientes que completaron seis cursos de quimioterapia en esta unidad (para poder determinar la curva de reducción de células tumorales posterior a cada curso).
- Pacientes que cumplieron seis meses de seguimiento en tratamiento.

Criterios de eliminación

- Pacientes con expediente incompleto.
- Muestra de líquido cefalorraquídeo insuficiente para la determinación de enfermedad mínima residual por Citometría de flujo.

C) Desarrollo del estudio

Todos los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión ingresaron al estudio. Una vez realizado el diagnóstico histopatológico de su tumoración recibieron esquema de quimioterapia y radioterapia protocolizada para cada tipo de tumor (ver Anexo).

A cada paciente se le realizó punción lumbar para obtención de líquido cefalorraquídeo previo cada curso de quimioterapia la cual se administró cada 28 días. Se obtuvo 1mL en cada punción (por médico residente de oncología), posterior a lo cual se procedió a procesar la muestra por Citometría de flujo para determinación cuántica de células malignas. Se obtuvo una alícuota para revisión del citomorfológico por patólogo ciego al estudio.

Todos los gastos fueron cubiertos por el presupuesto y equipo del Laboratorio de Tumores Cerebrales del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI. Debe comentarse que la realización de punción lumbar a los pacientes con tumores de SNC se realiza como estudio de rutina para búsqueda de células neoplásicas en LCR por el servicio de Patología; dado que realizamos punciones propias del protocolo en el manejo de estos pacientes no se requirió de hoja de consentimiento informado.

El protocolo cuenta con número de aprobación del Comité Local de Investigación No. R-2010-3603-48.

Metodología para determinar número de células tumorales por Citometría de flujo

Para cada tubo se tomó una muestra de líquido cefalorraquídeo al diagnóstico del paciente y posterior a cada curso de quimioterapia durante los primeros 4 cursos, y se cuantificó por Citometría de flujo el número de células neoplásicas a través de marcaje por medio del anticuerpo monoclonal específico: **Bcl-2** para **Tumores Germinales, Ependimomas, y Meduloblastomas.**

La medición de otros anticuerpos monoclonales como gangliósido 2, EGFR, ERBB-2 y C-myc no se realizó debido a que no se pretendía evaluar la viabilidad celular ni la variabilidad tumoral.

Preparación de muestra para su lectura en citómetro

Para cada tubo se debió tomar en cuenta una población muestra no mayor a 10,000 células por microlitro, en caso necesario se realizó dilución con solución salina para ajustar la concentración entre 5,000 y 10,000 células por microlitro.

Si se tenía una población menor a 5,000 células por microlitro se utilizaron 200 microlitros de muestra.

Si se tenía una población mayor a 6,000 células por microlitro se utilizaron 100 microlitros de muestra.

- Si el anticuerpo era marca DB se aplicaron sólo 5 microlitros, caso contrario 20 microlitros.
 - Si el anticuerpo era **intracelular** se aplicó la técnica de permeabilización a la muestra después de haber decantado (*Bcl2*, *Tdt*, *Mpo*, *Cd3*, *Cd79a*).
1. Se etiquetó el tubo con líquido cefalorraquídeo, se aplicaron marcadores o anticuerpo de acuerdo al tipo de neoplasia y después la muestra de acuerdo al número de población por microlitro.

Reacción antígeno-anticuerpo

Se esperó de 15 a 20 minutos en oscuridad (evitando luz solar) entre 2°C a 8°C y/o temperatura ambiente.

2. Para lisar se aplicó 2 mililitros de solución Lisis y esperó entre 5 a 7 minutos.
3. Para aforar se aplicó 2 mililitros de solución salina isotónica o PBS o FACSFlow (lavado de células).

Se realizó la determinación de células neoplásicas por medio del citómetro de flujo Scalibur.

4. Se centrifugó a 3000 rpm durante tres minutos a una temperatura entre 19°C y 25°C, se decantó (tirar en la tarja parte líquida y secar). Agregó solución salina isotónica 1 mililitro.
- Para anticuerpos intracelulares se permeabilizó con solución permeabilizadora 100 microlitros y mezcló, dejando reposar (incubar) por 7 minutos.
 - Se agregó solución salina, centrifugó, para este paso la muestra se había permeabilizado.
 - Se aplicó 5 microlitros de anticuerpo y dejó reposar por 15 a 20 minutos, agregando solución salina 2 mililitros.
 - Se centrifugó y decantó, se agregó solución salina 1 mililitro.
5. Se obtuvo la muestra y se realizó el análisis de células problema.⁴⁴

Metodología para determinar presencia de células tumorales por citomorfológico

1. Se preparó frotis en dos portaobjetos aplicando 0.5mL de muestra de líquido cefalorraquídeo.
2. Se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos a una temperatura entre 20°C y 24°C, se fijó en etanol del 96° durante cinco minutos. Se colocaron las dos laminillas en una canastilla.
3. Se tiñó en hematoxilina de Hallis, filtrada reciente, de 6 a 15 minutos. Posteriormente se lavaron las laminillas en agua corriente por 5 minutos.
4. Se diferenció en etanol ácido al 1%, 1 a 2 remojones, y posteriormente se lavó en agua corriente por 5 minutos.
5. Se colocaron las láminas en una solución débil de agua amoniacal hasta que las secciones se veían color azul brillante, y se enjuagó en agua corriente por 10 minutos.
6. Se contrastó en la solución de eosina por dos minutos, y posteriormente se lavó en agua corriente.
7. Se deshidrató y aclaró a través de dos cambios de etanol del 96° cada uno, y posteriormente dos cambios de etanol absoluto.
8. Se realizó diez baños en alcohol xilol 50% y 50%. Posteriormente se aplicó diez baños en xilol.
9. Se montó en medio resinoso y una vez preparada la laminilla, estaba lista para observarse al microscopio. Se observó de color azul el núcleo y de color rosado o rojo el citoplasma⁴⁵.

D) Definición y clasificación de las variables

Definición operativa de las variables

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	UNIDADES DE MEDICIÓN	CONTROL
Sexo	Independiente	Cualitativa: Nominal	Características fenotípicas que califican al sujeto en femenino o masculino	Sexo Fenotípico	Femenino Masculino	Fenotipo genital
Edad	Independiente	Cuantitativa: Continua	Tiempo de vida en meses	Edad cumplida en meses	Meses	Fecha de nacimiento
Localización del tumor	Independiente	Cualitativa: Nominal	Localización intracraneal del tumor	Sitio en el que se encuentra el tumor en el cráneo	Infratentorial Supratentorial Glándula pineal	Estudio de imagen: RMN cráneo
Enfermedad mínima residual por citometría de flujo	Dependiente	Cuantitativa: Continua	Detección de células tumorales mediante marcaje de anticuerpos monoclonales detectados por inmunofluorescencia	Conteo de células posterior a cada curso de quimioterapia.	Porcentaje	Conteo celular por CMF inicial, posterior al 2º curso de quimioterapia, posterior al 4º curso de quimioterapia, y posterior a 6º curso de quimioterapia
Enfermedad mínima residual por citomorfológico	Dependiente	Cualitativa: Nominal	Detección de células tumorales mediante técnica histórica de tinción hematoxilina-eosina	Determinación de células posterior a cada curso de quimioterapia	Positivo Negativo	Determinación de células por citomorfológico inicial, posterior al 2º curso de quimioterapia, posterior al 4º curso de quimioterapia, y posterior a 6º curso de quimioterapia

E) Cálculo de tamaño de muestra

Por conveniencia. Se incluyeron a todos los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión diagnosticados en el período de estudio.

F) Plan de análisis estadístico

Se realizó análisis con estadística descriptiva utilizando mediana, y valores de mínimo y máximo.

Se compararon las medianas de las tres determinaciones (basal, posterior a 2º curso de quimioterapia, y posterior a 4º curso de quimioterapia) con prueba de Friedman.

Se encontraron diferencias entre las mediciones de células neoplásicas cuantificadas por citometría de flujo y detectadas por citomorfológico, (entre la basal y segunda determinación; la segunda y tercera determinación; y entre la basal y tercera determinación) analizadas mediante prueba de Wilcoxon.

Se analizó la detección de enfermedad mínima residual determinada por citomorfológico y citometría mediante Exacta de Fisher.

RESULTADOS

En el presente estudio se incluyeron un total de 20 pacientes, de los cuales 5 fueron eliminados por no contar con los valores completos posterior al segundo y cuarto curso de quimioterapia.

De los 15 pacientes restantes, 9 fueron masculinos (60%) y 6 femeninos (40%) con una relación M:F de 1.5:1. La mediana de edad fue de 105.5 meses, con edades que fluctuaron entre los 19 a 192 meses.

De los tipos de tumores embrionarios de SNC fue equitativo, el 33.33% fueron ependimomas (5 pacientes), 33.33% meduloblastomas (5 pacientes), y 33.33% tumores germinales mixtos (5 pacientes). En cuanto a su localización a nivel supratentorial 2 pacientes (13.33%), infratentorial 8 pacientes (53.33%), y en glándula pineal 5 pacientes (33.33%).

Los resultados de la citometría de flujo mostraron que en la determinación inicial, 11 pacientes (73%) no presentaron células neoplásicas, mientras que en la segunda determinación (post 2º curso de quimioterapia) sólo cinco pacientes (33%) fueron negativos. En la tercera determinación (post 4º curso de quimioterapia) cuatro pacientes (26%) fueron negativos. Hasta el momento sólo cinco pacientes cuentan con celularidad normal por citometría. (Tabla 1)

La mediana de celularidad por citometría de flujo en la determinación basal fue de cero; en la segunda determinación fue de 79.5%; posterior al cuarto curso de quimioterapia la mediana de celularidad fue de 203.5%, y en la última determinación la mediana de celularidad fue de 399%. Tomando en cuenta hasta la tercera determinación, cinco pacientes no presentaron ningún cambio en la celularidad (cuatro de ellos permanecieron con celularidad negativa y uno persistió con 500%). Sólo un paciente disminuyó la celularidad posterior al segundo curso de quimioterapia, persistiendo con el mismo nivel posterior al cuarto curso). Seis pacientes incrementaron su cuenta de células neoplásicas, de los cuales cuatro incrementaron progresivamente la cuenta de células tumorales, mientras que dos de ellos sólo incrementaron en una de las determinaciones. Tres pacientes tuvieron un incremento inicial de celularidad posterior

al segundo curso de quimioterapia, pero posteriormente disminuyeron sus cifras. (Tabla 2)

Respecto a los resultados del citomorfológico, en la determinación inicial, 13 pacientes fueron reportados como negativos (87%), 14 fueron negativos en las segunda y tercera determinaciones (93% respectivamente), y los cuatro pacientes de la última determinación fueron reportados como negativos (100%).

De los 15 pacientes estudiados en forma inicial, once fueron negativos por ambos métodos, mientras que dos pacientes fueron positivos por citometría de flujo habiendo sido reportados como negativos por citomorfológico, y dos pacientes fueron reportados como positivos por ambos métodos (Exacta de Fisher $p=0.057$). Trece de quince determinaciones concordaron (86%).

Posterior al segundo curso de quimioterapia (2ª determinación), cinco pacientes coincidieron con ambas determinaciones negativas, y uno con ambas determinaciones positivas. Nueve pacientes reportados por citometría de flujo como positivos fueron reportados por citomorfológico como negativos (Exacta de Fisher $p=0.667$). Seis de quince determinaciones concordaron (40%).

Posterior al cuarto curso de quimioterapia (3ª determinación), cuatro pacientes tuvieron determinación negativa por ambos métodos, y un paciente positiva por ambos métodos. Diez pacientes tuvieron determinación positiva por citometría de flujo y negativa por citomorfológico (Exacta de Fisher $p=0.733$). Cinco de quince determinaciones concordaron (33%). (Tabla 3)

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los rangos de las tres determinaciones (Friedman $p=0.011$), encontrando que la diferencia se encuentra entre las determinaciones de la fase basal y posterior al cuarto curso de quimioterapia (Wilcoxon $p=0.022$). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre la primera y la segunda medición (Wilcoxon $p=0.51$), ni entre la segunda y tercera mediciones (Wilcoxon $p=0.441$).

En 11 pacientes, se encontró incremento en la determinación de células neoplásicas por Citometría de flujo, CORRELACIONANDO CON LA IMAGEN por RMN en 8 pacientes (72%); en la cual también se pudo establecer asociación con enfermedad diseminada macroscópica tanto al encéfalo como al neuroeje. (Tabla 4)

A la fecha dos pacientes han fallecido (paciente 2 y paciente 6). El primero se trata de un paciente adolescente masculino con diagnóstico de ependimoma anaplásico parieto-temporal izquierdo, con resección parcial del tumor en 2005, que presentó progresión tumoral en 2009, nuevamente resecado por cirugía. Por citomorfológico permaneció positivo en las tres determinaciones, y por citometría de flujo se mantuvo con una celularidad de superior a 500 en las tres determinaciones.

El segundo paciente se trata de un escolar femenino con diagnóstico de ependimoma anaplásico parieto-temporal izquierdo, con resección parcial del tumor en 2009 con progresión tumoral, resecado en una segunda ocasión en 2010. Por citomorfológico permaneció negativo en las tres determinaciones, y por citometría de flujo se mantuvo con una celularidad de 0 en la primera determinación y superior a 300 en las dos últimas determinaciones.

Cabe mencionar, que ambos pacientes recibieron quimioterapia con ifosfamida, carboplatino, etoposido en la recaída.

DISCUSIÓN

Las neoplasias en los menores de 15 años representan entre 1% y 5% del total de las neoplasias en la población con cáncer, por lo que existen razones importantes que justifican su investigación.

En lo particular los tumores del sistema nervioso central son los tumores sólidos más comunes en los niños, siendo responsables de más de 500 casos nuevos por año en México. Es por ello imperante su estudio, desde aspectos que contemplen el abordaje diagnóstico hasta el establecimiento de diversas pautas terapéuticas en cuanto al curso de quimioterapia y manejo con radioterapia se refiere. Asimismo la evaluación del curso clínico de este tipo de neoplasias así como la manera en cómo las diferentes herramientas de intervención terapéutica modifican su evolución clínica y por ende su pronóstico son un importante aspecto que es necesario investigar.

A través de este estudio de investigación es posible establecer que el estándar de oro para determinar diseminación a neuroeje o persistencia tumoral cerebral en los pacientes pediátricos con tumores embrionarios del SNC **pudiera** ser la determinación de células neoplásicas mediante Citometría de flujo y no por estudio citomorfológico. Detectándose en el 60% de los pacientes disparidad en cuanto a los resultados reportados entre una y otra prueba diagnóstica, y por tanto encontrándose una mayor sensibilidad en la prueba para determinación de enfermedad mínima residual por la técnica de Citometría de flujo.

Por otra parte, debido a los avances en el tratamiento de niños con cáncer, actualmente se ha incrementado la sobrevida a 5 años. Apoya lo anteriormente expuesto, que la determinación del *Bcl-2*, un anticuerpo monoclonal intracitoplasmático y marcador de la vía apoptótica, permitirá identificar neoplasias más resistentes al manejo con quimioterapia, que precisan un tratamiento más agresivo.

Al mismo tiempo este hallazgo invita al médico oncólogo a establecer nuevas reflexiones sobre la importancia que tiene la evaluación simultánea de características macro y microscópicas de los tumores de sistema nervioso central, a través de las diferentes herramientas diagnósticas con las que hoy en día se cuentan, y con ello

establecer nuevas pautas terapéuticas que permitan mejorar el pronóstico de la enfermedad.

De igual manera cabe mencionar que actualmente la respuesta tumoral y la evolución de los pacientes con un tumor cerebral se evalúa mediante estudio de resonancia magnética y citomorfológico de LCR. Sin embargo, estas herramientas sólo evalúan aspectos macroscópicos y por microscopía de luz de la tumoración, dependiendo sólo del estudio citomorfológico de LCR para la evaluación de la enfermedad a nivel microscópico, y dejando inadvertida información más definitiva que en un momento dado determina la evolución clínica de la enfermedad. Fortalece lo anterior, los hallazgos encontrados en nuestro estudio en donde se aprecia una diferencia entre los resultados de imagenología y la información reportada mediante el citomorfológico de LCR, no así en los estudios del citómetro de flujo, donde existió una menor discordancia.

Aunque en el 72% hubo concordancia en el resultado en EMR determinada por Citometría de flujo y la imagen de RMN; debe recalcar que en el 28% de los pacientes restante, esto es, casi una tercera parte, mientras no se encontraba EMR por imagen de RMN si la existía mediante el estudio de Citometría de flujo. Lo cual sin duda, favorecerá que estos pacientes presenten una recaída tardía si no se establece una vigilancia estrecha en la cual deba considerarse el continuar o tal vez incrementar el esquema de quimioterapia inicialmente planteado, o intensificar la radioterapia en algunos casos.(Figura 3)

Por lo anterior es posible concluir que al momento actual el citómetro de flujo representa una herramienta de gran utilidad que permite detectar células neoplásicas residuales tras el término de cada curso de quimioterapia; con lo cual marcará la pauta para determinar falla terapéutica y por ende el poder modificar el tratamiento, disminuyendo con esto el riesgo de recaídas en los pacientes. Evidencia de lo expuesto, es el hallazgo detectado en nuestra investigación en el que el 73.33% de los pacientes presentó enfermedad mínima residual tras el término de 4 meses de quimioterapia, lo que obliga su vigilancia estrecha por medio del conteo celular por Citometría de flujo.

Debe mencionarse como muy preocupante, el que de 11 pacientes que tuvieron positividad en el estudio de Citometría, sólo correlacionó con un paciente que fue detectado como positivo en el estudio citomorfológico de LCR, lo que deja pensar que muy posiblemente aquellos pacientes con resultado negativo, en algún momento presentarán resultado positivo en citomorfológico.

Evidentemente pueden existir resultados falsos negativos, pero muy difícilmente falsos positivos dado que éste marcador intracitoplasmático detecta alteraciones de la vía de la apoptosis en células cancerosas. Esto es, no tan sólo se detectan células neoplásicas, sino además aquellas que están alteradas en la vía apoptótica con alto potencial de malignidad.

No cabe duda que aún quedan varias áreas por investigar debido a que actualmente sólo se cuenta con estudios de investigación en los que se utilizan otras técnicas biomoleculares y de citogenética cuya sensibilidad es menor a comparación con la Citometría de flujo. Lo cual limita la información que hoy día se tiene en nuestro país sobre enfermedad mínima residual. Es por esta razón necesario continuar esta línea de investigación con el fin de determinar no sólo anticuerpos monoclonales exclusivos de tumores de SNC, sino también marcadores de membrana e intracitoplasmáticos que intervengan en las vías apoptóticas de otro tipo de neoplasias tales como leucemias y linfomas.

Un claro ejemplo de lo anterior, es, como se mencionó anteriormente el empleo ya generalizado del estudio por Citometría de flujo en los niños portadores de una leucemia aguda, donde de manera rutinaria se realiza éste estudio al momento de finalizar el tratamiento con el fin de evaluar un inicio de vigilancia.

Es muy importante recordar que al momento actual la Citometría de flujo ha tenido un rol como diagnóstico en los pacientes con leucemias y linfomas, determinando el linaje celular, identificando las leucemias con linaje ambiguo, identificando las leucemias con anormalidades genéticas recurrentes, y de manera muy importante el gen de fusión *bcr-abl*, que determina el cromosoma Philadelphia, y que obliga a estos pacientes a hacer tratados con una droga muy específica que es un anticuerpo antimonoclonal.

También han servido como pronóstico, analizando el contenido del DNA de células leucémicas y sobre todo monitoreando EMR⁴⁶.

En tumores sólidos no se realiza de manera rutinaria pero estudios recientes han mostrado utilidad del citómetro de flujo en neuroblastoma y sarcoma de Ewing.

Como pronóstico en tumores sólidos el estudio del DNA ha sido usado en tumores intraespinales e intracraneales de manera inespecífica, y también algunos sarcomas sinoviales, y también determinando los niveles de factores de crecimiento endotelial vascular en pacientes con sarcoma de Ewing que han invadido la médula ósea mediante estudios de aspirado de médula ósea; sin embargo, nunca se ha utilizado como monitorización continua de búsqueda de células neoplásicas en LCR en pacientes con tumores cerebrales que diseminan a neuroeje, pero consideramos que este trabajo es de gran impacto e importancia dado que puede ser una guía muy fidedigna para dirigir un tratamiento o cambiar éste ante una respuesta no favorable microscópicamente detectada en un tumor cerebral.

Con respecto al punto anterior debe recordarse que el problema mayúsculo en los pacientes con tumores embrionarios en SNC, especialmente TNEP incluyendo meduloblastoma, es que presentan regularmente recaídas tardías que incluso pueden presentarse después de 10 años de vigilancia, al igual que los ependimomas. El punto es, cuántos de estos pacientes pudieron haber estado con enfermedad microscópica presente **no visualizada por estudios de RMN, no determinadas por citomorfológico de LCR, y que fueron erróneamente clasificados sin presencia de actividad tumoral, iniciándose vigilancia, y que posteriormente al paso de meses y años la desarrollaron.** Es justamente este grupo de pacientes en los cuales el estudio de Citometría de flujo en LCR toma un valor trascendental dado que finalmente se pudo haber evitado una recaída al intensificar, o bien al continuar más tiempo manejo de quimio y radio terapia.

Finalmente de lo que se trata el presente trabajo es establecer una forma de determinar EMR mediante un método muy sensible en niños con un tumor embrionario en SNC tanto en las diferentes fases de su tratamiento como en el inicio de su vigilancia.

CONCLUSIONES

1. Se encontró un aumento estadísticamente significativo en la celularidad neoplásica posterior a cuatro cursos de quimioterapia.
2. Cuatro pacientes permanecieron con celularidad negativa, y hubo descenso en el conteo de celularidad maligna en un paciente. Once pacientes (73.33%) tuvieron enfermedad mínima residual posterior a haber recibido seis cursos de quimioterapia.
3. No se encontró asociación entre el reporte del citomorfológico y la citometría de flujo.
4. Resulta imperativo el realizar de manera sistematizada este estudio en los pacientes con tumores embrionarios de SNC como evaluación del tratamiento y para determinar inicio de vigilancia.
5. A partir de este protocolo no será ético iniciar vigilancia en un paciente que tenga positividad en citometría, aún a pesar que de que en los estudios de neuroimagen no se detecte actividad tumoral; o bien, deberá evaluarse el monitorear de manera estrecha a éstos pacientes mediante la determinación de esta prueba durante los primeros meses posterior al inicio de la vigilancia.

ANEXO 1

TABLA 1. DETERMINACIÓN DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

		Frecuencia	Porcentaje
Determinación basal	Negativa	11	73.3
	Positiva	4	26.7
2ª Determinación	Negativa	5	33.3
	Positiva	10	66.7
3ª Determinación	Negativa	4	26.7
	Positiva	11	73.3

TABLA 2. COMPORTAMIENTO DE LA CELULARIDAD POR CITOMETRIA DE FLUJO Y CITOMORFOLÓGICO

PACIENTE	CMF 1	CITOMETRIA 1 (%)	CMF 2	CITOMETRIA 2 (%)	CMF 3	CITOMETRIA 3 (%)	RADIO-TERAPIA	ESTADO ACTUAL
1	-	0	-	0	-	0	+	Vivo
2	+	500	+	500	+	500	+	Falleció
3	-	0	-	0	-	0	-	Vivo
4	-	0	-	0	-	0	+	Vivo
5	-	21	-	366	-	1359	+	Vivo
6	-	0	-	300	-	300	+	Falleció
7	-	0	-	0	-	36.5	+	Vivo
8	-	0	-	346	-	107	+	Vivo
9	+	52	-	107	-	1007	+	Vivo
10	-	471	-	52	-	50	+	Vivo
11	-	0	-	663	-	365	-	Vivo
12	-	0	-	842	-	1182	+	Vivo
13	-	0	-	1689	-	430	-	Vivo, con progresión tumoral
14	-	0	-	40	-	1443	-	Vivo
15	-	0	-	0	-	0	+	Vivo
MEDIANA		0		79.5		203.5		

Citomorfológico (CMF) Valor expresado en Positivo (+) y Negativo (-).
 Citometría de flujo (CTM) Valor expresado en porcentaje (%).

TABLA 3. ASOCIACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LA CELULARIDAD TUMORAL DETERMINADO POR CITOMETRIA DE FLUJO Y CITOMORFOLÓGICO

	Citomorfológico			Exacta de Fisher
	Citometría	Negativo	Positivo	P
Determinación basal	Negativo	11	0	0.057
	Positivo	2	2	
2ª Determinación	Negativo	5	0	0.667
	Positivo	9	1	
3ª Determinación	Negativo	4	0	0.733
	Positivo	10	1	

TABLA 4. DETECCIÓN DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL POR CITOMETRIA DE FLUJO Y RESONANCIA MAGNÉTICA

PACIENTE	CMF1	CITOMETRIA 1(%)	CMF 2	CITOMETRIA 2(%)	CMF 3	CITOMETRIA 3(%)	RMN
1	-	0	-	0	-	0	
2	+	500	+	500	+	500	+
3	-	0	-	0	-	0	
4	-	0	-	0	-	0	
5	-	21	-	366	-	1359	+
6	-	0	-	300	-	300	+
7	-	0	-	0	-	36.5	-
8	-	0	-	346	-	107	+
9	+	52	-	107	-	1007	+
10	-	471	-	52	-	50	-
11	-	0	-	663	-	365	+
12	-	0	-	842	-	1182	+
13	-	0	-	1689	-	430	-
14	-	0	-	40	-	1443	+
15	-	0	-	0	-	0	

*Resonancia magnética (RMN) con presencia de lesión tumoral, valor expresado como Positivo (+) y Negativo (-).

FIGURA 1. COMPORTAMIENTO DE LA CELULARIDAD NEOPLASICA POR PACIENTE DETERMINADA POR CITOMETRIA DE FLUJO EN FORMA BASAL, POSTERIOR AL SEGUNDO CURSO DE QUIMIOTERAPIA Y POSTERIOR AL CUARTO CURSO DE QUIMIOTERAPIA

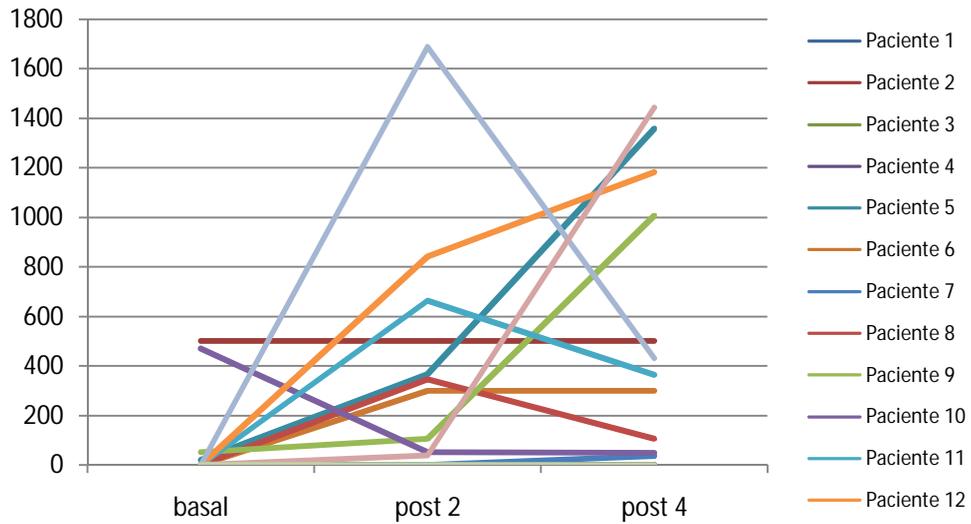


FIGURA 2. HISTOLOGIA DEL TUMOR DE ACUERDO AL SEXO DEL PACIENTE

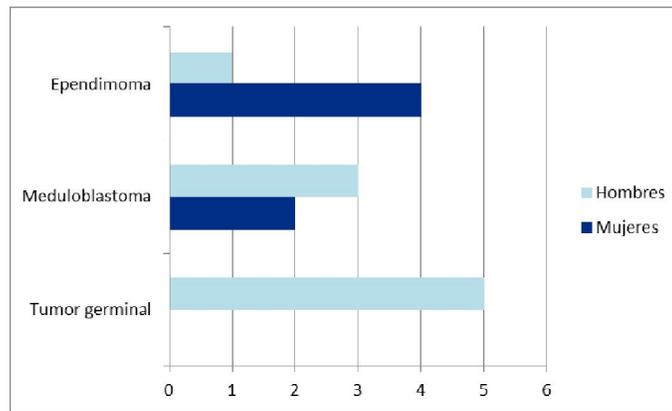
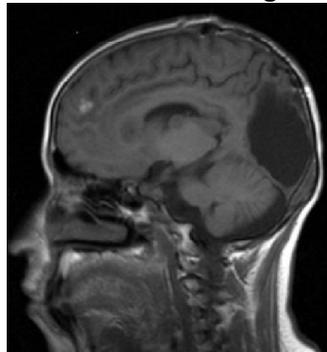


Figura 3. Ejemplo de correlación de imagen por RMN y citometría de flujo positiva en un paciente con tumor cerebral en donde el citomorfológico de LCR fue negativo.



ANEXO 2

Protocolos de Quimioterapia

Posterior a la cirugía, cada paciente recibirá el primer curso de quimioterapia de acuerdo a histología del tumor:

Meduloblastomas, Tumores germinales, Pineoblastomas y Ependimoma anaplásicos

Esquema de quimioterapia con carboplatino ($400\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$) diluido en solución salina 0.9% que se administrará durante una hora dosis única en día uno de tratamiento.

Ifosfamida ($2\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ en los días 1, 2 y 3) diluido en solución salina al 0.9% 200mL que se administrará por una hora.

Etopósido ($100\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$) en los días 1, 2 y 3 diluido en solución salina al 0.9% que se administrará por 1 hora) en cursos administrados cada 4 semanas por cuatro cursos. Cada paciente recibirá antieméticos (ondansetron $8\text{mg}/\text{m}^2$ por dosis cada 8 horas) simultáneo con la quimioterapia y 24 horas después de haberse completado el ciclo, hiperhidratación ($3000\text{mL}/\text{m}^2/\text{día}$ de dextrosa al 5% 2:1 salina normal) y protector de mucosa vesical (MESNA 100% de la dosis de ifosfamida cada 6 horas en días 1, 2 y 3).

Se dará seguimiento a 28 días de haber completado el cuarto curso de quimioterapia, y se someterá a radioterapia hiperfraccionada con dosis total de 54cGy, en dos fracciones de 1.1 cGy por día por 25 días. Posteriormente se administrarán seis cursos más del mismo esquema de quimioterapia.

Ependimomas clásicos

Estos pacientes recibirán esquema de quimioterapia con:

Cisplatino ($120\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$) diluido con manitol al 20% $300\text{mL}/\text{m}^2$ más solución salina al 0.9% $500\text{mL}/\text{m}^2$ pasar en 3 horas dosis única.

Etopósido ($100\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$) diluidos en $200\text{mL}/\text{m}^2$ de solución salina 0.9% pasar en 1 hora en los días 1, 2 y 3⁴⁷.

Los estudios de seguimiento incluyen resonancia magnética luego del segundo, cuarto y sexto curso de quimioterapia, así como determinación de EMR posterior a cada ciclo de quimioterapia en LCR obtenido mediante punción lumbar, y 4 semanas después de haber completado radioterapia, se evaluará la toxicidad con exámenes de función renal y biometría hemática luego de cada curso.

Previo a cada curso de quimioterapia se determinará el conteo celular neoplásico por citopatología. Este procedimiento se tiene que realizar en este tipo de paciente para evaluar la respuesta microscópica por citomorfología a través de microscopia de luz.

BIBLIOGRAFIA

- ¹Lanszkowsky P. Manual of Pediatric Hematology and Oncology. Elsevier, 4th edition; 2005; 519-525.
- ² Fajardo A, Mejía JM, Hernández L. Epidemiología descriptiva de las neoplasias malignas en niños. *Revista Panamericana de Salud Pública*; 1999; 6 (2).
- ³ Velázquez L, López AE, Fajardo A. Epidemiología de los tumores del sistema nervioso central en niños residentes del Distrito Federal. *Bol. Med Hosp Infant Mex* 1996; 53: 128-133.
- ⁴ Mueller B, Gurney JG. Epidemiology of pediatric brain tumors. *Neurosurg Clin N Am* 1992; 3:715–21.
- ⁵Pollack IF: Brain tumors in children. *N Engl J Med* 1994; 331 (22): 1500-1507.
- ⁶Kleihues P, Cavenee WK, eds.: Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2000.
- ⁷Kudo H, Oi S, Tamaki N, Nishida Y, Matsumoto S (1990). Ependymoma diagnosed in the first year of life in Japan in collaboration with the International Society for Pediatric Neurosurgery. *Childs Nerv Syst* 6: 375-378.
- ⁸Schiffer D, Chio A, Giordana MT, Migheli A, Palma L, Pollo B, Soffiotti R, Tribolo A (1991). Histologic prognostic factors in ependymoma. *Childs Nerv Syst* 7: 177-182.
- ⁹Furie DM, Provenzale JM (1995). Supratentorial ependymomas and subependymomas: CT and MR appearance. *J Comput Assist Tomogr* 19: 518-526.
- ¹⁰Santi M, Quezado M, Ronchetti R, Rushing EJ (2005). Analysis of chromosome 7 in adult and pediatric ependymomas using chromogenic in situ hybridization. *J Neurooncol*; 72: 25-28.
- ¹¹Greenberg M. *Handbook of Neurosurgery*. Thieme, 6th; 472.
- ¹²Denhner LP: Peripheral and central primitive neuroectodermal tumors. A nosologic concept seeking a consensus. *Arch Pathol Lab Med* 110 (11); 997-1005, 1986.
- ¹³Giangaspero F, Chieco P, Ceccarelli C, Lisignoli G, Pozuoli R, Gambacorta M, Rossi G, Burger PC (1991). "Desmoplastic" versus "classic" medulloblastoma: comparison of DNA content, histopathology and differentiation. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 418: 207-214.
- ¹⁴ Gilbertson RJ, Clifford SC (2003). PDGFRB is overexpressed in metastatic medulloblastoma. *Nat Genet* 35: 197-198.
- ¹⁵ Gilbertson RJ, Jaros E, Perry RH, Kelly PJ, Lunec J, Pearson AD (1997). Mitotic percentage index: a new prognostic factor for childhood medulloblastoma. *Eur J Cancer* 33: 609-615.
- ¹⁶López E, Sepúlveda A. Clinical and molecular Parameters for Risk stratification in Mexican Children with Medulloblastoma. *Arch. Med Res*, 2007; 38: 769-773.
- ¹⁷Zerbini C, Gelber RD, Weinberg D, et al: Prognostic factors in medulloblastoma, including DNA ploidy, *J Clin Oncol* 11 (4): 616-22, 1993. Tumores de región pineal Tumores germinales y pinealoblastomas.
- ¹⁸Herrick MK, Rubinstein LJ (1979). The cytological differentiating potential of pineal parenchymal neoplasms (true pinealomas). A clinicopathological study of 28 tumours. *Brain* 102: 289-320.

-
- ¹⁹Mena H, Rushing EJ, Ribas JL, Delahunt B, McCarthy WF (1995). Tumors of pineal parenchymal cells: a correlation of histological features, including nucleolar organizer regions, with survival in 35 cases. *Hum Pathol* 26: 20-30.
- ²⁰Chiechi MV, Smirniotopoulos JG, Mena H (1995). Pineal parenchymal tumors: CT and MR features. *J Comput Assist Tomogr* 19: 509-517.
- ²¹ Nakamura M, Saeki N, Iwadate Y, Sunami K, Osato K, Yamaura A (2000). Neuroradiological characteristics of pineocytoma and pineoblastoma. *Neuroradiology* 42: 509-514.
- ²² Constantine C, Miller DC, Gardner S, Balmaceda C, Finlay J (2005). Osseous metastasis of pineoblastoma: a case report and review of the literature. *J Neurooncol* 74: 53-57.
- ²³Schild SE, Scheithauer BW, Schomberg PJ, Hook CC, Kelly PJ, Frick L, Robinow JS, Buskirk SJ (1993). Pineal parenchymal tumors. Clinical, pathologic, and therapeutic aspects. *Cancer* 72: 870-880.
- ²⁴ Lee JY, Wakabayashi T, Yoshida J (2005). Management and survival of pineoblastoma: an analysis of 34 adults from the brain tumor registry of Japan. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 45: 132-141.
- ²⁵ Marcus DM, Brooks SE, Leff G, McCormick R, Thompson T, Anfinson S, Lasudry J, Albert DM (1998). Trilateral retinoblastoma: insights into histogenesis and management. *Surv Ophthalmol* 43: 59-70.
- ²⁶Jouvet A, Saint-Pierre G, Fauchon F, Privat K, Bouffet E, Ruchoux MM, Chauveinc L, Fevre-Montange M (2000). Pineal parenchymal tumors: a correlation of histological features with prognosis in 66 cases. *Brain Pathol* 10: 49-60.
- ²⁷Mena H, Rushing EJ, Ribas JL, Delahunt B, McCarthy WF (1995). Tumors of pineal parenchymal cells: a correlation of histological features, including nucleolar organizer regions, with survival in 35 cases. *Hum Pathol* 26: 20-30.
- ²⁸Bjornsson J, Scheithauer BW, Okazaki H, Leech RW (1985). Intracranial germ cell tumors: pathobiological and immunohistochemical aspects of 70 cases. *J NeuropatholExpNeurol* 44: 32-46.
- ²⁹Rueda P, Heifetz SA, Sesterhenn IA, Clark GB (1987). Primary intracranial germ cell tumors in the first two decades of life. A clinical, light-microscopic, and immunohistochemical analysis of 54 cases. *Perspect Pediatr Pathol* 10: 160-207.
- ³⁰Schild SE, Scheithauer BW, Haddock MG, Wong WW, Lyons MK, Marks LB, Norman MG, Burger PC (1996). Histologically confirmed pineal tumors and other germ cell tumors of the brain. *Cancer* 78: 2564-2571.
- ³¹Bjornsson J, Scheithauer BW, Okazaki H, Leech RW (1985). Intracranial germ cell tumors: pathobiological and immunohistochemical aspects of 70 cases. *J NeuropatholExpNeurol* 44: 32-46.
- ³² Ho DM, Liu HC (1992). Primary intracranial germ cell tumor. Pathologic study of 51 patients. *Cancer* 70: 1577-1584.

-
- ³³Sawamura Y, Ikeda J, Shirato H, Tada M, Abe H (1998). Germ cell tumours of the central nervous system: treatment consideration based on 111 cases and their long-term clinical outcomes. *Eur J Cancer* 34: 104-110.
- ³⁴Hoffman HJ, Otsubo H, Hendrick EB, Humphreys RP, Drake JM, Becker LE, Greenberg M, Jenkin D (1991). Intracranial germ-cell tumors in children. *J Neurosurg* 74: 545-551.
- ³⁵Fujimaki T, Matsutani M, Funada N, Kirino T, Takakura K, Nakamura O, Tamura A, Sano K (1994). CT and MRI features of intracranial germ cell tumors. *J Neurooncol* 19: 217-226.
- ³⁶Liang L, Korogi Y, Sugahara T, Ikushima I, Shigematsu Y, Okuda T, Takahashi M, Kochi M, Ushio Y (2002). MRI of intracranial germ-cell tumours. *Neuroradiology* 44: 382-388.
- ³⁷López E, Betanzos Y. Factores Pronósticos y Sobrevida de pacientes pediátricos con ependimomas. *GacMedMex*. Vol 145 (1), 2009; 770-773.
- ³⁸Sievers EL, Radich JP. Detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Curr Opin Hematol* 2000; 7:212-6.
- ³⁹MS, Cogen PH (1997). Chromosome arm 17p deletion analysis reveals molecular genetic heterogeneity in supratentorial and infratentorial primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Genet Cytogenet* 97: 25-31.
- ⁴⁰Dworzak MN, Froschl G, Priniz D, Mann G, Potschger U, Mublegger N et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 99:1952-1958.
- ⁴¹Rubnitz JE, Crist WM. Molecular genetics of childhood cancer: Implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Pediatrics* 1997; 100:101-108.
- ⁴²Raffaghello L, Marimpietri D, Pagnan G, Pastorino F, Cosimo E, Brignole C et al. Anti-GD2 monoclonal antibody immunotherapy: a promising strategy in the prevention of neuroblastoma relapse. *Cancer Lett* 2003; 197:205.
- ⁴³Ellison D (2002). Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28: 257-282.
- ⁴⁴Becton Dickinson. *Biosciences Software User's Guide* 2007.
- ⁴⁵Prophet E, Mills B, Arrington J. *Métodos histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de EUA, 1994: 31-32.
- ⁴⁶Varma N, Naseem S. Application of Flow Cytometry in Pediatric Hematology-Oncology. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 57:18-29.
- ⁴⁷López E, et al: Preirradiation ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE) for the treatment of high-grade astrocytomas in children. *Childs Nerv Syst* 19:812-823, 2003.