



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



“Asociación de la presencia de Neuroesferas y proliferación celular de cultivos tumorales con respuesta al tratamiento y sobrevida de niños con Astrocitoma”

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA.

Investigador principal:

Dr. Enrique López Aguilar

Jefe de Servicio de Oncología Pediátrica del Hospital de Pediatría CMN SXXI

Asesor Metodológico:

Dra. Ana Carolina Sepúlveda Vildósola

Directora de Educación Del Hospital de Pediatría CMN SXXI

Colaboradores:

Biol. Jose Luis Zárate Alvarado

Tesista:

Dra. María Andrea Ponce de León Herrera

Residente de Oncología Pediátrica

Junio 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UMAE HOSPITAL DE PEDIATRÍA
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI**



**PRESIDENTE DEL JURADO
DR. ENRIQUE LOPEZ AGUILAR**

VOCALDR. HECTOR JAIME GONZALEZ CABELLO

VOCAL DRA. GEORGINA SIORDIA REYES

VOCAL DRA. ANA PAULINA RIOSCOVIAN SOTO

VOCAL DR. JAIME DIEGO-PEREZ RAMIREZ

INDICE

PAGINA

RESUMEN.....	4
MARCO TEORICO.....	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	15
OBJETIVOS GENERALES.....	15
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	15
HIPOTESIS.....	16
JUSTIFICACION.....	17
PACIENTES MATERIAL Y METODOS.....	18
RESULTADOS.....	27
DISCUSION.....	30
BIBLIOGRAFIA.....	38
ANEXOS.....	41

RESUMEN

INTRODUCCION

Los tumores del sistema nervioso central ocupan en pediatría el 2º lugar de cáncer infantil solo después de las leucemias y son el primer lugar de tumores sólidos. Los astrocitomas son el tipo de tumores primarios del SNC más frecuentes representando el 50% de todos ellos.

Se han identificado también diversos marcadores biomoleculares que influyen en el pronóstico de estos pacientes entre ellos los factores de crecimiento celular que son proteínas que en condiciones fisiológicas regulan el crecimiento y la diferenciación celular.

La hipótesis sobre las células madre tumorales o neuroesferas dicta que los tumores se originan de un solo tipo celular autorrenovable, el cual da origen al resto del tumor incluyendo una variedad de células más diferenciadas, la subpoblación de células que expresa el marcador de superficie de las células madre neuronales CD 133 se ha identificado en los tumores malignos y se ha probado que confiere mayor propiedades malignas como tumorigénesis, radioresistencia y quimioresistencia a las células que los expresan de aquellas con marcador CD 133 negativo.

OBJETIVO Determinar si la presencia de neuroesferas en cultivos tumorales de células madre tumorales se relaciona con la sobrevida y respuesta al tratamiento de niños con astrocitomas

RESULTADOS. Se incluyeron en el estudio 24 pacientes con diagnóstico de astrocitoma. Once pacientes (45.8%) presentaron una o más neuroesferas en el cultivo basal, 7 pacientes (29.1%) , presentaron neuroesferas al primer pase, 6 pacientes (25%) al segundo pase y solo 5 (20.8%) al tercer pase, ninguno presentó neuroesferas al 4º pase. Los pacientes que presentaron neuroesferas en el cultivo basal tuvieron una sobrevida de 39.51% a 21 meses con una mediana de 15 meses (11-19) en comparación con los que no presentaron neuroesferas en el cultivo basal con sobrevida de 81.48% a 21 meses

CONCLUSIONES: Se encontró una clara asociación entre el desarrollo de neuroesferas y la evolución de nuestros pacientes, aunque esto no es estadísticamente significativo como el tamaño de la muestra es pequeña, ya que de los 6 pacientes que fallecieron tenían 4 neuroesferas basales en la cultura y el primer paso, como así como para la enfermedad progresiva a los 6 meses 5 de 6 pacientes con enfermedad progresiva, tenía neuroesferas basales en cultivo y de primer paso.

MARCO TEORICO

Los tumores del sistema nervioso central ocupan en pediatría el 2º lugar de cáncer infantil solo después de las leucemias y son el primer lugar de tumores sólidos, los más frecuentes son los que derivan de la glía y de estos los astrocitomas. En estudios realizados en población del distrito federal la incidencia es de 17 casos por millón por año, frecuencia de presentación de los tumores cerebrales es de 12%.¹

Los astrocitomas son el tipo de tumores primarios del SNC más frecuentes representando el 50% de todos ellos, estos tumores neuroepiteliales pueden aparecer a cualquier edad especialmente en niños y adolescentes y son más frecuentes en hombres que en mujeres.² Su localización más frecuente es en cerebelo en un 25% seguida de hemisferios cerebrales y de la línea media finalmente la localización menos frecuente en la vía óptica y tallo cerebral.³ La OMS los clasifica de acuerdo a sus características histopatológicas como celularidad, atipia nuclear índice mitótico proliferación micro vascular y necrosis en 4 grados de malignidad (WHO grados I-IV) en grado creciente de malignidad de acuerdo a esta clasificación los glioblastomas multiformes representan el mayor grado de malignidad.

Se originan de los astrocitos y sus células precursoras; la génesis de estos tumores envuelve un gran número de alteraciones genéticas incluyendo la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores, lo que lleva a un crecimiento progresivo y desordenado, alteraciones apoptóticas, movilidad celular y vías de invasión.⁴

Los factores del mal pronóstico ya conocidos son edad menor a tres años, localización e histología⁵ La estratificación por riesgo es muy importante el análisis de riesgo puede diferenciar a los pacientes en un grupo que requieran tratamiento agresivo de un grupo de bajo riesgo para el que es suficiente un protocolo terapéutico de menor agresividad⁶ La supervivencia media de los pacientes con astrocitomas según la clasificación de la OMS es de 5 a 7 años para los grado I de 2.5 a tres años para el grado II de 1.5 a dos años para el

grado III y de un año o menos para el grado IV aunque en años recientes se ha logrado mejorar la sobrevida, la sobrevida de los astrocitomas según el SEER (Surveillance Epidemiology, End Result) a los 5 años es de 50%,⁷ la sobrevida para estos pacientes no ha cambiado mucho desde 1970 en combinación la sobrevida de pacientes adultos y niños no excede los 12 meses especialmente en gliomas de alto grado en los que la mediana de sobrevida es de 40-52 semanas, ensayos realizados por SIOP Y COP a finales de los 70 y principios de los 80 muestran el beneficio del tratamiento de estos pacientes con quimioterapia adyuvante. Actualmente el tratamiento de estos tumores es multidisciplinario; quirúrgico con el objetivo de reseca la mayor cantidad posible, quimioterapia y radioterapia⁸.

En el Hospital de Pediatría de CMN se llevo a cabo un estudio fase II con el uso de ifosfamida, carboplatino y etopósido (ICE) pre irradiación donde se observo una reducción del tumor de 80% al 100% posterior a 4 cursos utilizando la modalidad de (QT RT QT) obteniéndose una reducción tumoral en la mayoría de los pacientes obteniendo un 72% de respuesta parcial o completa⁸.

Se han identificado también diversos marcadores biomoleculares que influyen en el pronóstico de estos pacientes entre ellos los factores de crecimiento celular que son proteínas que en condiciones fisiológicas regulan el crecimiento y la diferenciación celular, otro campo de estudio respecto al pronóstico de pacientes con tumores cerebrales corresponde al estudio de la apoptosis o muerte celular programada^{5,6,7,8}

El comportamiento de los astrocitomas en la edad pediátrica no se ha elucidado por completo y se ha observado que solo una parte de las células dentro del tumor tiene capacidad carcinogénica en modelos in vivo y expresan el marcador de células troncales de cáncer CD 133^{6,9,10}, la expresión de este marcador en astrocitomas de pacientes adultos se ha intentado asociar con el pronóstico y grado de malignidad sin embargo en población pediátrica el comportamiento molecular de los gliomas es diferente al de los adultos, por lo que en nuestro hospital se realizo un estudio entre la asociación de CD 133 con el pronóstico de astrocitomas pediátricos, se logro demostrar una diferencia de sobrevida de 22.5% entre los tumores CD 133+ y CD 133- siendo

esta peor para los CD 133+ . Entre mayor agresividad tumoral mayor expresión de células iniciadoras de cáncer.⁶

Se ha reportado la presencia de células madres tumorales que expresan los marcadores Nestina y CD 133 en una gran variedad de tumores, los gliomas son generados a partir de estas células madres tumorales, la cuales comparten muchas propiedades con las células madres neuronales, expresan el marcador nestina el cual es una proteína filamentosa intermedia expresada en células proliferantes durante diferentes etapas del desarrollo de una gran variedad de tejidos embrionarios, se encuentra también relacionada en la organización del citoesqueleto, señalización celular y organogénesis, metabolismo celular y representa la proliferación y migración de células progenitoras de múltiples linajes. CD133 también llamada Prominin es un marcador celular expresado en células madres neuronales normales y asociado a células tumorales cerebrales⁹.

Sin embargo a pesar de un mayor entendimiento sobre los parámetros inmunohistoquímicos, parámetros genéticos y epigenético la sobrevivencia de los pacientes con diagnóstico de tumor cerebral específicamente astrocitomas es reportada en la mayoría de los estudios internacionales de 30 a 40% en cinco años, esta ha mejorado en los últimos 15 años, debido al empleo de esquemas de quimioterapia más intensivos que incluyen fármacos que han probado su efectividad *in Vitro* e *in Vivo*, tal es el caso de carboplatino, que aunado a la sinergia existente entre la combinación de ifosfamida y VP16 ha probado su efectividad en un gran número de estudios. La tendencia actual para este número de pacientes es el tratamiento individualizado de acuerdo al riesgo que tengan, tanto de morir como de respuesta al tratamiento, para lo cual es muy importante conocer el comportamiento bio-molecular de estos tumores para poder dirigir de manera más aceptada un tratamiento⁵

La importancia de identificar células de iniciación en tumores cerebrales es que ofrece un conocimiento acerca de la fisiopatología en pacientes pediátricos, provee una nueva visión o idea de los mecanismos de resistencia de los tejidos cancerosos a los tratamientos actuales e identifica nuevos blancos celulares para el tratamiento.⁷

Los tumores cerebrales típicamente comprenden células morfológica y fenotípicamente diversas que expresan una variedad diversa de marcadores de

linaje neuronal, así tumores que comparten morfología y fenotipo pueden presentar diferente respuesta al tratamiento y pronóstico. Existe evidencia en otro tipo de cánceres como en las leucemias que las células madre leucémicas poseen la capacidad de autorrenovación y proliferación, en cuanto a células madre de tumores cerebrales pediátricos se ha logrado aislar células madres neuronales normales en cultivos, como neuroesferas de derivados clonales, para análisis tumores cerebrales, con el fin de analizar y caracterizar las poblaciones tumorales.¹¹

La hipótesis sobre las células madre tumorales dicta que los tumores se originan de un solo tipo celular autorrenovable, el cual da origen al resto del tumor incluyendo una variedad de células más diferenciadas, la subpoblación de células que expresa el marcador de superficie de las células madre neuronales CD 133 se ha identificado en los tumores malignos y se ha probado que confiere mayor propiedades malignas como tumorigenesis, radioresistencia y quimioresistencia a las células que los expresan de aquellas con marcador CD 133 negativo¹².

CD133 es una nueva proteína de superficie celular transmembrana de 120 kDa que recientemente se considero marcador de las células madre neuronales¹³ su expresión en las neuroesferas se relaciona de manera positiva con la capacidad de autorrenovación, por lo tanto CD 133 positivo identifica una subpoblación de células tumorales con características y actividad de células madre.¹¹

Se ha demostrado la presencia de células madre tumorales con la capacidad de proliferación en los astrocitomas humanos. La correlación entre células madre tumorales y el grado de malignidad sugiere la relación funcional entre el comportamiento de los gliomas humanos y la presencia de células madre tumorales y neuroesferas¹².

El primero en describir la presencia in Vitro de células madre tumorales y sus propiedades en tumores cerebrales fue Ignatova y cols en 2002, demostrando la presencia de células clonogénicas formadoras de neuroesferas en especímenes quirúrgicos de glioblastomas multiformes, las cuales crecían bajo un medio con condiciones favorables para células neuronales normales, se demostró que las células madre tumorales son CD 133 + y contribuyen a la

tumorigenesis y son capaces de diferenciarse en diferentes linajes celulares. El estado proliferativo que presentan estas células concede al tumor cerebral una ventaja, que lleva a al crecimiento incontrolado y diseminación de células cancerígenas.¹⁴

Las células madres tumorales cultivadas en un medio libre de suero, con un sustrato no-adhesivo y en presencia de factor de crecimiento de fibroblastos (b-FGF) y factor de crecimiento epidermoide (EGF), van a dar origen a un conglomerado de células redondas, flotantes y en tercera dimensión llamadas neuroesferas. La formación de neuroesferas en combinación con su habilidad de proliferar en pases repetidos es considerado actualmente como una de las propiedades que presentan las células madres en cultivos tumorales, incluso estas células madres pueden llegar a mantenerse en condiciones idénticas por más de 4 meses.

La hipótesis de las células madres tumorales se basa en el paradigma en el que solo una pequeña subpoblación de células tumorales proliferan de forma extensa para sustentar el crecimiento y progresión de un tumor entero, el numero de divisiones de las células madre tumorales esta directamente correlacionado con el grado de malignidad de los astrocitomas humanos¹².

Existen tres piezas de evidencia que apoyan la teoría de las células madres tumorales:

1. La generación de conglomerados celulares (neuroesferas), que se autorenewan y proliferan, estas células pueden ser aisladas de cultivos tumorales de cualquier clase de tumores malignos celulares,¹¹ en 2003 Hemmati y cols sustentaron la presencia de células madres tumorales en tumores cerebrales pediátricos, al encontrar que estos tumores contienen células progenitoras llamadas progenitoras derivadas de tumores, que mostraron la capacidad de formación de esferas.
2. La capacidad de autorrenovación al sembrarlas nuevamente en medios de cultivos.
3. La capacidad de formar un tumor al ser inoculado en un modelo murino. Se dice que 100 células CD 133 son suficientes para producir un tumor al ser inoculado¹⁵.

Mediante estudios de imagen se ha demostrado que los astrocitomas se originan en dos áreas, una zona subventricular del ventrículo lateral y en el

hipocampo, en estas zonas ya había sido previamente demostrado que son reservorios de células madre neuronales (normales), lo que sugiere que los astrocitomas podrían originarse de la transformación de células madre neuronales en células madre tumorales las cuales expresan nestina y otros marcadores neuronales. Los marcadores moleculares han jugado un papel importante en la identificación de las células madre tumoral, se ha reportado la presencia de nestina (glioblastomas) CD 133 (gliblastomas, meduloblastomas endimomas), Musachi-1 (glioblastomas). SOX-2 (glioblastomas) Bmi-1 (glioblastomas). Yue Hui Ma y cols., estudiaron la presencia de todos estos marcadores en astrocitomas de diferente grado de malignidad, encontrando en astrocitomas grado IV la mayor cantidad de células positivas a CD 133, nestina, SOX-2 y Musashi 1. La presencia de células CD133+ se correlaciona con el grado de malignidad de los astrocitomas, una gran proporción de estas células llega a forma neuroesferas. Los astrocitomas fueron abundantemente positivos para nestina, el número de células positivas incremento conforme el grado de malignidad, encontrándose el mayor grado en astrocitomas GIV .²

Singh y colaboradores reportan la identificación y purificación de una célula proveniente de un tumor cerebral primario de diferentes fenotipos la cual tiene la marcada capacidad de proliferación renovación y diferenciación, esta célula representa la minoría de la población celular tumoral y se identifico por expresar el marcador de superficie CD 133 llamada célula madre de tejido tumoral, también fue capaz de diferenciarse in vivo en células fenotípicamente idénticas a las células tumorales in situ, esto sugiere que los tumores cerebrales pueden generarse a partir de células madre de tejido tumoral que comparten un fenotipo parecido. Las células de los cultivos tumorales que formaron neuroesferas presentaron nestina una proteína filamentosa encontrada en células indiferenciadas del sistema nervioso central y un marcador característico de las células madre neuronales, también expresaron CD 133 considerado como un nuevo marcador de las células madres de tejido tumoral. En este estudio se encontró una relación entre el subtipo patológico del tumor y la proliferación de neuroesferas, presentando mayor capacidad de autorrenovación las células madre tumorales provenientes de tumores más agresivos, así las neuroesferas provenientes de meduloblastoma presentaron

mayor autorrenovación en comparación con las neuroesferas provenientes de astrocitomas pilocíticos.¹¹

El análisis molecular de las células madres tumorales puede llevar a la identificación de nuevas vías de diferenciación autorrenovación y proliferación lo cual abre una posibilidad de blancos terapéuticos y lograr la erradicación del tumor mediante las células madres tumorales, de igual forma la presencia de estas células podría ser considerado como un factor pronóstico de malignidad y respuesta a la tratamiento.¹⁶

Como ya se comento la teoría de las células madre tumorales sostiene que estas de estas células madre son de las que provienen los tumores y por lo tanto representan un blanco para el advenimiento de nuevas estrategias terapéutica, también será importante determinar si la resistencia al tratamiento es dado por características de las propias células madres sus mutaciones y evolución, así como redundancia en las vías moleculares y la adaptación al complejo sistema de las células madres tumorales. Nuevas terapéuticas apuntando las vías esenciales y los factores de transcripción de las células madres tumorales puede revelar la siguiente generación de opciones terapeuticas.^{17 18 19}

Se ha descrito que las células madre tumorales que expresan CD133+ son más resistentes tanto a radioterapia como a esquemas comunes de quimioterapia y que por lo tanto las células madres tumorales podrían ser la fuente de resistencias tumorales y recurrencias, por lo que Hussein y cols llevo a cabo un estudio donde se caracterizo a las células madres tumorales de siete líneas celulares recién establecidas, determino el porcentaje de células madres tumorales y las características de crecimiento de neuroesferas fueron analizadas, se evaluó el potencial de diferenciación y se usaron modelos xenograficos para establecer la tumorigenicidad. También determino la resistencia a etopósido derivada de la presencia de neuroesferas, la clona formadora de neuroesferas demostró resistencia al etopósido, las células derivadas de neuroesferas fueron significativamente más resistentes a etopósido comparadas con las no formadoras.²⁰

Laks y cols estudiaron la formación de neuroesferas en cultivos *in vivo* y su asociación con el resultado clínico en una cohorte de 32 pacientes adultos con gliomas y una subpoblación de 15 pacientes con glioblastoma multiforme, existiendo un mayor riesgo de progresión en pacientes con glioma cuyos cultivos celulares tuvieron capacidad tumorigénica comparados con los que no la tuvieron. La formación de neuroesferas permaneció como un predictor significativo de resultado clínico independientemente de la expresión de Ki67, el análisis multivariado realizado demostró que la formación de neuroesferas es un predictor de progresión tumoral independiente del grado de malignidad del glioma así como de la edad del paciente, demostrando así que *in Vitro* el crecimiento de neuroesferas refleja la severidad clínica de los gliomas. La presencia de neuroesferas en el grupo de pacientes adultos con glioma se asocio con un riesgo de muerte de 7.71 ($p=.013$) y un riesgo de progresión de 5.83 ($p=.002$), en el grupo de glioblastoma multiforme la presencia de neuroesferas se asocio con un riesgo de muerte de de 10 ($p=.001$) sin embargo no se asocio con la presencia de progresión. Después de 2 años se observo mediante curvas de sobre-vida de Kaplan Meier que el grupo de gliomas formadores de neuroesferas tuvo una sobrevida de 31% mientras que el grupo que no presento neuroesferas tuvo una sobrevida de 86%, en el grupo de glioblastoma multiforme la sobrevida fue de 48% para el grupo formador de neuroesferas y de 100% para lo que no las formaron.²¹

Thirant y cols lograron aislar células tumorales con capacidad de autorrenovación en 55 muestras de tumores pediátricos independientemente de su histopatología y grado de malignidad, de acuerdo a la histología encontraron que el 57% de tumores embrionarios y gliomas de bajo grado el 70% de ependimomas y el 91% de gliomas de alto grado formaron neuroesferas en los cultivos celulares bajo técnicas de biología celular, el análisis de supervivencia que realizaron en este estudio demostró una mayor tasa de mortalidad y la asociación de aislamiento de células con capacidad de autorrenovación ($P=0.013$). Este estudio demuestra el aislamiento en diferentes estirpes de tumores cerebrales pediátricos en contrapunto con lo encontrado en adultos es los cuales solo se han logrado aislar neuroesferas en pacientes con glioblastoma multiforme.^{22,23}

Panosyan et al. realizaron un estudio donde incluyeron 56 muestras de tumores cerebrales pediátricos (astrocitomas y embrionarios) de los cuales 21 muestras formaron neuroesferas renovables en 3 pases consecutivos, este numero de pases fueron suficientes para poder asociarse a proliferación, aunque algunos cultivos se mantuvieron vivos hasta 21 pases, sin que esto tuviera mayor relevancia. Se encontró que pacientes más jóvenes presentaron mayor formación de neuroesferas, en cuanto a la localización encontraron formación de neuroesferas en el 34% de tumores supratentoriales y 43% de lesiones infratentoriales, por histología el 50% de los astrocitomas de alto grado formaron neuroesferas y 57% de los tumores embrionarios. En general el grupo que formo neuroesferas solo el 13% tuvo una sobrevida libre de enfermedad a 3 años; mientras que el 86% de pacientes del grupo que no formaron neuroesferas tuvo una sobrevida libre de enfermedad a 3 años, concluyendo que la formación de neuroesferas puede predecir el curso clínico de tumores cerebrales gliales y embrionarios en pediatría.²⁴

Gracias a estos estudios se ha podido identificar a los pacientes con tumores formadores de neuroesferas como pacientes con más alto riesgo de muerte y progresión, sin embargo estudios de este tipo no se han realizado en población pediátrica donde los tumores de la glía representan la mayor parte de los tumores de SNC, de ahí la importancia de este estudio donde se estudiara la población pediátrica en este hospital, lo cual ayudara a comprender la biología y comportamiento de las células madres tumorales en tumores cerebrales pediátricos así como su asociación con la sobrevida y evolución lo cual nos podrá llevar a iniciar tratamientos más agresivos y dirigidos de acuerdo al comportamiento biológico de los tumores.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los astrocitomas constituyen los tumores del sistema nervioso central más frecuentes en la infancia, los cuales de acuerdo al grado de malignidad de la OMS presentan diferentes tasas de sobrevida siendo esta de menos de un año para los astrocitomas de alto grado, debido a sus múltiples características histológicas y grados de malignidad se han realizado múltiples estudios de marcadores inmunohistoquímicos y moleculares para adaptar un modelo de tratamiento y sobrevida, ya que esta como se comentó es menor de un año en tumores de alto grado, de ahí la importancia de nuevas líneas de investigación para determinar la malignidad de los astrocitomas y ajustar una terapéutica apropiada.

PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿La presencia de neuroesferas en cultivos tumorales tiene una asociación con la sobrevida y respuesta al tratamiento medida por resonancia magnética, en niños con astrocitoma?

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la presencia de neuroesferas en cultivos tumorales de células madre se relaciona con la sobrevida y respuesta al tratamiento de niños con astrocitomas

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Investigar si las neuroesferas se relacionan con el grado de malignidad y comportamiento de los astrocitomas independientemente de su histología
2. Determinar si la presencia de neuroesferas se asocia en la respuesta al tratamiento
3. Identificar si la presencia de neuroesferas se asocia con la sobrevida en niños con astrocitomas

HIPOTESIS

1. La formación de neuroesferas en cultivos tumorales se asocia con histologías de alto grado de malignidad.
2. La respuesta a tratamiento será del 30% menor en el grupo de pacientes con desarrollo de neuroesferas, según lo referido en la literatura.
3. La sobrevida de los pacientes que desarrollaron neuroesferas será 30% menor con respecto al grupo de pacientes que no las formaron, según lo referido en la literatura.

JUSTIFICACION

El cáncer en niños es una de las principales causas de mortalidad, ocupando el segundo lugar de mortalidad en el grupo de 10-14 años después de los accidentes, siendo los tumores del sistema nervioso central los tumores sólidos mas frecuentes, solo después de leucemias en frecuencia los cuales representan un 12% de presentación; y tienen una elevada mortalidad.

Hoy en día el cáncer infantil es una de las prioridades en nuestro sistema de salud, de ahí la importancia de crear nuevas líneas de investigación, en adultos ya se ha asociado la presencia neuroesferas con la sobrevida y respuesta al tratamiento en tumores del SNC, sin embargo en la población pediátrica aun es un campo nuevo de investigación. Mediante la realización de cultivos celulares, se ayudara a comprender la biología y comportamiento de las células madres tumorales en tumores cerebrales pediátricos así como su asociación con la sobrevida, evolución y pronóstico, lo cual será la base para estudio posteriores que en un futuro puedan identificar nuevos factores de riesgo y asi orientar el tratamiento.

PACIENTES MATERIAL Y METODOS

LUGAR DE REALIZACION DEL ESTUDIO: Servicio de Oncología Pediátrica y Laboratorio de investigación de tumores de sistema nervioso central del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS entre el 01 Mayo 2010 al 31 Mayo 2012

DISEÑO:

Se trata de una cohorte de pacientes con diagnostico de astrocitoma

Número de mediciones: longitudinal

Número de grupos: descriptivo

Por tener una maniobra: observacional

Temporalidad: prospectivo

POBLACION EN ESTUDIO: Pacientes pediátricos con diagnostico establecido por patología de astrocitomas, de primera vez

CRITERIOS DE INCLUSION

1. Pacientes pediátricos de 0 años a 16 años 11 meses con diagnostico por patología de astrocitoma
2. Pacientes de ambos sexo
3. Muestra tumoral de tejido para cultivo celular de cada paciente, la cual debe de estar en condiciones adecuadas para su cultivo
4. Que los padres acepten participación y obtención de muestra de tejido tumoral
5. Consentimiento informado firmado

CRITERIOS DE EXCLUSION

1. Pacientes que por algún motivo no se pueda tomar biopsia de la tumoración
2. Pacientes que no acepten participar

CRITERIOS DE ELIMINACION

1. Pacientes cuya biopsia se insuficiente e inadecuada para la toma de cultivo.
2. Pacientes cuyo cultivo celular presente contaminación que impida la correcta evaluación
3. Pacientes con datos incompletos

METODOS

Los pacientes con Astrocitomas que se incluyeron en este estudio recibieron un esquema de quimioterapia ajustado al grado de malignidad.

1. Grado I: con una resección quirúrgica completa, se envía a vigilancia, resección incompleta reciben radioterapia al lecho quirúrgico a dosis de 50-55 Gy. En caso de progresión tumoral detectada por IRM, reciben el siguiente esquema de quimioterapia con Vincristina (2mg/m²/dosis) Día 1 y Carboplatino (100mg/m²/dosis) día 1 y 2 se repite cada 4 semanas por 12 ciclos
2. Grado II: Independientemente del grado de resección reciben esquema de quimioterapia con Vincristina (2mg/m²/dosis) Día 1 y Carboplatino (100mg/m²/dosis) día 1 y 2 cada curso se repite cada 4 semanas por 12 ciclos, además de Radioterapia a lecho quirúrgico después del 4 ciclo a dosis de 50-55 Gy.
3. Grado III y IV: Independientemente del grado de resección reciben quimioterapia con esquema ICE/TMZ Ifosfamida (2gr/m²/dosis) día 1,2 y 3, Carboplatino (400mg/m²/dosis) día 1, Etopósido (VP 16) (100mg/m²/dosis) día 1, 2 y 3 Temozolomida (100mg/m²/dosis) día 1 al 5, y radioterapia a lecho quirúrgico después de 4^o ciclo a dosis de 55-60 Gy.

No se administra radioterapia a menores de 3 años. Todos los pacientes se apoyan posterior a cada ciclo de quimioterapia con factor estimulante de colonias granulocíticas (Filgastrim) a dosis de 10mcg/kg/dosis por 5 dosis y solo en caso necesario transfusiones de paquete globular (10ml/kg) y plaquetas (4 unidades/m²).

Los esquemas se administraron cada 4 semanas por 6 cursos.

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 al tratamiento de acuerdo a los criterios de RECIST²⁵ en base a la resonancia magnética postquirúrgica.

RESPUESTA COMPLETA: reducción de la tumoración en un 100%.

RESPUESTA PARCIAL: reducción de la tumoración mayor al 30%.

ENFERMEDAD ESTABLE: respuesta tumoral que no cumple criterios de RP o EP

ENFERMEDAD PROGRESIVA: progresión de la tumoración mayor al 20%

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

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

La recolección de datos se realizó mediante hoja VER ANEXO 2

VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Definición Operacional	Tipo de Variable	Escala de Medicion	Unidades o categorías
Sexo	Conjunto de caracteres que diferencian a la especie humana en hombre y mujer	Sexo fenotípico y referido en el expediente	Universal	Cualitativa nominal	Femenino o masculino
Edad	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo o tiempo de vida en años.	Edad al momento de la enfermedad de acuerdo a lo referido en el expediente	Universal	Cuantitativa Continua	Años
Formación de neuroesferas	Formación de colonias esféricas de células neurales que crecen en suspensión en cultivos <i>in vitro</i> a partir de cultivos primarios de SNC	Formación de colonias esféricas de células neurales que crecen en suspensión en cultivos <i>in vitro</i> a partir de astrocitomas en 4 resiembras	Independiente	Cualitativa nominal	Ausencia o presencia en cultivo basal 1º 2º 3º y 4º pase
Localización	Ubicación espacial de cualquier elemento	Localización del tumor intracraneal	Independiente	Cualitativa nominal	Cerebelo Talamo Tallo Mesencefalo Neuroeje Hemisferico Nervio óptico
Histología	Características histopatológicas como celularidad, atipia nuclear índice mitotico proliferación microvascular y necrosis	Grado de malignidad referido por patología	Dependiente	Cualitativa nominal	Pilocitico Difuso Anaplasico Glioblastoma
Respuesta tumoral	Respuesta por imagen de la tumoración en cm.	Respuesta por imagen después de 2, 4 y 6 cursos de QT	Dependiente	Cualitativa Nominal	Respuesta completa Respuesta parcial Enfermedad Estable Enfermedad Progresiva
Sobrevida	Refleja la proporción de personas vivas a un tiempo específico 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 que finaliza el estudio	Dependiente	Cuantitativa continua	Meses

TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tipo de muestreo fue por conveniencia ya que se incluyó a todos los pacientes con astrocitoma en el periodo de tiempo especificado para la realización de este estudio.

ANALISIS ESTADISTICO

1. Estadística descriptiva. Se realizó estadística descriptiva, frecuencias simples, prueba X^2 , para comparar el porcentaje de respuesta tumoral, y cálculo de sobrevida de acuerdo al método de Kaplan Meyer, con calculo de Log Rank Test para definir diferencia entre ambas curvas de sobrevida.

FACTIBILIDAD

Se conto con los recursos humanos para la realización este estudio.

- Para cada paciente con diagnóstico de astrocitoma de alto grado con expediente clínico completo y cultivo celular.
- Médico subespecialista en Oncología Pediátrica.
- Médico Oncólogo Pediatra tutor del estudio.

Laboratorio de investigación donde se realizó cultivo celular.

ASPECTOS FINANCIEROS

Se conto con los recursos financieros propios de la unidad, medios de cultivo, incubadora, recipientes, medios de transporte, medios de crecimiento celular, campana de flujo laminar, computadoras, microscopios invertidos y todo el equipamiento necesario para llevar a cabo el protocolo de investigación, sin

embargo se solicitó apoyo de financiamiento al FIS para compra de reactivos y material de cultivo.

ASPECTOS ETICOS

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

Se dio a firmar a los padres o tutores un consentimiento informado para la realización y conservación del cultivo tumoral.

De acuerdo a la Ley General de Salud, el Hospital cuenta con autorización para conservación de tejidos humanos

DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO

1. Se incluyeron a todos los pacientes con diagnóstico de astrocitoma del 1º de Mayo de 2010 al 31 de Mayo del 2012, se obtuvieron los datos a partir del expediente clínico y se solicitó muestra de tejido tumoral al realizarse biopsia o resección quirúrgica
2. Una vez obtenida la muestra se realizó cultivo primario en el laboratorio de investigación.
3. Se documentó la presencia o no de neuroesferas en cada uno de los pases realizados de el cultivo celular, por un bilogo molecular que estará cegado al resultado de cada paciente.
4. Se realizó estudios de imagen por RM a los pacientes después del 2º 4º y 6º ciclos de QT evaluando la respuesta tumoral. De acuerdo a los criterios de RECIST
5. Se realizó análisis estadístico para determinar la asociación entre presencia de neuroesferas y sobrevida de los niños con tumores cerebrales tipo astrocitomas.

MATERIAL Y TECNICA

Materiales

- Muestra de tumor de SNC
- Tubos de 15 ml

Reactantes

- DMEM/F-12
- Penicilina- Estreptomina

Equipo

- Incubadora de 5% de CO₂ A 37°C
- Centrífuga
- Hemocitómetro
- Microscopio

PROCEDIMIENTO

PROTOCOLO DE RECEPCIÓN Y PURIFICACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES

La técnica a utilizar será:

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 cm³ 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% CO₂).
- Pasar otro ciclo de luz UV antes de trabajar.
- Depositar la muestra en la caja de petri con ayuda de las pinzas de disección y 3 ml de medio de transporte.

- 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.
- 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.
- Se centrifuga a 2000 rpm durante 30 min a 4°C.
- Se recupera la interfase en otro tubo falcon con medio de cultivo suficiente para alicuotar a 10 ml con todo y muestra.
- Se centrifuga a 1000 rpm durante 10 min.
- A la caja de cultivo se le agrega medio de cultivo y se mete a la incubadora para aclimatar el medio.
- Se descarta el sobrenadante.
- Se resuspende el botón con 1 ml de medio de cultivo bastantes veces.
- Se toman 10 µl para realizar conteo de viabilidad celular.
- 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.
- 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 CO₂.

PROCEDIMIENTO DE RESIEMBRA O PASE

- 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 cm² 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 μ l y 1000 μ l estériles.
 - Cámara de Neubauer.
 - Azul tripano diluido.
- Retirar el medio de cultivo con pipeta en un tubo falcon de 15 ml.
 - Cubrir la monocapa celular con 2 ml de tripsina más EDTA 0.05% estéril.
 - Incubar a 37°C durante 5 a 10 min, revisando al microscopio el progreso de la reacción.
 - 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.
 - Resuspender y disgregar las células por pipeteo suave contra la pared de la botella inicial (25 a 30 veces).
 - Se centrifuga la muestra a 1500 rpm durante 5 min y se descarta el sobrenadante.
 - Se le agrega 1 ml de medio de cultivo y se resuspende la solución.
 - Tomar una alícuota de 10 μ l de la suspensión celular y cuantificar la muestra de células en suspensión para determinar el inóculo deseado a crecer.
 - Sembrar el inóculo determinando en la botella nueva que contenga la cantidad necesaria de medio de cultivo completo para llevar el volumen final a aproximadamente 5 ml.
 - Dejar reposar la caja en posición horizontal a temperatura ambiente durante 10 min.
 - Incubar a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

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.

RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio 24 pacientes con diagnóstico de astrocitoma, de los cuales 15 fueron mujeres (62.5%) y 9 fueron hombres (37.5%) relación hombre mujer 1:1.6 con una media de edad de 10 años (2-16 años) en cuanto a histología 6 fueron astrocitomas pilocíticos (25%), 14 astrocitomas fibrilares (58.3%), dos astrocitoma anaplásico (8.3%) y dos glioblastomas multiformes (8.3%). Por localización el 29.2% se encontraron en cerebelo, el 16.7% en tálamo y hemisferios cerebrales el 12.5% en tallo cerebral y finalmente el 8.3% en Nervio óptico, neuroeje y mesencéfalo respectivamente. Las características de los pacientes así como la formación de neuroesferas en cada uno de los pases se muestran en la Tabla 1

TABLA 1. Características de los pacientes y formación de neuroesferas

Paciente	Histología	Localización	Formación de Neuroesferas					Respuesta al Tratamiento	Estado Actual
			Basal	1 ^{er} pase	2 ^{do} pase	3 ^{ro} pase	4 ^o pase		
1	Anaplásico	Supratentorial	Si	Si	Si	Si	No	RP	Vivo
2	Difuso	Tálamo	Si	No	No	No	No	RP	Muerto
3	Difuso	Tallo	No	No	No	No	No	EP	Muerto
4	Difuso	Tallo	Si	Si	No	No	No	EP	Muerto
5	Difuso	Neuroeje	No	No	No	No	No	RP	Vivo
6	Pilocítico	Cerebelo	Si	Si	Si	Si	No	RC	Vivo
7	Difuso	Tálamo	No	No	No	No	No	EP	Muerto
8	Pilocítico	Cerebelo	No	No	No	No	No	RC	Vivo
9	Difuso	Tálamo	Si	Si	Si	Si	No	EE	Vivo
10	Difuso	Mesencéfalo	Si	Si	Si	Si	No	EP	Muerto
11	Pilocítico	Cerebelo	Si	No	No	No	No	RC	Vivo
12	Pilocítico	Cerebelo	No	No	No	No	No	RC	Vivo
13	Difuso	Tallo	Si	No	No	No	No	EE	Vivo
14	Difuso	Cerebelo	No	No	No	No	No	RC	Vivo
15	Difuso	Tálamo	Si	Si	Si	No	No	EP	Muerto
16	Anaplásico	Mesencéfalo	Si	Si	Si	Si	No	EP	Muerto
17	Difuso	Nervio Óptico	No	No	No	No	No	RP	Vivo
18	Difuso	Nervio Óptico	No	No	No	No	No	RP	Vivo
19	Pilocítico	Cerebelo	No	No	No	No	No	RC	Vivo
20	Pilocítico	Cerebelo	No	No	No	No	No	RC	Vivo
21	Difuso	Tallo	No	No	No	No	No	EP	Vivo
22	Glioblastoma	Supratentorial	Si	No	No	No	No	EP	Vivo
23	Difuso	Supratentorial	No	No	No	No	No	EP	Vivo
24	Glioblastoma	Supratentorial	No	No	No	No	No	EE	Vivo

EE Enfermedad Estable, EP Enfermedad Progresiva, RP Respuesta Parcial, RC Respuesta Completa

El estado actual de los pacientes 18 se encuentran vivos (75%) y 6 han fallecido (25%) con una sobrevida global a 21 meses de 55.08% , media 16 meses IC (13-19) Fig 1.

La sobrevida de acuerdo al sexo hombres 43.75% a 11 meses media 10 IC (8-11), mujeres 66.86% a 21 meses media 17 IC (14-21) $P=0.2633$, de acuerdo a la histología astrocitoma pilocítico sobrevida del 100% a 21 meses, fibrilar 53.28% a 20 meses, anaplásico 0% y Glioblastoma 100% con una $P=0.5886$. En cuanto a la sobrevida según la localización el 100% de los pacientes con tumor en cerebelo, neuroeje hemisféricos cerebrales y nervio óptico se encuentran vivos a 21 meses, en tálamo la sobrevida a 10 meses fue de 37.5% media 8 meses (4-12), en mesencéfalo la sobrevida es del 0% a 14 meses media 12 meses (8-16) y con localización en tallo la sobrevida es del 0% a 7 meses con media 6 meses e (3-8). $P 0.0095$. Fig 2.

Once pacientes (45.8%) presentaron una o más neuroesferas en el cultivo basal, 7 pacientes (29.1%) , presentaron neuroesferas al primer pase, 6 pacientes (25%) al segundo pase y solo 5 (20.8%) al tercer pase, ninguno presento neuroesferas al 4^o pase. Fig 3

Los pacientes que presentaron neuroesferas en el cultivo basal tuvieron una sobrevida de 39.51% a 21 meses con una media de 15 meses (11-19) en comparación con los que no presentaron neuroesferas en el cultivo basal con sobrevida de 81.48% a 21 meses media 18 (12-19) y un Log Rank test de $p=0.5780$, Fig 4.

Al primer pase los pacientes que no presentaron neuroesferas tuvieron una sobrevida de 85% a 21 mese media 19 meses (15-22) y lo que presentaron neuroesferas una sobrevida de 0% a 14 meses con media de 11meses (9-14) Log Rank test $p=0.0797$. Fig 5.

Al segundo pase el 77.22% de los pacientes que no presentaron neuroesferas están vivos a 21 meses, media 17 meses (14-21) y de los pacientes que presentaron neuroesferas el 0% se encuentra vivo a 14 meses, con una media de 12 meses (10-14) Log Rank test $p=0.3015$. Fig 6.

Finalmente al tercer pase los pacientes sin neuroesfereas tuvieron una sobrevida a 21 meses de 69.06% media 17 meses (13-20) y con cultivo positivo

para neuroesferas el 0% se encuentra vivo a 14 meses con media de 13 meses (10-16) Log Rank test $p=0.6393$. Fig 7.

De los seis pacientes que han fallecido 4 tuvieron presencia de neuroesferas en el cultivo basal y en el primer pase con $p=0.239$ y $p=0.038$ respectivamente. Tener más de 3 neuroesferas en el cultivo basal representa 10 veces más riesgo de fallecer.

En cuanto a respuesta al tratamiento a los 6 meses, 5 pacientes presentaron enfermedad progresiva de los cuales 4 tenían neuroesferas en el cultivo basal y en el primer pase, y de estos 5 pacientes 3 tuvieron neuroesferas al 2º pase y 2 al tercer pase. Por el contrario de los 7 pacientes con respuesta completa a los 6 meses solo uno presento neuroesferas en el cultivo basal y primer pase.

DISCUSIÓN

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

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 sobrevivida lograban⁽⁴⁾. En este estudio se corrobora que la localización en tallo y mesencéfalo representa un factor de riesgo ya que todos los pacientes con estas localizaciones fallecieron durante el primer año de tratamiento $p=0.0035$ mientras que otros factores como sexo, edad e histología no resultaron estadísticamente significativos.

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 sobre expresaban 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⁽¹⁴⁾.

Estos factores eran, en cierta forma, una manera de conocer más el comportamiento de los astrocitomas 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.

En este trabajo de investigación se intenta asociar la sobrevivida y respuesta al tratamiento de acuerdo a la formación de esferas autorenovables en pases consecutivos de cultivos celulares de pacientes con astrocitomas

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 sobrevivida 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⁽²⁴⁾ y capaz de reproducir un tumor

de las mismas características al ser implantado en un modelo animal murino (25).

En este estudio se pudo identificar y cultivar neuroesferas en 11 de los 24 pacientes con tumores derivados de la glía, sin que tuviera al parecer relación con la histología de los mismos, ya que en los 2 pacientes con glioblastoma multiforme no se desarrollaron neuroesferas, contrario a lo reportado en la literatura en adultos. Siendo los astrocitomas fibrilares (Grado II) los que más presentaron desarrollo de neuroesferas.

Encontramos que existe una clara asociación entre el desarrollo de neuroesferas y la evolución de nuestros pacientes, aunque esto es de manera no significativa dado que el tamaño de la muestra es pequeño, ya que como se comentó en resultados, de los 6 pacientes que han fallecido 4 presentaron neuroesferas en cultivo basal y primer pase, así como de los pacientes con enfermedad progresiva al 6 mes, 5 de los 6 pacientes presentaron neuroesferas en cultivo basal y primer pase.

El tener más 3 o más neuroesferas en el cultivo basal representa 10 veces más riesgo de fallecer.

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. Una de las fortalezas de este estudio es que nosotros en nuestros cultivos no estamos utilizando factores de crecimiento epidérmico ni factores de crecimiento fibroblástico, de tal manera que estos cultivos primarios se han desarrollado en condiciones similares a las que se encontraría en el niño. Así como otra fortaleza de este estudio es que los hallazgos reportados son exclusivamente en tumores derivados de la glía sin mezclar tumores de otros linajes.

Por último, en relación a la sobrevida, los pacientes que formaron neuroesferas en el cultivo basal y primer pase tuvieron una sobrevida mucho menor en comparación con los pacientes que no las formaron 39.51% contra 81.48% en cultivo basal con $p=0.5780$ y 85.94% contra 0% al primer pase $p=0.0797$.

Al parecer la presencia de neuroesferas tanto en el cultivo basal como al primer pase puede representar en el futuro un factor más de riesgo; que junto con los factores ya conocidos, así como otros marcadores biomoleculares podrá ayudar a estratificar de forma individualizada a los pacientes pediátricos con astrocitoma

.

FIGURA 1 SOBREVIDA GLOBAL

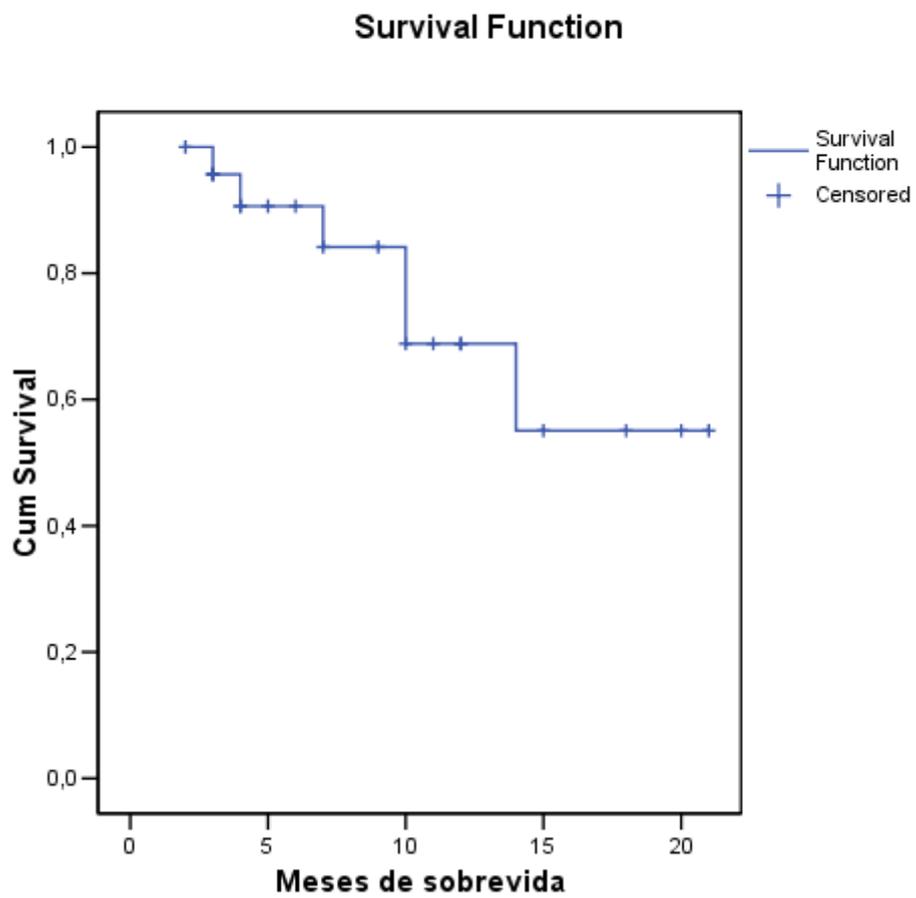


FIGURA 2 SOBREVIDA DE ACUERDO A LOCALIZACION

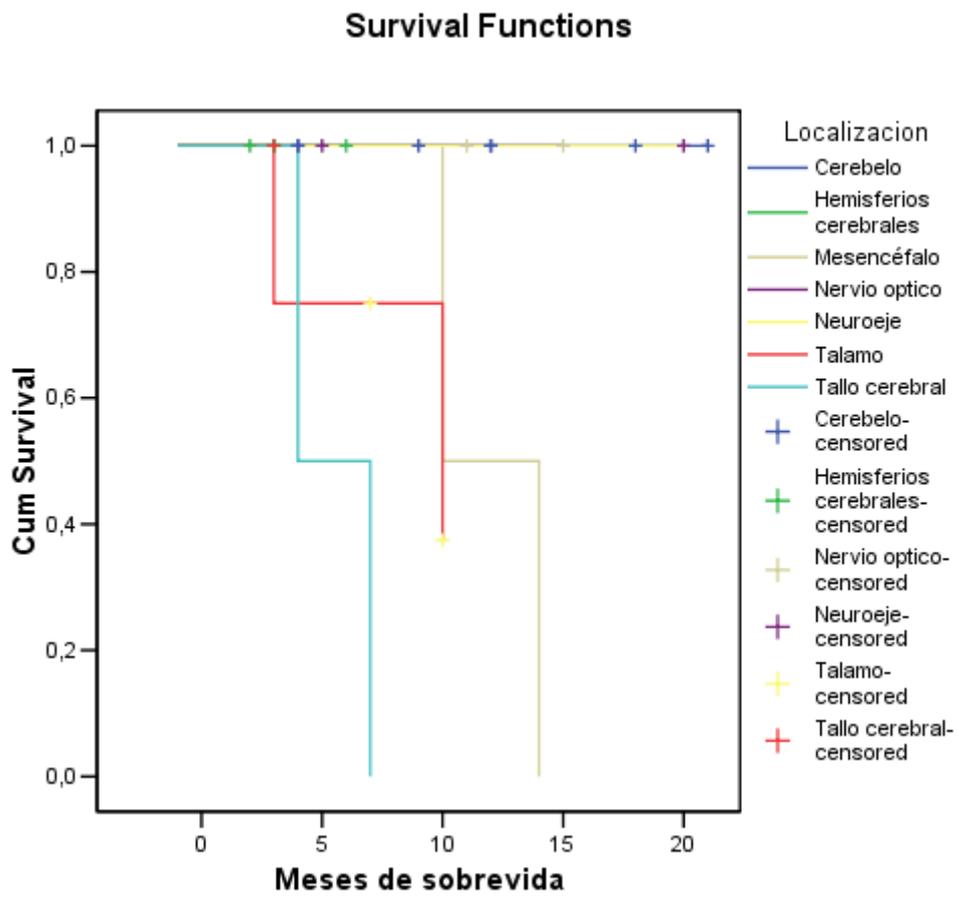


FIGURA 3 FORMACION DE NEUROESFERAS PACIENTE 1

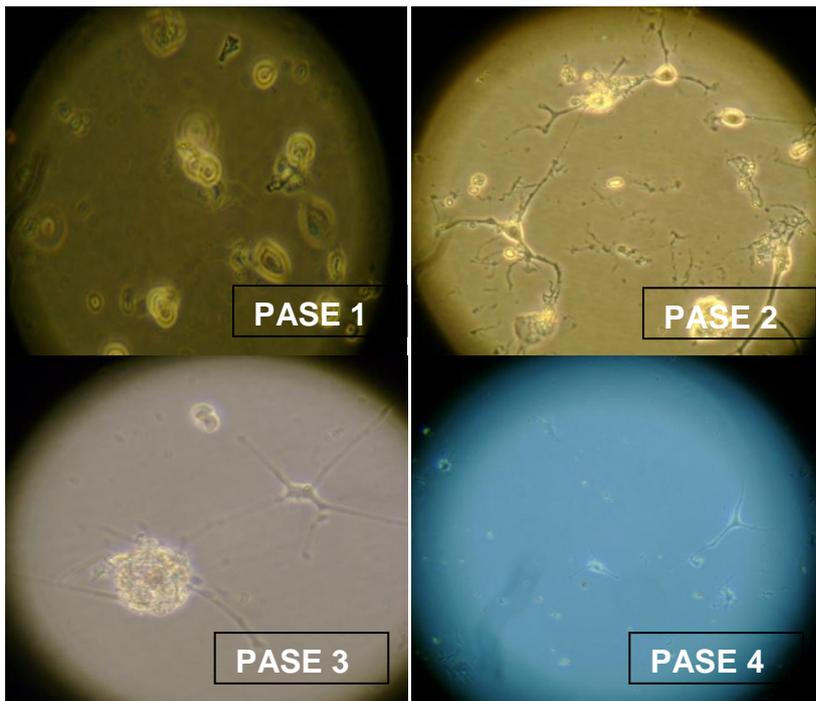


FIGURA 4 SOBREVIDA DE ACUERDO A POSITIVIDAD DE NEUROESFERAS EN CULTIVO BASAL

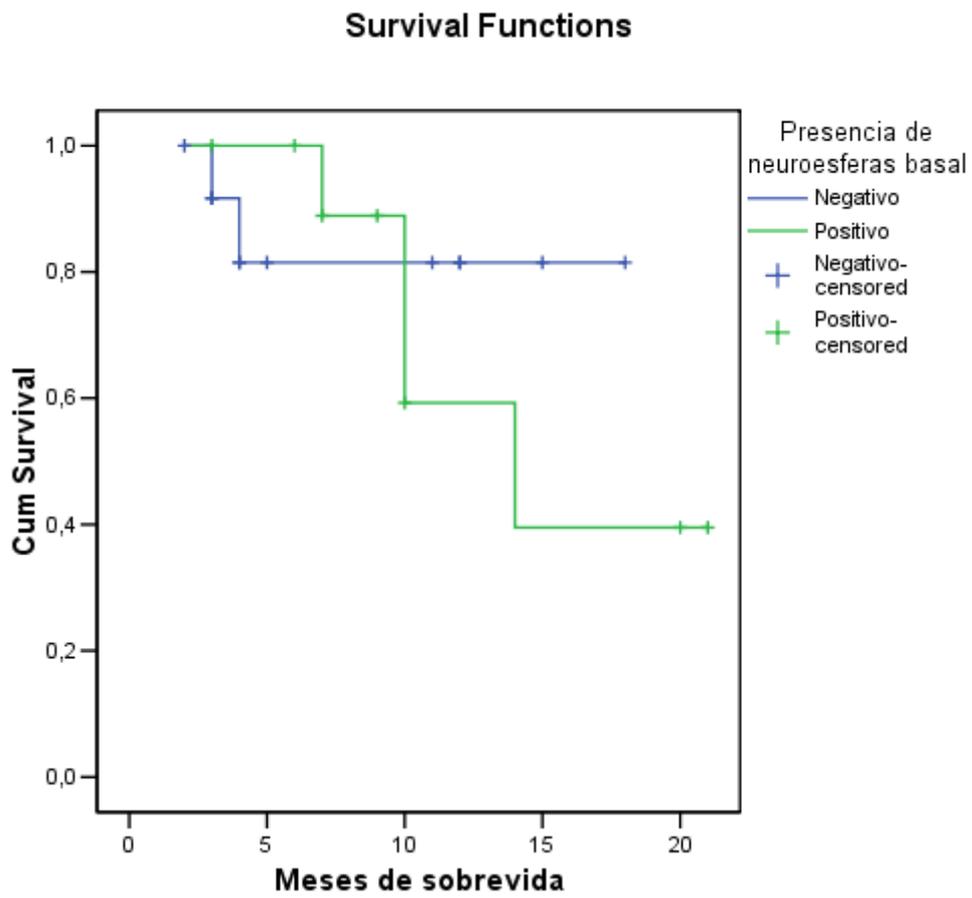


FIGURA 5 SOBREVIDA DE ACUERDO A POSITIVIDAD DE NEUROESFERAS EN PRIMER PASE

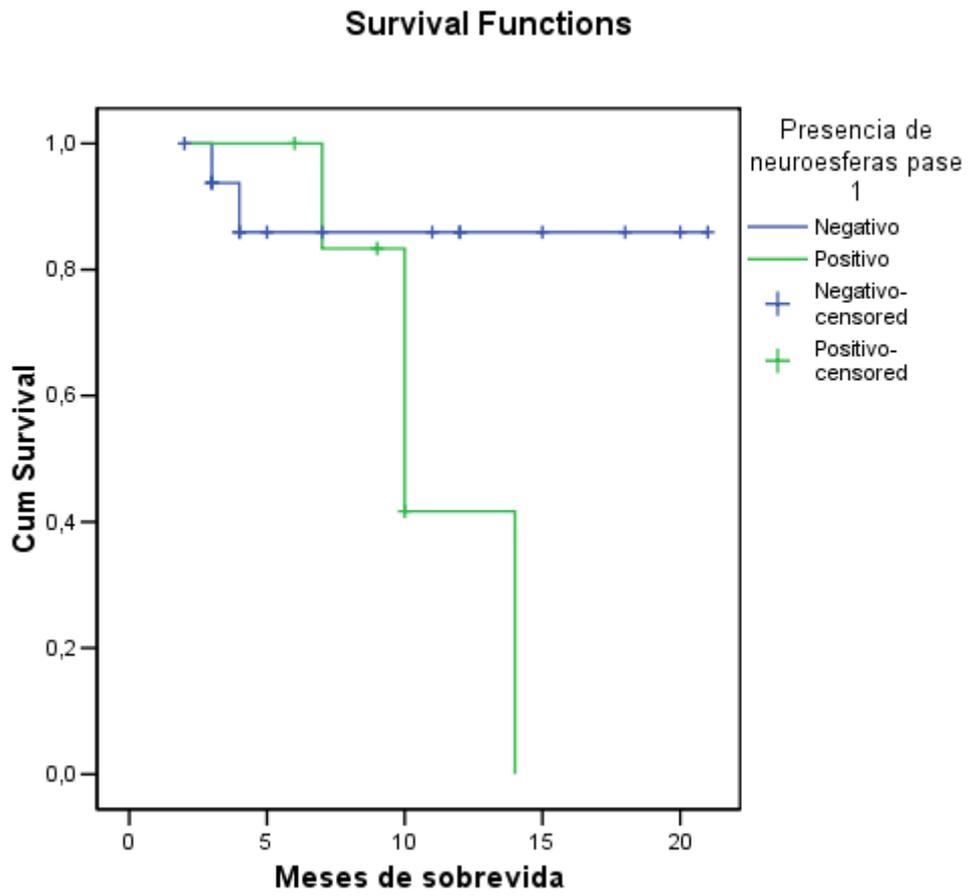


FIGURA 6 SOBREVIDA DE ACUERDO A POSITIVIDAD DE NEUROESFERAS AL 2º PASE

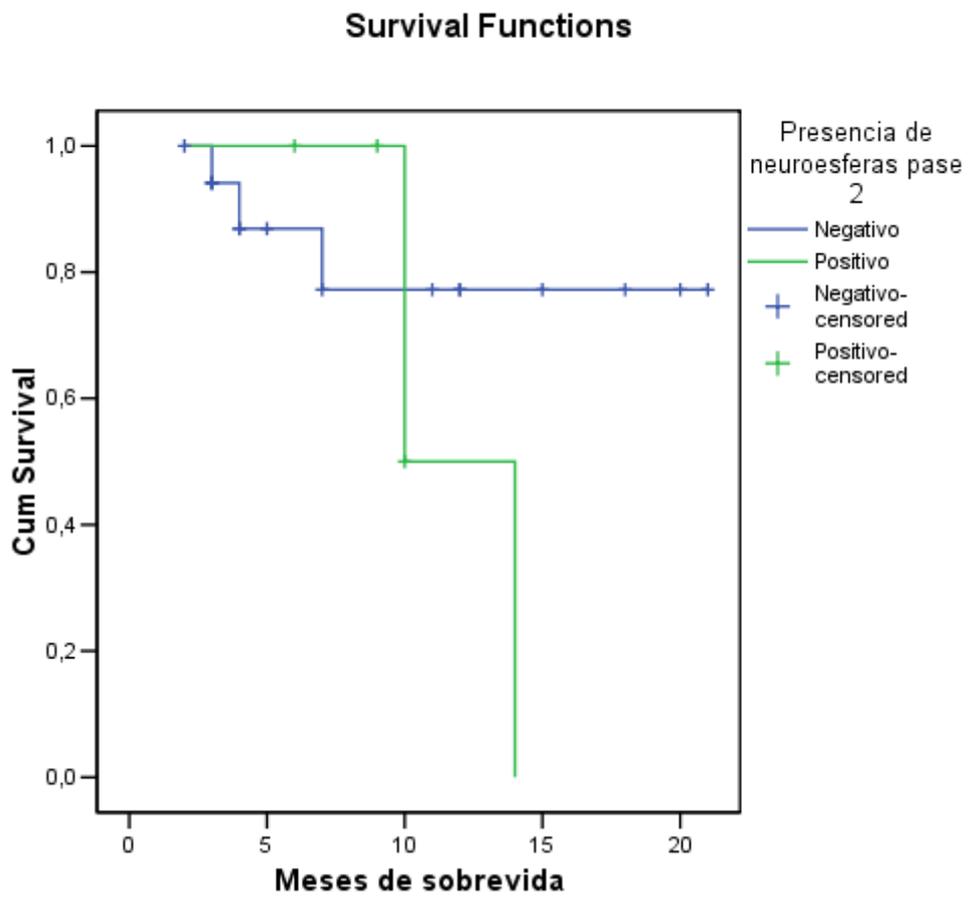
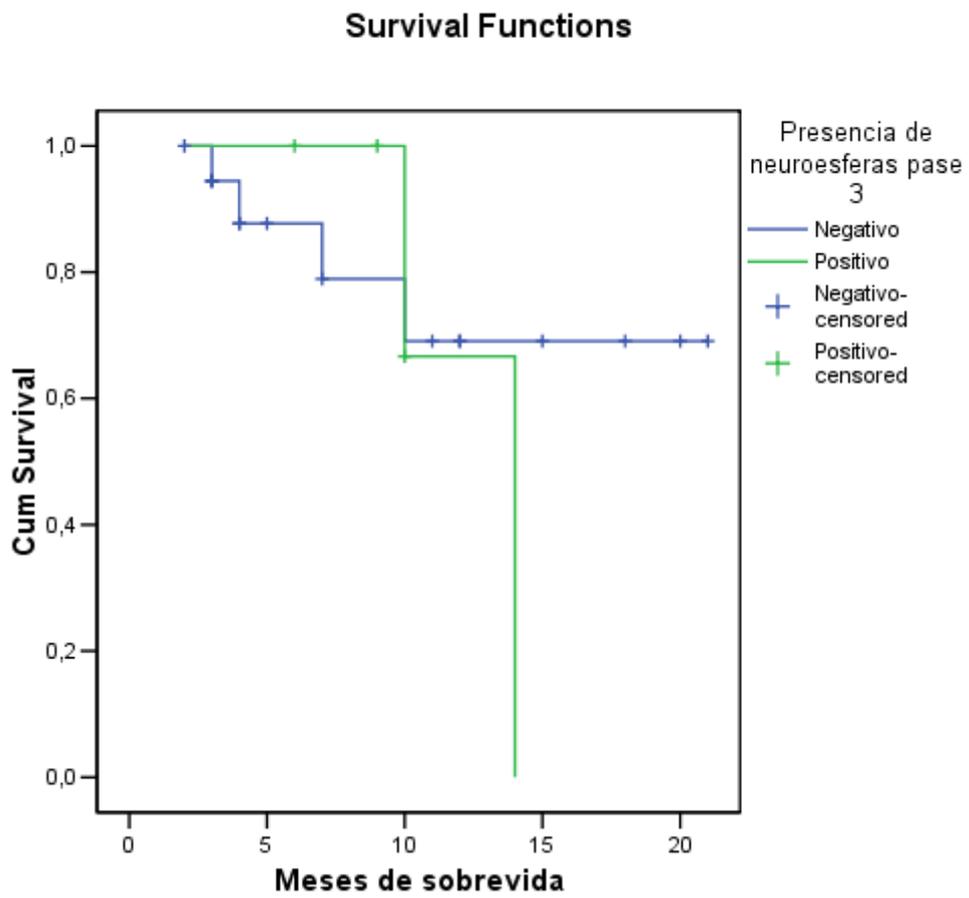


FIGURA 7 SOBREVIDA DE ACUERDO A POSITIVIDAD DE NEUROESFERAS EN 3ER PASE



BIBLIOGRAFIA

1. Fajardo-Gutierrez A. Juarez-Ocaña S. González Miranda G. Palma-Padilla V. Carreon-Cruz R. Mejia Arangure JM. General and specific incidence of cancer among children affiliated to the Mexican Institute of Social Security. *Rev Med Inst Mex Srguro Social* 2007 45 (6) 579-592.
2. Yue-Hui M. Mentlein R. Knerlich F. Kruse M.A. Mehdorn M. Held-Feind J. Expresión of stem cell markers in human astrocytomas of different WHO grades. *J Neurooncol* 2008; 86: 31-45.
3. Pizzo A. Poplack D. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 6^o Edition 2006; 771-792.
4. Kleihues P. Soylemezoglu F. Schauble B. Scheithauer BW. Burger PC. Histopathology, classification, and grading of gliomas. 1995 *Glia* 15: 211-221
5. López-Aguilar E. Rioscovian Soto A. Sepúlveda-Vildósola A. Siordia Georgina. Figueroa-Rosas Leticia. De la Cruz Yañez Hermilo. Sobreexpresión de Bcl-2 como factor pronóstico en niños con astrocitoma. *GAMO* 2011; 10: 6-12
6. López-Aguilar E. Arellano-Llamas A. Ignacio F. Sepúlveda-Vildósola A. García-Vazquez F. Rioscovian-Soto A. CD 133 se asocia con el pronóstico en astrocitoma pediátrico. *GAMO* 2011; 10:13-16.
7. López-Aguilar E. Sepúlveda-Vildósola A. Rioscovian-Soto A. Mendoza-Galvan L. García-Vazquez F. Ignacio F. De la Cruz-Yañez H. Sobreexpresión de p53 como factor pronóstico en niños con astrocitomas. *GAMO* 2011; 10: 19-25.
8. López-Aguilar E. Sepúlveda-Vildósola A. Rivera-Marquez H. Cerecedo-Diaz F. Valdés-Sánchez M. Delgado-Huerta S. et al. Preirradiation with ifosfamide, carboplatine and etoposide (ICE) for the treatment of high-grade astrocytomas in children. *Childs Nerv Syst.* 2003; 19: 818-823.
9. Zhang M. Song T. Yang L. Chen R. Wu L. Yang Z. Fang Z. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2008, 27:85

10. Clark PA. Treisman DM. Ebben J. Kuo JS. Developmental Signaling Pathways in Brain Tumor-Derived Stem-Like Cells. *Developmental Dynamics* 2007 236:3297–3308.
11. Singh SK. Clarke IA. Terasaki M. Bonn VE. Hawkings C. Squire J. et al. Identificacion of a Cancer Stem Cell in Humans Brain Tumors. *Cancer Research* 2003; 63: 5821-5828.
12. Yao Y. Tang X. Shiqui L. Mao Y. Zhou L. Brain tumor stem cells: view from cell proliferetion. *Surgical Neurology* 2009; 71: 274-279.
13. Uchida N. Buck DW. He D. Reitsma MJ. Masek M. Phan T et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000; 97: 15720-15725.
14. Ignatova TN. Kukekov VG. Laywell ED. Human cortical glial tumors contain neural stemlike cell expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 2002;39: 193-206.
15. Hemmati HD. Nakano I. Lazareff JA. Masterman-Smith M. Geschwind DH. Bronner-Fraser M. Kornblum H. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumours. *Proc Natl Aced Sci*; 100: 15178-15183.
16. Singh SK. Clarke ID. Takuichiro H. Dirks PB. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 2004; 23: 7267-7273.
17. Remboutsika E. Elkouris M, Iulianella A. Andoniadou L. Poulou M. Mitsiadis T. et al. Flexibility of neural stem cells. *Frontiers in physiology* 2011: 10; 1-10
18. Li Z. Wang H. Eyler CE. Hjelmeland AB. Rich J Turning Cancer Stem Cells Inside Out: An Exploration of Glioma Stem Cell Signaling Pathways *The Journal of biological chemistry* 2009: 25; 16705–16709,
19. Laks DR. Visnyei K. Kornblum HI. Brain Tumor Stem Cells as Therapeutic Targets in Models of Glioma. *Yonsei Med*; 2010: 633-640.
20. Hussein D. Punjaruk W. Storer I. Shaw L. Ottoman R. Peet A. et al. Pediatric brain tumor cancer stem cells: cell cycle dynamics DNA repair, and etoposide extrusion. *Neuro-Oncology*; 2011: 70-83.
21. Laks DR. Masterman-Smith M. Visnyei K. Angenieux B. Orozco NM. Foran I. et al. Neurospheres Formation Is an Independent predictor of Clinical Outcome in Malignat Glioma. *Stem Cells* 2009;27:980-987.

22. Thirant C. Bessette B. Varlet P. Puget S. Cadusseau J. Dos Reis Tavares S. et al. Clinical Relevance of Tumor Cells with Stem-Like Properties in Pediatric Brain Tumors. PLOS ONE 2011; 6; 1-12.
23. Chong YK. Toh TB. Zaiden N. Poonepalli A. Leong SH. Ling-Ong C. et al. Cryopreservation of Neurospheres Derived from Human Glioblastoma Multiforme. Stem Cells 2009; 27: 29 –39
24. Panosyan EH. Laks DR. Masterman-Smith M. Mottahedeh J. Yong WH. Cloughesy TF. et al. Clinical Outcome in Pediatric Glial and Embryonal Brain Tumors Correlates with In Vitro Multi-Passagable Neurosphere Formation. Pediatr Blood Cancer 2010;55:644–651
25. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R. et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer. 2009;45(2):228-47

ANEXO 1

Hoja de consentimiento informado

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL HOSPITAL DE PEDIATRÍA CMN SXXI

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA CONSERVACIÓN DE MUESTRA DE TUMOR CEREBRAL EN EL BANCO DE TEJIDOS PARA ESTUDIOS MOLECULARES

Nombre del paciente _____ Edad _____
No. de afiliación _____

Después de haber leído el presente documento y de haber recibido las aclaraciones necesarias.

Yo _____ padre () madre () tutor () del menor
AUTORIZO al personal médico y paramédico del hospital de Pediatría para conservar un fragmento del tumor cerebral de mi paciente para realización de estudios moleculares posteriores.

RIESGOS estoy enterado (a) de que el conservar una muestra del tumor no origina ningún riesgo a mi paciente, ya que se tomará de la pieza que se extrae durante la cirugía.

La conservación del tejido se hará en el banco de tumores del sistema nervioso central para estudios moleculares futuros y el resto de la pieza se enviará al servicio de patología del hospital para la clasificación histológica de la tumoración.

Estoy enterado (a) de la garantía y seguridad del procedimiento y que los riesgos potenciales son derivados de la cirugía per se y del tipo de enfermedad de mi paciente y no de la conservación de tejido para estudios.

CONSENTIMIENTO DEL PADRE O TUTOR: he leído y entendido este formato de consentimiento y comprendo que no debo firmar si todos los párrafos y todas mis dudas han sido explicadas o contestadas a mi entera satisfacción o si no se entiendo el término o palabra contenida en este documento.

NO FIRME A MENOS QUE LEA Y ENTIENDA POR COMPLETO ESTE DOCUMENTO

“Conozco las normas del IMSS y la sanción a que nos hacemos acreedores en caso de incumplimiento, por lo que acataremos sus procedimientos de aplicación dentro de las instalaciones, tanto el suscrito como mis familiares o amigos o profesional o similar que visite a mi paciente.

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma de Padre/Madre o tutor

Nombre y firma del testigo

Fecha

Hora

DECLARACIÓN MÉDICA. He explicado el contenido de este documento al paciente y he respondido todas las preguntas al grado máximo de mi conocimiento

Dr.J.Enrique López Aguilar
Nombre y firma del médico

Fecha

Hora

ANEXO 2

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Asociación de la presencia de Neuroesferas y proliferación celular de cultivos tumorales con respuesta al tratamiento y sobrevida de niños con Astrocitoma

Nombre	Sexo: F () M ()
--------	-------------------

Edad: _____ meses	Afiliación
-------------------	------------

Diagnóstico histopatológico:
Grado Maliganidad:
Localización:

IRM basal	IRM post 2 QT
Tumoración _____ cm ²	Tumoración _____ cm ²
IRM post 4 QT	IRM post 6 QT
Tumoración _____ cm ²	Tumoración _____ cm ²
Fecha del diagnóstico	Fecha de progresión

Fecha de defunción	Causa defunción
--------------------	-----------------

Formación de neuroesferas: Basal	Primer pase
Si () No () cuantas ()	Si () No () cuantas ()
Segundo pase	Tercer pase
Si () No () cuantas ()	Si () No () cuantas ()
Cuarto pase	Quimioterapia recibida
Si () No () cuantas ()	_____ cursos
Radioterapia recibida	Respuesta al tratamiento
_____ sesiones	() Enfermedad estable
	() Respuesta parcial
	() Respuesta completa
	() Progresión tumoral
