



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
HOSPITAL DE PEDIATRÍA  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI



**“Asociación de la formación de neuroesferas con la respuesta a tratamiento y sobrevida en pacientes pediátricos con Tumor Neuroectodérmico Primitivo, Ependimoma y Tumor Teratoide Rabdoide de Sistema Nervioso Central.”**

## **T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN PEDIATRÍA

PRESENTA

Dra. Jessica Mayté Reynoso Castorena

### **Tutores:**

Dr. J. Enrique López Aguilar

Jefe del Servicio de Oncología del Hospital de Pediatría CMN SXXI

Dra. Ana Carolina Sepúlveda Vildósola

Directora de Educación del Hospital de Pediatría CMN SXXI

### **Colaboradores**

Biol. José Luis Zárate Alvarado

Q.F.B. Leticia Figueroa Rosas

Dr. Jaime Diego Pérez Ramírez

Dra. Georgina Siordia



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.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>5</b>
<b>Justificación</b>	<b>10</b>
<b>Planteamiento del problema</b>	<b>11</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>12</b>
<b>Objetivos</b>	<b>13</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>14</b>
<b>Resultados</b>	<b>20</b>
<b>Discusión</b>	<b>22</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>28</b>
<b>Anexos</b>	<b>30</b>

## RESUMEN

**Título:** Asociación de la formación de neuroesferas con la respuesta a tratamiento y supervivencia en pacientes pediátricos con Tumor Neuroectodérmico Primitivo, Ependimoma y Tumor Teratoide Rabdoide de Sistema Nervioso Central.

**Autores:** J Reynoso Castorena, E López Aguilar, AC Sepúlveda Vildósola.

**Introducción:** Los tumores del sistema nervioso central representan el 20% de las neoplasias en la etapa pediátrica y en México ocupan el segundo lugar en frecuencia. Los tumores embrionarios y gliales comprenden una gran parte de estos tumores. Anteriormente se definía el riesgo en los pacientes pediátricos con un tumor cerebral y con ello el tratamiento que debían recibir de acuerdo a parámetros clínicos, histológicos y radiológicos. Actualmente se han agregado tres aspectos fundamentales para comprender el comportamiento de estos tumores que son los parámetros inmunohistoquímicos, genéticos y por último, recientemente se encuentra en estudio el comportamiento biológico en cultivos celulares primarios los cuales mantienen sus propiedades fisiológicas y metabólicas. Se ha encontrado que estos tumores tienen la capacidad de formar colonias celulares esféricas que crecen en suspensión con la capacidad de proliferar, autorenovarse y diferenciarse llamadas neuroesferas. Se ha demostrado que la formación de neuroesferas tiene un valor clínico predictivo en tumores cerebrales en adultos mientras que su papel en el pronóstico de tumores cerebrales infantiles se desconoce.

**Objetivo:** Determinar la asociación entre la formación de neuroesferas *in vitro* con la respuesta al tratamiento y supervivencia en pacientes pediátricos con tumor neuroectodérmico primitivo, ependimoma y tumor teratoide rabdoide de sistema nervioso central.

**Métodos:** Se realizó un estudio prospectivo, longitudinal, de una cohorte, no intervencionista en el cual se estudiaron 8 pacientes con diagnóstico de tumor neuroectodérmico primitivo, ependimoma y tumor teratoide rabdoide de sistema nervioso central. Se analizó la asociación entre formación de neuroesferas en el cultivo celular proveniente de la biopsia tumoral con la respuesta a tratamiento y supervivencia en los pacientes.

**Resultados:** De los 8 pacientes incluidos 3 son hombres y 5 mujeres con una relación mujer hombre 1.6: 1. El rango de edad fue de los 20 a los 144 meses con una mediana de 72 meses. Por localización, de los 8 tumores 4 fueron supratentoriales (50%) y 4 infratentoriales (50%). Por histología, 3 fueron ependimomas (37.5%), 4 fueron tumores neuroectodérmicos primitivos (50%), siendo dos de ellos meduloblastomas, y uno correspondió a un tumor rabdoide atípico (12.5%). De los 8 pacientes estudiados, los 8 desarrollaron neuroesferas en el cultivo basal y en el primer primer pase, 7 desarrollaron en el segundo pase, 5 en el tercer pase y 3 de los pacientes desarrollaron neuroesferas en 4 pases ó más.

De los 5 pacientes que desarrollaron neuroesferas al tercer pase, uno falleció en las primeras 4 semanas y otro falleció en las primeras 8 semanas, ambos por progresión tumoral. El tercero presentó progresión tumoral después de 6 meses de iniciado el tratamiento. El cuarto y el quinto paciente se encuentran aún en tratamiento y con enfermedad estable (Prueba exacta de Fisher  $p=0.357$ ). De los 8 pacientes, 3 desarrollaron neuroesferas en el cuarto pase y más, de los cuales 2 fallecieron y uno se encuentra con progresión tumoral (Prueba exacta de Fisher  $p=0.107$ ). El paciente que solamente desarrolló neuroesferas en el cultivo basal actualmente se encuentra vivo y sin actividad tumoral. En total de los 8 pacientes, dos han fallecido, uno se encuentra con progresión tumoral, dos en tratamiento con enfermedad estable, dos con respuesta parcial y uno más en vigilancia por respuesta completa. La formación de neuroesferas al 4to pase no se asoció con la respuesta a tratamiento (Chi cuadrada  $p=0.161$ ) ni con la diseminación a neuroeje (Prueba exacta de Fisher  $p=0.643$ ), aunque 2 de los 3 pacientes positivos presentaron progresión tumoral contra 1 de 5 pacientes negativos. De acuerdo a la histología del tumor el 100% de pacientes con ependimoma están vivos a las 32 semanas, 75% de los pacientes con tumores neuroectodérmicos primitivos están vivos a las 32 semanas y el único paciente con tumor rabdoide falleció a las 8 semanas. No hay diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la histología del tumor al comparar a los ependimomas con los tumores neuroectodérmicos primitivos (Log Rank  $p=0.3916$ ). La sobrevida global de los pacientes es de 75% a 9 meses. La sobrevida si la formación de neuroesferas es positiva al 4to pase es del 33% y del 100% si es negativo (Log Rank  $p=0.1967$ ).

**Conclusión:** Aquellos pacientes que desarrollaron neuroesferas en tres pases o más mostraron una tendencia a presentar pobre respuesta al tratamiento y menor sobrevida. Al contar con el cultivo celular tumoral se determinará la pauta terapéutica, dirigiendo un esquema de quimioterapia más agresivo hacia aquellos pacientes cuyos tumores desarrollan neuroesferas de manera sostenida, y al combinar los resultados obtenidos con la determinación de biomarcadores moleculares, se logrará una terapia individualizada a cada paciente con mejoría y disminución de efectos secundarios y se podrá otorgar tratamientos menos agresivos a aquellos pacientes que sin desarrollo de neuroesferas y con marcadores moleculares sugieran un comportamiento tumoral menos agresivo.

**Palabras claves.** Neuroesferas, Tumor Neuroectodérmico Primitivo, Ependimoma, Tumor Teratoide Rabdoide.

## ANTECEDENTES

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) comprenden del 15 al 20% de las neoplasias en la niñez y la adolescencia <sup>(1)</sup>. En México ocupan el segundo lugar en frecuencia después de las leucemias y linfomas. Se calcula que aproximadamente cada año se presentan 560 casos nuevos <sup>(2)</sup>.

Los tumores embrionarios del SNC comprenden una gran parte de tumores pediátricos. Se caracterizan por un aspecto histológico de células neuroepiteliales mal cohesionadas homogéneas indiferenciadas con un alto índice mitótico. Todos los tumores embrionarios se derivan de una célula precursora común: la matriz subependimaria en el SNC. La tendencia de estas neoplasias para difundir a través del líquido cefalorraquídeo (LCR) se cree que contribuyen a su mal pronóstico. Entre ellos se encuentran el meduloblastoma, los tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y los tumores teratoides rabdoideos <sup>(3)</sup>.

El meduloblastoma (MD) es el tumor maligno e invasor encefálico más común en la edad pediátrica en los menores de 15 años con una distribución bimodal en la edad preescolar y escolar, con un pico entre los 3 y 4 años y otro pico entre los 8 y 9 años <sup>(4)</sup>. Al igual que lo reportado en otras instituciones, en el Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI, el meduloblastoma representa el 20% de los tumores del SNC en la población pediátrica y corresponde al 40% de los tumores de la fosa posterior <sup>(5)</sup>. Se cree que las células progenitoras multipotentes de la zona ventricular constituyen el sitio primario de su desarrollo <sup>(6)</sup>.

De los tumores del SNC, el MD es el que muestra mayor tendencia a sembrarse en el espacio subaracnoideo y diseminarse de forma extra neural al diagnóstico. Del 14 al 43% de los casos, se reportan que tienen siembras en el espacio subaracnoideo de la médula espinal o del cerebro <sup>(7)</sup>.

En un estudio realizado en nuestra institución en donde se evaluó la sobrevida de 26 pacientes con meduloblastoma tratados con resección quirúrgica, quimioterapia a base de carboplatino, ifosfamida y etopósido antes y después de radioterapia, la tasa de sobrevida global a 60 meses fue del 69% y la tasa de sobrevida libre de enfermedad fue del 64% <sup>(8)</sup>.

Los tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales (TNEP) aunque similares desde el punto de vista histológico, son biológicamente diferentes de los meduloblastomas <sup>(9)</sup>.

Ocurren por encima del tentorio, de modo primario en la corteza cerebral y con menos frecuencia en la región diencefálica. El tratamiento con resección tumoral, radioterapia craneoespinal con refuerzo local y quimioterapia adyuvante agresiva ha mostrado tasas de supervivencia libre de progresión a los 5 años que han oscilado entre el 30 y el 60%, y en la mayoría de las series sobreviven alrededor del 50% de los pacientes afectados <sup>(10)</sup>.

Los ependimomas (EP) comprenden del 5 al 10% de todos los tumores encefálicos de la niñez. Del 70 al 80% se originan en la fosa posterior con una predilección relativa por el ángulo cerebelopontino. Los tumores infratentoriales se extienden de forma notoria a lo largo de la médula cervical superior lo que dificulta la resección total y la radioterapia. La resección quirúrgica completa más radioterapia ha mostrado una supervivencia del 75% a 5 años. La combinación de radiación más quimioterapia se ha reservado en niños mayores de 5 años, los sometidos a resección subtotal y los que tienen tumores anaplásicos mostrando una supervivencia del 50% <sup>(5, 11)</sup>.

Los tumores teratoides/rabdoides atípicos (TT/RA) son lesiones que se encuentran de modo predominante en niños menores de 3 años pero que también se pueden diagnosticar en niños mayores y adolescentes. El tumor puede nacer tanto en la fosa posterior como por encima del tentorio. Presenta diseminación al diagnóstico en el 25% de los casos. El resultado del tratamiento en lactantes con dosis altas de quimioterapia ha sido desfavorable, con supervivencia menor del 20% en los pacientes diagnosticados con tumores diseminados. La supervivencia es más favorable en pacientes mayores de 3 años tratados con resección extensa, radioterapia craneoespinal y refuerzo local así como quimioterapia <sup>(12)</sup>.

En la década pasada se definía el riesgo en los pacientes pediátricos con un tumor cerebral y con ello el tratamiento que debían recibir de acuerdo a parámetros clínicos, histológicos y radiológicos <sup>(13)</sup>. A principios de éste siglo se han agregado tres aspectos fundamentales para comprender el comportamiento de estos tumores que son los parámetros inmunohistoquímicos y genéticos como la sobreexpresión antígeno de superficie Ki67 o mutación del gen p53 <sup>(14)</sup>. Por último, recientemente se encuentra en estudio el comportamiento biológico de estos tumores en cultivos celulares primarios los cuales mantienen sus propiedades fisiológicas y metabólicas.

En 1992 Reynolds y Weiss aislaron *in vitro*, a partir del cerebro de ratón adulto, una pequeña población de células con capacidad de proliferar y generar clones multipotentes <sup>(15)</sup>. Múltiples estudios posteriores demostraron que la neurogénesis persiste a través de la vida adulta a partir de células indiferenciadas dotadas de una extensa capacidad proliferativa que se encuentran en algunas regiones del cerebro humano y de otras especies animales, principalmente en el giro dentado del hipocampo y en la zona subventricular de los ventrículos laterales <sup>(16)</sup>.

Se observó que estas células se expandían rápidamente al ser colocadas en medio de cultivo y estimuladas con factores de crecimiento dando origen a un conglomerado celular de tres dimensiones esférico flotante a los cuales llamaron **neuroesferas** <sup>(17)</sup>.

A partir de entonces, este enfoque de neuroesferas representa un sistema de cultivo selectivo, libre de suero, en el cual las células diferenciadas rápidamente mueren, mientras que las células indiferenciadas responden a mitógenos, se dividen y forman neuroesferas que pueden ser disociadas y sembradas para generar esferas secundarias así como diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos indicando que poseen la capacidad de autorenovación, proliferación y diferenciación de las **células madre**. Por lo anterior, el ensayo de neuroesferas se ha convertido en el método de elección para estudiar el potencial de expansión de las poblaciones de células madre *in vitro* <sup>(18)</sup>.

Al conocer la persistencia de la neurogénesis en el SNC adulto surgió la hipótesis de que las células maduras neurales no sean la única fuente posible de tumores cerebrales. Estudios recientes han demostrado que los tumores de SNC se originan de una sola línea celular autorenovadora que después da origen al resto del tumor incluyendo una variedad de tipos celulares diferenciados <sup>(19)</sup>.

En el 2002, Ignovata et al describieron por primera vez células con propiedades parecidas a las células madre neurales (CMN) en tumores cerebrales. Estudiaron los cultivos celulares provenientes de muestras quirúrgicas de glioblastomas multiformes encontrando células que daban origen a neuroesferas <sup>(20)</sup>.

Esta subpoblación celular que expresa el marcador de superficie de las células madre neurales CD 133, ha sido también identificada en otros tumores malignos de sistema nervioso y se ha probado que tienen propiedades como tumorigénesis, radorresistencia y quimiorresistencia que no muestra su contraparte que no expresa dicho marcador <sup>(21)</sup>.



A pesar de que las células madre tumorales y las células madre neurales expresan muchos de los mismos genes (CD 133, musashi-1, Sox2, melk, PSP, bmi-1 y nestina) y comparten características en común como son la autorenovación y la multipotencialidad, muestran también algunas diferencias; las neuroesferas derivadas de los tumores muestran proliferación descontrolada con mayor longevidad manteniéndose bajo idénticas condiciones en el cultivo celular por lo menos 4 meses a diferencia de las células neurales que se mantienen durante un mes <sup>(22)</sup>.

En el 2003 Hemmati et al estudiaron muestras de tumores cerebrales pediátricos y demostraron que éstos también contienen células multipotentes y autorenovadoras formadoras de neuroesferas, sugirieron que el tratamiento debería dirigirse a la eliminación de esta población de células madre <sup>(22)</sup>.

Singh et al descubrieron que una nueva fenocopia de la lesión tumoral es capaz de ser generada en el SNC de ratones inmunodeprimidos al transplantarles tan solo 100 células madre CD 133+ provenientes del tumor cerebral primario <sup>(23,24)</sup>.

En 2009, Yu Yao et al encontraron también que las CMT provenientes de astrocitomas humanos dieron origen a neuroesferas. Concluyeron que el número de células madre tumorales en división era directamente proporcional al grado de malignidad del astrocitoma <sup>(25)</sup>.

Laks et al se demostraron que aquellos pacientes de cuyas muestras tumorales se derivaron neuroesferas y que se mantuvieron en cultivo por lo menos durante tres pases tuvieron peor sobrevida que aquellos pacientes que no desarrollaron o mantuvieron neuroesferas en el cultivo celular. Con lo anterior concluyeron que *in vitro*, el crecimiento de neuroesferas refleja la severidad clínica del glioma al medir la sobrevida de los pacientes <sup>(26)</sup>.

Así mismo se ha descubierto que una característica que contribuye a la habilidad de sobrevivir de una célula madre y por lo tanto de las neuroesferas, es su resistencia a drogas y toxinas. Una peculiaridad de muchas poblaciones de células madre es su alta expresión de la superfamilia ABC de resistencia a drogas, que pueden proteger a las células de los agentes citotóxicos indicando la posibilidad hipotética de que tanto esta resistencia como la recurrencia del tumor pueda estar relacionado con la incapacidad de los componentes citotóxicos de eliminar células iniciadoras del cáncer <sup>(27)</sup>. El descubrimiento de las células madre y de las neuroesferas de tumores cerebrales identifica un blanco celular que pudiera responder a nuevos tratamientos.

Por lo anterior se intenta definir el valor predictivo de las neuroesferas que se han identificado por su capacidad de autorenovación, proliferación y diferenciación.

Se encuentra pendiente relacionar la formación de neuroesferas con la respuesta a tratamiento y sobrevida en pacientes pediátricos con tumores de sistema nervioso central.

El conocimiento del comportamiento biológico de estos tumores nos da la posibilidad de plantear terapias dirigidas contra este tipo de neoplasias.

## JUSTIFICACIÓN

A pesar de las nuevas estrategias y los diferentes esquemas de quimioterapia que se han intentado en nuestro hospital, la sobrevida a 5 años que tienen los pacientes con tumores embrionarios de manera global es del 56%, quedando un 44% de pacientes que fallecen a pesar del tratamiento por lo cual se justifica el entender más a fondo el comportamiento biológico de estos tumores para poder plantear estrategias terapéuticas dirigidas a mejorar la sobrevida, identificando a los tumores con comportamientos más agresivos para proporcionar tratamientos más agresivos y ofrecer tratamientos menos intensos a aquellos con comportamientos biológico menos agresivos y posteriormente definir al grupo de pacientes, que de manera temprana, tendrán mala respuesta al tratamiento.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El conocer el comportamiento biológico de los tumores de SNC con formación de neuroesferas capaces de proliferar, autorenovarse y diseminarse puede ayudarnos a pronosticar la respuesta al tratamiento y la sobrevida en los pacientes por lo que nos hacemos el siguiente cuestionamiento:

¿Los pacientes con EP, TNEP, TT/RA de SNC que desarrollen neuroesferas se asociarán con mala respuesta al tratamiento y menor sobrevida?

## HIPÓTESIS

1. El 60% de pacientes con TNEP, EP, TT/RA que forman neuroesferas no responderán al esquema de quimioterapia habitual.
2. Aquellos pacientes con TNEP, EP, TT/RA que desarrollen neuroesferas tendrán una sobrevida menor que aquellos que no las desarrollen.
3. El 60% de pacientes con TNEP, EP, TT/RA que forman neuroesferas *in vitro* presentaran diseminación a neuroeje en algún momento de su enfermedad.

## **OBJETIVOS**

1. Determinar la asociación entre la formación de neuroesferas y la respuesta a tratamiento en pacientes con TNEP, EP Y TT/RA.
2. Determinar la asociación entre la formación de neuroesferas y la sobrevida en pacientes con TNEP, EP Y TT/RA.
3. Determinar la asociación de la formación de neuroesferas con la diseminación de la enfermedad al neuroeje en pacientes con TNEP, EP Y TT/RA.

## **SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS**

### **LUGAR Y PERIODO EN QUE SE DESARROLLO EL ESTUDIO**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de investigación del servicio de Oncología en el Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional SXXI (HP CMN SXXI) en el periodo comprendido entre el 1ero de octubre de 2010 y 30 de junio de 2011.

### **DISEÑO/TIPO DE ESTUDIO**

El tipo de estudio es prospectivo, longitudinal, de una cohorte, no intervencionista.

### **UNIVERSO DE ESTUDIO**

Se incluyeron a todos los pacientes con TNEP, EP, TT/RA en los cuales se realizó un cultivo primario de células tumorales producto de la resección quirúrgica del tumor primario a la cual fueron sometidos durante el periodo de tiempo ya referido.

### **CRITERIOS DE SELECCIÓN**

#### **INCLUSIÓN**

- Pacientes de cualquier sexo menores de 17 años.
- Diagnóstico de certeza con meduloblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo, ependimoma y tumor rabdoide teratoide de SNC establecido en el servicio de patología del Hospital de Pediatría de CMN.
- Pacientes en quienes sea posible la toma de biopsia tumoral.
- Pacientes que no hayan recibido tratamiento de quimioterapia y radioterapia previo.

#### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Pacientes que por algún motivo no se pueda tomar biopsia de la tumoración.

#### **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

- Pacientes cuya biopsia sea insuficiente e inadecuada para la toma de cultivo.
- Pacientes cuyo cultivo celular presente contaminación que impida la correcta evaluación.

## **TAMAÑO DE MUESTRA**

El tamaño de muestra se obtuvo por conveniencia incluyendo a todos los pacientes que fueron diagnosticados en el periodo que duró el estudio.

## **MÉTODOS**

Los pacientes con TNEP, EP, TT/TR que se incluyeron en este estudio recibieron esquema de quimioterapia de acuerdo al siguiente régimen:

1. Ifosfamida: 2 gr/m<sup>2</sup>SC día diluidos en 200 ml de SS0.9% a pasar en 1 hora los días 1, 2 y 3.
2. Etopósido: 100 mg/m<sup>2</sup>SC día diluidos en 150 ml de SS0.9% a pasar en 1 hora los días 1, 2 y 3.
3. Carboplatino: 400 mg/m<sup>2</sup>SC en el día 1 diluidos en 200 ml de S0.9% a pasar en 1 hora.
4. Mesna se calculó al 100% de la dosis de la ifosfamida.

Este esquema se administró cada 4 semanas por 6 cursos, posteriormente todos los pacientes recibieron radioterapia en cráneo y neuroeje.

Se realizó resonancia magnética (IRM) de cráneo y neuroeje a todos los pacientes al diagnóstico y posterior al 4to y 6to curso, se evaluó la respuesta tumoral de acuerdo a los siguientes criterios:

**RESPUESTA COMPLETA:** reducción de la tumoración en un 100% y sin evidencia de diseminación a neuroeje.

**RESPUESTA PARCIAL:** respuesta tumoral del 50 al 99% mediante el estudio de IRM.

**ENFERMEDAD ESTABLE:** respuesta tumoral del 25 al 50%.

**ENFERMEDAD PROGRESIVA:** menos de 25% de respuesta tumoral o incremento en el volumen de este.

Se evaluó la presencia de neuroesferas en el cultivo primario de células obtenidas de una muestra de la biopsia o la resección tumoral al momento del diagnóstico y posterior a cada resiembra realizada (pase) hasta que dejaron de proliferar las células neoplásicas. Esta medición fue realizada por un biólogo molecular en conjunto con el médico oncólogo y la tesisista. La técnica se enumera en el ANEXO 1.

Se determinó la presencia de diseminación a neuroeje mediante citología de LCR en búsqueda de células neoplásicas posterior a cada 2 cursos de quimioterapia.

Se evaluó la sobrevida de acuerdo al método de Kaplan Meier.



Los datos se obtuvieron en hoja de recolección del ANEXO 2.

Los recursos financieros provinieron del Laboratorio de Investigación de Tumores Cerebrales.

## VARIABLES

<b>VARIABLE</b>	<b>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</b>	<b>DEFINICIÓN OPERACIONAL</b>	<b>ESCALA (tipo de valores)</b>
<b>DEPENDIENTES</b>			
<b>Respuesta tumoral</b>	Respuesta por imagen de la tumoración.	Respuesta por imagen después de 2,4 y 6 cursos de quimioterapia.	Cualitativa Respuesta parcial Respuesta completa Enfermedad estable Progresión tumoral
<b>Diseminación a neuroeje</b>	Presencia de células neoplásicas en líquido cefalorraquídeo y/o presencia de nódulos en el neuroeje evidenciados por IRM.	Células positivas en LCR y/o evidencia por IRM de diseminación a neuroeje en cualquier momento de la evolución del paciente.	Nominal, Cualitativa, Dicotómica, Si o no.
<b>Sobrevida</b>	Refleja la proporción de personas vivas a un tiempo especificado luego del diagnóstico de la enfermedad en cuestión.	Tiempo que transcurre desde el diagnóstico de tumor de SNC hasta la muerte o hasta el momento en que finaliza el estudio.	Cuantitativa, Continua. Semanas.
<b>INDEPENDIENTES</b>			
<b>Formación de neuroesferas</b>	Formación de colonias esféricas de células neurales que crecen en suspensión en cultivos in vitro a partir de cultivos primarios de SNC con capacidad autorenovadora de proliferación y diferenciación.	Formación de colonias esféricas de células neurales que crecen en suspensión en cultivos in vitro a partir de tumores embrionarios de SNC en 4 resiembras.	Nominal, Cualitativa. Ausencia ó presencia en primer pase, segundo pase, tercer pase y cuarto pase.

<b>Histología</b>	Categorización del tumor según características de acuerdo a la clasificación de la OMS.	Diagnóstico de ependimoma, meduloblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo o tumor teratoide.	Nominal, Cualitativa. Ependimoma, Meduloblastoma, Tumor neuroectodérmico primitivo, Tumor teratoide.
<b>Edad</b>	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo o tiempo de vida en años	Es la resta que resulta de la fecha del diagnóstico y la fecha de nacimiento	Cuantitativa, Continua. Meses.
<b>Sexo</b>	Conjunto de caracteres orgánicos que diferencian a la especie humana en hombre y mujer	Aspecto fenotípico que distingue al niño en hombre y mujer	Nominal, Cualitativa. Hombre o mujer.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se utilizó estadística descriptiva, cálculo de frecuencias simples y determinación de sobrevida de acuerdo al método Kaplan Meier, con cálculo de Log Rank Test para definir diferencia entre ambas curvas de sobrevida.

## **ASPECTOS ÉTICOS**

Debido a que no se realizará ninguna maniobra intervencionista, el protocolo será observacional por lo tanto no se incurre en implicaciones éticas.

## RESULTADOS

Se incluyeron un total de 8 pacientes pediátricos con tumores de SNC en los cuales fue posible realizar cultivo de células tumorales en el laboratorio de investigación de tumores cerebrales además de un seguimiento tanto clínico como por imagen.

De los 8 pacientes incluidos 3 son hombres (37.5%) y 5 mujeres (62.5%) con una relación mujer hombre 1.6:1.

El rango de edad fue de los 20 a los 144 meses con una mediana de 72 meses.

Por localización, de los 8 tumores cuatro (50%) fueron supratentoriales y 4 infratentoriales (50%).

Por histología, 3 de los tumores fueron endimomas (37.5%), 4 fueron tumores neuroectodérmicos primitivos (50%); y uno correspondió a un tumor rabdoide atípico (12%).

En cuanto a la formación de neuroesferas encontramos que de los 8 pacientes estudiados, los 8 desarrollaron neuroesferas en el cultivo basal y en el primer pase (100%), 7 desarrollaron neuroesferas en el segundo pase (87.5%), 5 desarrollaron neuroesferas en el tercer pase (62.5%) y 3 de ellos las en 4 pases o más (37.5%).

De los 5 pacientes que desarrollaron neuroesferas al tercer pase, uno falleció en las primeras 4 semanas y otro falleció en las primeras 8 semanas, ambos por progresión tumoral. El tercero presentó progresión tumoral después de 6 meses de iniciado el tratamiento. El cuarto y el quinto paciente se encuentran aún en tratamiento y con enfermedad estable. Por lo tanto la formación de neuroesferas al tercer pase no se asoció con el estado actual del paciente (Prueba exacta de Fisher  $p=0.357$ ).

De los 8 pacientes incluidos, 3 desarrollaron neuroesferas en el cuarto pase y más, de los cuales 2 fallecieron y uno se encuentra vivo con progresión tumoral. La formación de neuroesferas al cuarto pase no se asoció al estado actual de los pacientes (Prueba exacta de Fisher  $p=0.107$ ).

Por el contrario, el paciente que solamente desarrolló neuroesferas en el cultivo basal actualmente se encuentra vivo y sin actividad tumoral.

En total de los 8 pacientes, dos han fallecido, uno se encuentra con progresión tumoral, dos en tratamiento con enfermedad estable, dos con respuesta parcial y uno más en vigilancia por respuesta completa.

La formación de neuroesferas al cuarto pase no se asoció con la respuesta a tratamiento (Chi cuadrada  $p=0.161$ ) ni con la diseminación a neuroeje (Prueba exacta de Fisher  $p=0.643$ ) sin embargo 2 de los 3 pacientes que formaron neuroesferas al cuarto pase presentaron progresión tumoral contra 1 de 5 pacientes que no las formaron.

De acuerdo a la histología del tumor el 100% de pacientes con ependimoma están vivos a las 32 semanas, 75% de los pacientes con tumores neuroectodérmicos primitivos están vivos a las 32 semanas y el único paciente con tumor rabdoide falleció a las 8 semanas. No hay diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la histología del tumor al comparar a los ependimomas con los neuroectodérmicos primitivos (Log Rank  $p= 0.3916$ ).

La sobrevida global de los pacientes es de 75% a 9 meses.

La sobrevida si la formación de neuroesferas es positiva al 4to pase es del 33% , y es de 100% si es negativo. (Log Rank  $p=0.1967$ ).

## DISCUSIÓN

Al momento actual, se han estudiado varios factores pronósticos en los pacientes pediátricos con tumores cerebrales.

En la década de los 90s, los factores pronósticos más importantes estudiados fueron la localización de la tumoración, la histología y el grado de resección quirúrgica, siendo los pacientes con tumoraciones de localización infratentorial y de histología de bajo grado con resecciones quirúrgicas amplias los que más sobrevida lograban<sup>(4)</sup>.

En los inicios de este siglo, con el advenimiento de los biomarcadores moleculares, se logró estratificar de una manera más adecuada a los pacientes pediátricos con un tumor cerebral, de acuerdo al riesgo y de esta forma poder dar un tratamiento más agresivo a aquellos con factores pronósticos adversos. Así pues aquellos pacientes que sobreexpresaban el antígeno de superficie Ki67 que correlacionaba con una mayor proliferación celular, se asociaban con un peor pronóstico comparado con aquellos que no lo expresaban y aquellos que presentaban mutación ó sobreexpresión del gen p53 también tenían un peor pronóstico comparado con los que presentaban este gen normal<sup>(14)</sup>.

Estos factores eran, en cierta forma, una manera de conocer más el comportamiento del tumor cerebral en el niño. No fue hasta que se realizaron cultivos celulares tumorales cuando se pudo conocer de una manera aproximada el comportamiento biológico in vitro de cada uno de los tumores.

Este trabajo de investigación es vanguardista en cuanto a que se pretende realizar una asociación con la respuesta al tratamiento y sobrevida en los pacientes con tumor cerebral que desarrollaban neuroesferas.

No existe otro trabajo similar reportado aunque en la Universidad de California se están desarrollando, de manera paralela, cultivos celulares primarios en busca de una asociación con la sobrevida respuesta al tratamiento.

El conocimiento de las neuroesferas implica la biología molecular de las células neoplásicas, dado que éstas se forman a partir de una célula madre multipotencial con capacidad de renovación<sup>(24)</sup> y capacidad de reproducir un tumor de las mismas características al ser implantado en un modelo animal murino<sup>(25)</sup>.

Nosotros pudimos identificar y cultivar estas neuroesferas en nuestros 8 pacientes estudiados y encontramos que, aunque de manera no significativa dado que el tamaño de la muestra es pequeña, existe una clara asociación entre el desarrollo de éstas

y la evolución de nuestros pacientes, ya que como se comentó en resultados, de los 3 pacientes que desarrollaron neuroesferas por más de 3 pases, dos fallecieron y el tercero se encuentra con franca progresión tumoral.

Es importante recalcar que el presente trabajo de investigación reporta resultados preliminares que seguramente se seguirán enriqueciendo conforme aumente el tamaño de muestra, sin embargo, con los resultados obtenidos se puede dirigir un tratamiento más específico a cada uno de nuestros pacientes, es decir, una terapia dirigida acorde al comportamiento biológico de cada tumor que es una representación del comportamiento biológico in vivo. Dado que nosotros en nuestros cultivos no estamos utilizando factores de crecimiento epidérmico ni factores de crecimiento fibroblástico, de tal manera que éstos cultivos primarios se han desarrollado en condiciones similares a las que se encontraría en el niño.

Por otro lado, nosotros pensábamos encontrar una asociación entre formación de neuroesferas y diseminación a neuroeje con significancia estadística, sin embargo, no la encontramos dado que el tamaño de muestra es aún pequeña, pero sin duda debe comentarse que la tendencia es hacia la asociación dado que de los 8 pacientes, estudiados, 2 presentaron diseminación a neuroeje y desarrollaron neuroesferas posterior a más de 3 pases.

Por último, en relación a la sobrevida, aunque aún no es definitiva ( $p=0.107$ ) la asociación al encontrar que los 2 pacientes fallecidos formaron neuroesferas después de 4 pases comparados con las que no las desarrollaron, la tendencia sin duda así lo marcará.

En conclusión, es un avance importante en el abordaje terapéutico de estos pacientes, el contar con el cultivo celular tumoral dado que nos marcará la pauta terapéutica, al dirigir un esquema de quimioterapia más agresivo hacia aquellos pacientes cuyos tumores desarrollan neuroesferas de manera sostenida, y al combinar estas investigaciones con los resultados obtenidos de biomarcadores moleculares, se logrará una terapia individualizada a cada paciente con la consecuente mejoría y disminución de efectos secundarios al dar tratamientos menos intensivos a aquellos pacientes que no desarrollan neuroesferas y cuyos marcadores moleculares sugieran un comportamiento tumoral menos agresivo.



TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

No.	EDAD *	SEXO	HISTOLOGIA	LOCALIZACION	FORMACION DE NEUROESFERAS BASAL Y PASES					ESTADO ACTUAL	DISEMINACION A NEUROEJE	RESPUESTA A TX	SOBREVIDA *
					B	1	2	3	4				
1	36	M	Ependimoma	Infratentorial	+	+	+	+	-	Vivo	-	EE	21
2	36	F	Meduloblastoma	Infratentorial	+	+	+	+	+	Muerto	+	PT	4
3	24	F	TNEP	Supratentorial	+	+	+	-	-	Vivo	-	RP	35
4	144	F	Ependimoma	Infratentorial	+	+	-	-	-	Vivo	-	RP	32
5	144	M	TNEP	Supratentorial	+	+	+	-	-	Vivo	-	RC	33
6	120	F	Meduloblastoma	Infratentorial	+	+	+	+	-	Vivo	+	PT	32
7	20	F	Ependimoma	Infratentorial	+	+	+	+	+	Vivo	-	EE	14
8	108	M	Teratoide	Supratentoria.	+	+	+	+	+	Muerto	-	PT	8

EE: Enfermedad estable

PT: Progresión tumoral

RP: Respuesta parcial

RC: Respuesta completa

\*Meses

TABLA 2. FORMACIÓN DE NEUROESFERAS ASOCIADO A ESTADO CLÍNICO

Neuroesferas al 4to pase	Vivo	Muerto
Sí	1	2
No	5	0

Prueba exacta de Fisher P= 0.107

TABLA 3. FORMACIÓN DE NEUROESFERAS ASOCIADO A DISEMINACIÓN A NEUROEJE.

Neuroesferas al 4to pase	Con diseminación	Sin diseminación
Sí	2	1
No	0	5

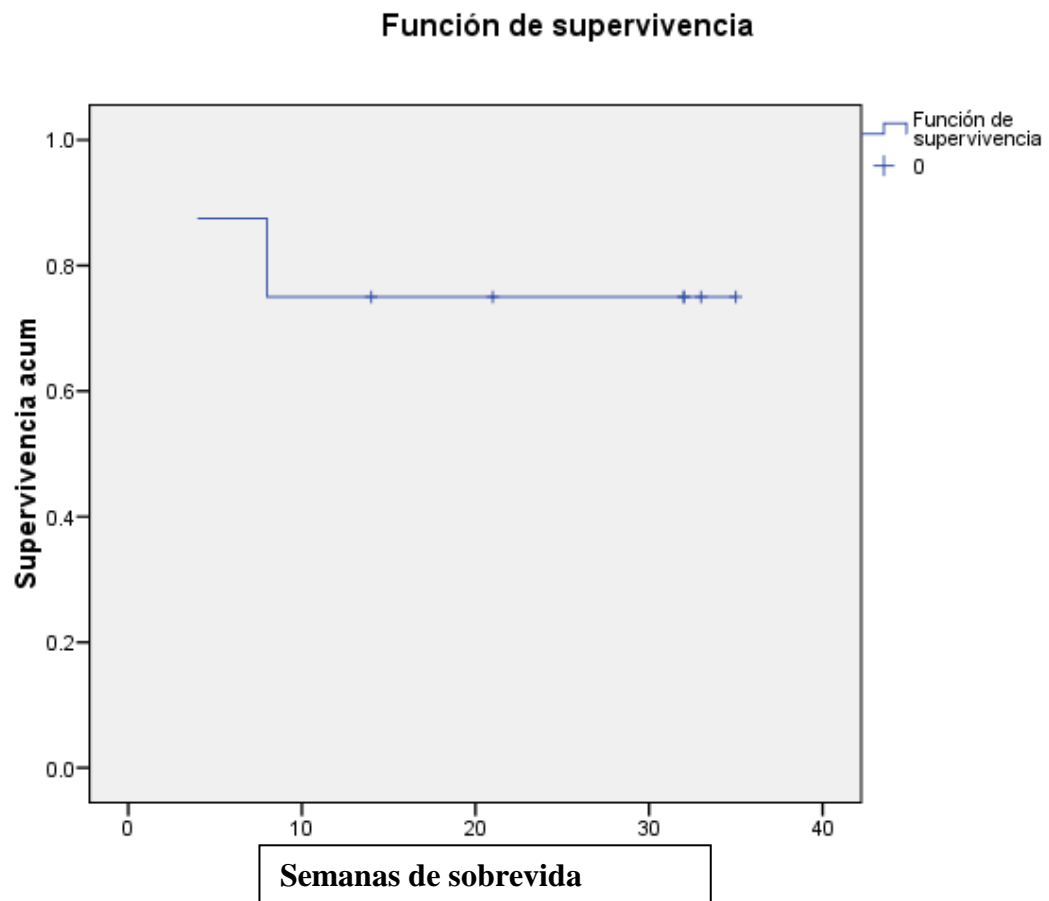
Prueba exacta de Fisher P=0.643

TABLA 4. FORMACIÓN DE NEUROESFERAS ASOCIADO A RESPUESTA A TRATAMIENTO

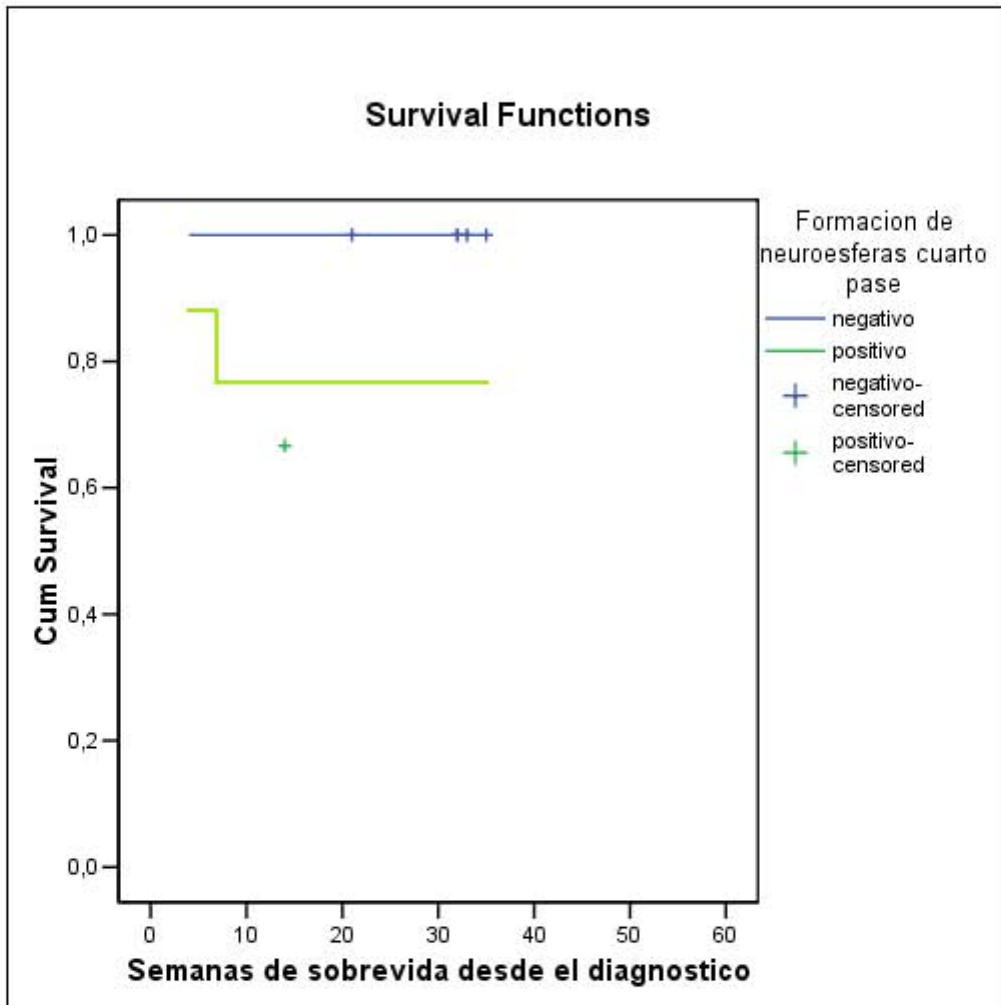
Neuroesferas al 4to pase	Con respuesta	Sin respuesta
Sí	0	3
No	3	2

Chi cuadrada P=0.161

**FIGURA 1. SUPERVIVENCIA GLOBAL**



**FIGURA 2. SOBREVIDA DE LOS PACIENTES CON TUMORES CEREBRALES DE ACUERDO A LA FORMACIÓN DE NEUROESFERAS AL CUARTO PASE**



## BIBLIOGRAFÍA

1. Pollack IF. Brain tumors in children. *N Engl J Med* 1994;331:1500–7.
2. Fajardo GA. Epidemiología de los Tumores del Sistema Nervioso Central. *Bol Med Hosp Inf Mex* 1996;
3. McNeil DE, Cote TR, Clegg L, Rorke LB (2002) Incidence and trends in pediatric malignancies medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumor: a SEER update. Surveillance Epidemiology and End Results. *Medical and Pediatric Oncology*, 2002, 39:190–194
4. Roger J, Tobey M, Gilbert V. Tumores del sistema nervioso central. *Pediatr Clin N Am*, 2008; 121-145.
5. Lopez AE, Sepúlveda AC, Rivera H, Cerecedo F, Santacruz E, Valdez M, Arias J, Quintana G. Survival of patients with Medulloblastoma treated with carboplatin and etoposide before and radiotherapia. *Arch med res* 1998; 29:313
6. Read T-A, Hegedus B, Wechsler-Reya R, et al. The neurobiology of neuro-oncology. *Ann Neurol* 2006;6:3–11.
7. Tarbell NJ, Loeffler JS, Silver B, Lynch E, Lavally BL, Kupsky WJ, Scott RM, Sallan SE The change in patterns of relapse in medulloblastoma. *Cancer* 1991;68:1600–1604
8. López AE, Sepúlveda VAC, Betanzos CY. Clinical and Molecular Parameters for risk stratification in Mexican children with Medulloblastoma. *Arch Med Res* 2007;38:769-79.
9. Pomeroy S, Tamayo P, Gaasenbeek M, et al. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 2002;415(6870): 436–42.
10. Reddy AT, Janss AJ, Phillips PC, et al. Outcome for children with supratentorial primitive neuroectodermal tumors treated with surgery, radiation, and chemotherapy. *Cancer* 2000;88(9):2189–93.
11. Robertson PL, Zeltzer PM, Boyett JM, et al. Survival and prognostic factors following radiation therapy and chemotherapy for ependymoma in children: a report of the Children’s Cancer Group. *J of Neurosurg* 1998;88:695–703.
12. Packer RJ, Biegel JA, Blaney S, et al. Atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system: report on workshop. *J Ped Hem/Onc* 2002;24(5):337–42.
2. Kieran MW, Chi SN, Samuel D, et al. Pediatric brain tumor: In: Orkin SH, Fisher DE, Look T, editors. *Oncology of infancy and childhood*. Philadelphia: Elsevier, Inc.; 2009: 623-681

3. Bouvier-Labit C, Chinot O, Ochi C. Prognostic significance of Ki67 and p53 in human glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;24:381-388
4. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255: 1707-10.
5. Eriksson PS et.al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med* 1998; 4:1313-1317.
6. Gritti A, Frolichsthal-Schoeller P, Galli R. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci* 1999; 19: 3287-3297.
7. Reynolds BA, Rietze RL. Neural stem cells and neurospheres- reevaluating the relationship. *Nat Methods* 2005; 2: 333-336.
8. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-111.
9. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, et al. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 2002;39:193-206.
10. Liu G, Yuan X, Zeng Z, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD 133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006;25:67.
11. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100: 15178-83.
12. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63:5821-8.
13. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature* 2004;432:396-401.
14. Yao Y, Tang X, Li S, Mao Y, Zhou L. Brain tumor stem cells: view from cell proliferation. *Surgical Neurology* 2009;71: 274-279
15. Laks DR, Masterman-Smith M, Visney K, et al. Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma. *Stem Cells* 2009; 27: 980-987.
16. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Rev. Cancer* 2005; 5: 275-284.

## ANEXO 1

### MATERIAL Y TÉCNICA

#### Materiales

- Muestra de tumor de SNC
- Tubos de 15 ml

#### Reactantes

- DMEM/F-12
- Penicilina- Estreptomina

#### Equipo

- Incubadora de 5% de CO<sub>2</sub> A 37°C
- Centrífuga
- Hemocitómetro
- Microscopio

### PROCEDIMIENTO

#### PROTOCOLO DE RECEPCIÓN Y PURIFICACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES

La técnica utilizada fue:

1. Obtención de muestra a través de resección tumoral. En el postquirúrgico inmediato deberá transportarse hacia el laboratorio en medio de cultivo.

Tener listo:

- Campana de flujo laminar limpia y desinfectada con etanol al 70% y prendida con 20 minutos de anticipación.
- Estuche de disección estéril.
- Frascos para cultivo celular de 25 cm<sup>3</sup> estériles.
- Tubos eppendorff.
- Pipeteador y pipetas serológicas estériles.
- Tubos falcon estériles de 15 ml y 50 ml.
- Caja petri estéril.
- Criotubos.
- Colector de desechos.
- Azul de Tripano.
- Medio de cultivo.
- Baño a 37°C.

- Centrifugadora para tubos cónicos.
  - Incubadora (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).
2. Pasar otro ciclo de luz UV antes de trabajar.
  3. Depositar la muestra en la caja de petri con ayuda de las pinzas de disección y 3 ml de medio de transporte.
  4. Disgregar el tumor. Si el tumor es muy duro deberá centrifugarse a 1500 rpm y se desecha el sobrenadante y se le agrega tripsina, se disgrega de forma mecánica la muestra con ayuda de bisturí obteniendo fragmentos lo más pequeños posible y se deja incubando por 4 hrs a 37°C, durante ese tiempo se monitorea hasta tener una mezcla homogénea y después se disgrega con pipeteo. En caso de que el tumor sea blando, bastará con pipetear muchas veces para disgregar la muestra hasta obtener una solución homogénea.
  5. Una vez disuelta la muestra, se coloca en un tubo falcon con 5 ml de ficoll frío (recién salido del refrigerador) y después se le agrega la muestra lentamente por las paredes cuidando de no romper la interfase.
  6. Se centrifuga a 2000 rpm durante 30 min a 4°C.
  7. Se recupera la interfase en otro tubo falcon con medio de cultivo suficiente para alicuotar a 10 ml con todo y muestra.
  8. Se centrifuga a 1000 rpm durante 10 min.
  9. A la caja de cultivo se le agrega medio de cultivo y se mete a la incubadora para aclimatar el medio.
  10. Se descarta el sobrenadante.
  11. Se resuspende el botón con 1 ml de medio de cultivo bastantes veces.
  12. Se toman 10 µl para realizar conteo de viabilidad celular.
  13. Se toman 10 µl de azul de tripano, se pone en un tubo eppendorff y se mezcla con los 10 µl de la muestra, se homogeneiza y se cuenta en cámara de Neubauer. Después del conteo celular se decide la alícuota para sembrar o congelar.
  14. La alícuota que se sembrará directamente en la caja de cultivo y se pone en una superficie plana durante 10 min para que se asienten las células y después se introduce en la incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.



## PROCEDIMIENTO DE RESIEMBRA O PASE

1. Tener listo dentro de la campana de flujo laminar previamente lavada con alcohol al 70% y desinfectada con luz UV por 20 min:
  - Medio de cultivo DMEM-F12 libre de suero y de antibiótico a 37°C.
  - Una botella de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> nueva que contenga de 8-10 ml de medio de cultivo completo.
  - Recipiente para coleccionar desechos.
  - Solución de tripsina más EDTA 0.05% estéril.
  - Pipetas serológicas estériles de 10 ml y 5 ml.
  - Pipeteador, micropipeta y puntas de 10 µl y 1000 µl estériles.
  - Cámara de Neubauer.
  - Azul tripano diluido.
2. Retirar el medio de cultivo con pipeta en un tubo falcon de 15 ml.
3. Cubrir la monocapa celular con 2 ml de tripsina más EDTA 0.05% estéril.
4. Incubar a 37°C durante 5 a 10 min, revisando al microscopio el progreso de la reacción.
5. Una vez que las células se vean redondeadas y despegadas en la superficie de la caja, neutralizar la reacción de la tripsina con un exceso de medio de cultivo, en este caso 3 ml obteniendo un volumen final de 5 ml.
6. Resuspender y disgregar las células por pipeteo suave contra la pared de la botella inicial (25 a 30 veces).
7. Se centrifuga la muestra a 1500 rpm durante 5 min y se descarta el sobrenadante.
8. Se le agrega 1 ml de medio de cultivo y se resuspende la solución.
9. Tomar una alícuota de 10 µl de la suspensión celular y cuantificar la muestra de células en suspensión para determinar el inóculo deseado a crecer.
10. Sembrar el inóculo en la botella nueva que contenga la cantidad necesaria de medio de cultivo completo para llevar el volumen final a aproximadamente 5 ml.
11. Dejar reposar la caja en posición horizontal a temperatura ambiente durante 10 min.
12. Incubar a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

El cambio de medio se realiza aproximadamente cada tres a siete días, dependiendo de la velocidad con que se acidifique el medio y la proliferación de las células.

ANEXO 2

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

**“Asociación de la formación de neuroesferas con la respuesta a tratamiento y sobrevida en pacientes pediátricos con Tumor Neuroectodérmico Primitivo, Ependimoma y Tumor Teratoide Rabdoide de Sistema Nervioso Central.”**

Nombre	Sexo: F ( ) M ( )
Edad: _____ meses	Afiliación
Diagnóstico histopatológico:	LCR al diagnóstico Negativo ( ) Positivo ( )
IRM basal Tumoración _____ cm <sup>2</sup>	IRM post 2 / LCR Tumoración _____ cm <sup>2</sup>
IRM post 4 / LCR Tumoración _____ cm <sup>2</sup>	IRM post 6/ LCR Tumoración _____ cm <sup>2</sup>
Fecha del diagnóstico	Fecha de progresión
Fecha de defunción	Causa defunción
Formación de neuroesferas: Basal Si ( ) No ( )	Primer pase Si ( ) No ( )
Segundo pase Si ( ) No ( )	Tercer pase Si ( ) No ( )
Cuarto pase Si ( ) No ( )	
Quimioterapia recibida _____ cursos	Radioterapia recibida _____ sesiones
Respuesta al tratamiento <input type="checkbox"/> Enfermedad estable <input type="checkbox"/> Respuesta parcial <input type="checkbox"/> Respuesta completa <input type="checkbox"/> Progresión tumoral	