



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.
UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD HOSPITAL DE PEDIATRIA.
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI.



SOBRE EXPRESION DE Bcl-2 POR CITOMETRIA DE FLUJO EN CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y SOBREVIDA EN PACIENTES PEDIATRICOS CON TUMOR CEREBRAL.

TESIS PARA OBTENER TITULO DE PEDIATRA ONCOLOGO.

PRESENTA:

TESISTA: ADOLFO PINEDA GORDILLO
Residente de oncología pediátrica CMN SXXI

TUTOR: DR. JAVIER ENRIQUE LOPEZ AGUILAR.
Jefe de Servicio de Oncología Pediátrica. UMAE HP CMN S XXI.

CO-TUTOR: DRA. ANA CAROLINA SEPULVEDA VILDOSOLA.
Directora de Enseñanza e Investigación. UMAE HP CMN S XXI.

COLABORADORES:

JOSE LUIS ZARATE ALVARADO
Biólogo Molecular adscrito al laboratorio de investigación de tumores de Sistema nervioso central.

ANA LETICIA FIGUEROA ROSAS.
QFB adscrita al laboratorio de investigación de tumores de Sistema Nervioso central.

Dra. GEORGINA SIORDIA REYES
Medico Patólogo adscrita al servicio de Patología del HP CMN SXXI.

DR. JAIME DIEGOPEREZ RAMIREZ
Jefe Servicio Neurocirugía. HP CMNS XXI



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.

RESUMEN:

TITULO: sobre expresión de Bcl-2 por citometría de flujo en cultivos celulares primarios y su asociación con la respuesta al tratamiento y sobrevida en pacientes pediátricos con tumor cerebral.

INTRODUCCION: Los tumores de sistema nervioso central (TSNC) representan el tumor sólido más frecuente en la edad pediátrica, este tipo de tumores presentan una elevada mortalidad a pesar de los avances en los últimos 20 años.

Clásicamente el diagnóstico histopatológico proporciona el grado de malignidad que se asocia con el pronóstico y que clínicamente se traduce con la elección del tratamiento. Actualmente se pueden emplear otros medios como factores pronósticos entre ellos tenemos al estudio del comportamiento biológico durante el cultivo de células tumorales lo cual permite también el estudio de marcadores celulares durante este proceso.

La proteína Bcl2 es una proteína antiapoptótica. Por lo tanto, las alteraciones en este gen pueden provocar un aumento en la expresión de la proteína citoplasmática Bcl-2, que origina inhibición de la apoptosis y da por resultado la supervivencia de la célula transformada.

OBJETIVOS: Determinar si existe asociación en la sobreexpresión de Bcl-2 por citometría de flujo en cultivos celulares primarios de TSNC con la sobrevida, en niños con diagnóstico de tumor cerebral.

MATERIAL Y METODOS. Se llevó a cabo en el Laboratorio de investigación en tumores de SNC del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (HPCMNSXXI).

TIPO DE ESTUDIO: Se realizó un estudio observacional, analítico, ambilectivo, longitudinal. Con muestras de cultivo de tumor cerebral desde el mes de septiembre del 2010 al mes de marzo del 2012.

METODOLOGIA: de las muestras de biopsias o resección de TSNC se cultivaron, al realizar un pase se tomaron 20000 células a las cuales se les realizó determinación de Bcl2 por citometría de flujo.

RESULTADOS: 11 pacientes (61%) sexo femenino y 7 (39%) sexo masculino. Con edad mínima de 1 año y máxima de 16 años. Por histología 5 pacientes presentaron ependimoma, 5 pacientes presentaron astrocitomas, 3 pacientes meduloblastoma, 2 pacientes tumor rabdoide teratoide. 1 paciente presentó carcinoma de plexos coroides, 1 paciente pineoblastoma y 1 paciente astrocitoma de alto grado.

Al término del estudio 12 pacientes se encuentran vivos. Seis pacientes fallecieron con un seguimiento máximo a 20 meses. De los pacientes que fallecieron 4 eran de sexo femenino y 2 pacientes sexo masculino. Por histología 2 pacientes (33%) eran astrocitomas de bajo grado, 2 pacientes (33%) eran ependimomas y 2 pacientes (33%) tumor rabdoide teratoide. Por localización fallecieron 4 pacientes con tumores supratentoriales y 2 con tumoración en fosa

posterior. Los 3 pacientes que presentaron progresión tumoral fallecieron.

La medición de BCL-2 por citometría de flujo en células de cultivo celular fue de 0% a 95% con una mediana de 29 %. La sobrevida en pacientes que presentaron BCL-2 en un porcentaje menor a 50 % es de 56.4% a 20 meses, mientras que los pacientes con BCL-2 mayor a 51% mostraron sobrevida de 0% a 12 meses (P: 0.046%). De acuerdo a la presencia de progresión tumoral la sobrevida para aquellos con progresión fue de 0 % vs aquellos sin progresión 65 % a 20 meses (P= 0.057).

DISCUSION:

Los avances en las técnicas de diagnóstico molecular han permitido al clínico establecer factores pronósticos para cada paciente y de este modo poder ofrecer tratamiento de acuerdo a las características histológicas, biológicas y moleculares de cada tumor.

La función de la proteína Bcl-2 es antiapoptótica pues evita la liberación de citocromo C de la mitocondria evitando así continuar con la secuencia apoptótica. Se ha estudiado también la función anti-crecimiento de esta proteína pues además de conferir resistencia a la apoptosis, retrasa la entrada a ciclo celular a través del incremento de p 27 que inhibe a CDK y disminuye los niveles de RB fosforilada y E2F funcional con lo que la célula retrasa el inicio de ciclo celular. Los pacientes que presentaron positividad a bcl2 mayor a 51% no tuvieron sobrevida a 12 meses a diferencia de los pacientes que tuvieron valores de bcl2 menor a 50 % quienes tuvieron una sobrevida de 56 % a 20 meses con significancia estadística.

CONCLUSIONES:

El tratamiento personalizado de los pacientes con TSNC es el futuro en la oncología, para que esto pueda llegar a ser posible el estudio del comportamiento biológico además del estudio histopatológico son parte fundamentales en el estudio de los niños con cáncer.

Es necesario realizar más estudios para determinar la utilidad de Bcl-2 en tumores supratentoriales que histopatológicamente corresponden a tumores de bajo grado pues de confirmarse que juegan un papel en la resistencia a la Quimio y Radioterapia el empleo de fármacos antiBcl-2 podría ser un factor determinante para mejorar la sobrevida en estos pacientes.

**SOBRE EXPRESION DE Bcl-2 POR CITOMETRIA DE FLUJO EN CULTIVOS
CELULARES PRIMARIOS Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA AL
TRATAMIENTO Y SOBREVIVENCIA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON TUMOR
CEREBRAL.**

RESUMEN ESTRUCTURADO:.....	2
ANTECEDENTES.....	5
JUSTIFICACIÓN.....	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	10
MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
DEFINICION DE VARIABLES.....	12
METODOLOGIA.....	13
RESULTADOS.....	16
DISCUSION.....	27
CONCLUSIONES.....	29
REFERENCIAS.....	30
ANEXOS.....	33

SOBRE EXPRESION DE Bcl-2 POR CITOMETRIA DE FLUJO EN CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y SOBREVIVENCIA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON TUMOR CEREBRAL.

Los tumores de sistema nervioso central (TSNC) representan el tumor sólido más frecuente en la edad pediátrica, este tipo de tumores presentan una elevada mortalidad a pesar de los avances en los últimos 20 años. Anteriormente el riesgo se definía en base a parámetros clínicos, radiológicos, histológicos e inmunohistoquímicos, sin embargo se observó que el comportamiento biológico así como las características genéticas de los tumores aportan datos de riesgo además de ofrecer posibles estrategias terapéuticas. (1)

La incidencia de los TSNC se ha incrementado y es variable dependiendo del sexo, edad y raza; en Estados Unidos la incidencia varía de 14.5 por 100 000 en hombres y en mujeres de 15.1 por 1000 000 en el periodo de 1998 al 2002. Los tumores de células gliales son los más frecuentes, de estos el astrocitoma pilocítico es el más común en la infancia con una media al diagnóstico de 12 años; el meduloblastoma es la segunda tumoración de sistema nervioso central más frecuente con una media al diagnóstico de 9 años, los ependimomas son la tercera tumoración de SNC (2).

En el ámbito mundial se conoce que el 60 -70 % del total de cánceres en los niños está dado por 3 grupos principales de neoplasias: leucemias, linfomas y TSNC, en México el patrón es variable y está dado por la referencia a los diferentes hospitales de concentración, sin embargo en los pacientes derechohabientes y en nuestro hospital el orden de frecuencia se altera de la siguiente manera: 1) leucemias con un 46%, 2)TSNC con 12% y 3)linfomas con 10.8 %. La incidencia de TSNC en México es de 14.8 x 1000 000 habitantes con una frecuencia en México del 12 %, siendo el estado de Chiapas el que cuenta con la mayor incidencia, alcanzando esta los 32.5 x 1000 000 habitantes (3).

En relación a la edad, en Nuestro País el grupo comprendido del año a los 4 años de edad es el que presenta la mayor incidencia de TSNC con 19. 1 por 1000 000 habitantes (3).

El TSNC más frecuente en México es el astrocitoma con una frecuencia del 5.2% seguido de los tumores neuroectodérmicos primitivos (TNEP) con 3.9 % en el periodo de 1996 al 2007. La incidencia en astrocitomas es del 6.4 por 1 millón de niños/año. El segundo tumor más frecuente es el meduloblastoma con una incidencia de 4.8 por millón de niños/año y el tercer tumor más frecuente es el ependimoma con una incidencia de 2 por millón niños/año.

La etiología de los TSNC es desconocida, el único factor ambiental directamente relacionado es la exposición a radiaciones ionizantes, no obstante hay algunos factores genéticos específicos que se asocian a una incidencia más alta en esta clase de tumores. Los pacientes con Neurofibromatosis tipo I tiene una elevada incidencia en gliomas de bajo grado, incluyendo gliomas de la vía visual que se presentaron en 15 % de los pacientes con este síndrome. Los pacientes con esclerosis tuberosa están más propensos a desarrollar astrocitoma de células gigantes. Quienes presentan síndrome de Li-Fraumeni tienen una predisposición elevada a varios tumores incluyendo gliomas y

meduloblastoma. Algunos síndromes heredados de forma recesiva como el síndrome de Turcot están asociados a una elevada incidencia en meduloblastoma (4).

La presentación clínica es muy variable, cerca de la mitad de los TSNC en pacientes pediátricos crecen a partir de la fosa posterior, por lo que los datos clínicos más frecuentes se derivan de la hidrocefalia que se produce. Clínicamente el dato más frecuente es la cefalea pero los lactantes se pueden presentar con parálisis de cuarto par y desviación de la mirada; la triada clásica de hipertensión intracraneal que consiste en cefalea, náusea y vómito puede ocurrir pero no es tan frecuente (5).

En caso de afección supraselar y pineal como es el caso de gliomas de vía visual puede ocasionar pérdida de campos visuales. El síndrome de Parinaud -caracterizado por parálisis de cuarto par, nistagmo de retracción o convergencia, pupilas que responden mejor a la acomodación que a la luz y retracción de parpado, puede presentarse por tumores de la región tectal de tallo cerebral. En caso de las tumoraciones supratentoriales se presentan con déficit neurológico focalizado e inespecífico (5).

El diagnóstico de TSNC ha sido simplificado por los avances en la neuroimagen, la resonancia magnética (RM) es esencial en el diagnóstico de TSNC. Por sus habilidades multiplanares y por combinarse con otras técnicas como espectroscopia que complementa hallazgos anatómicos con bioquímicos puede ofrecer una mejor ubicación y aportar datos sobre viabilidad tumoral. La RMN ha superado a las otras técnicas para determinación de diseminación tumoral leptomeningea por lo que se considera el estudio de elección para estudio de neuroeje (5).

Histopatológicamente los TSNC se dividen principalmente en 5 grupos según el origen: Tumores astrocíticos donde se encuentran los astrocitomas, glioblastomas. El segundo grupo lo componen los tumores embrionarios donde se encuentra meduloblastoma y tumor rabdoide teratoide. El tercer grupo corresponde a los tumores endimarios entre los que se encuentra el endimoma. El cuarto grupo lo forman los Tumores de la región selar que incluye craneofaringeoma y tumores pituitarios. El quinto grupo se encuentran los tumores que derivan de los plexos coroideos como el carcinoma de plexos coroideos. Todos estos tumores corresponden a más del 95% de los TSNC y tienen diferentes subclasificaciones como se pueden observar en el anexo 1 (6).

La clasificación histológica además de ofrecer un diagnóstico definitivo permite ofrecer un grado de malignidad que se asocia con el pronóstico y que clínicamente se traduce con la elección del tratamiento. En el caso de los astrocitomas grado 1 se considera a lesiones que tienen una gran posibilidad de curación mediante cirugía solamente y supervivencia de 5 a 7 años. Las neoplasias que se consideran grado II son generalmente de naturaleza infiltrativa pero con un bajo nivel de proliferación con una supervivencia de 2.5 a 3 años en promedio. Los estadios III se reservan para las lesiones con evidencia histológica de malignidad como atipia nuclear y actividad mitótica notable, asociándose a una supervivencia promedio de 1.5 a 2 años. El grado IV se asigna a las lesiones malignas, mitosis activa, necrosis perilesional, clásicamente con crecimiento pre y postquirúrgico y mala evolución con supervivencias menores de un año. La clasificación de los TSNC por grados se puede observar en el anexo 2 (6).

Hay otros factores pronósticos que se pueden asociar al grado histológico como la edad, dado que pacientes menores de 3 años no son candidatos a radioterapia y la localización ya que algunas tumoraciones no pueden extirparse.

Actualmente se han aceptado a los biomarcadores moleculares y genéticos como factor pronóstico, el ejemplo más claro es la asociación entre meduloblastoma con el gen ERBB2 (muestras congeladas) en donde pacientes con sobreexpresión de dicho gen presentaron una mortalidad estadísticamente significativa ($p: 0.0001$) en relación a pacientes con ERBB2 negativos que tuvieron una supervivencia del 100 % a 5 años (7).

En el caso de los astrocitomas se ha asociado con el gen p53 cuya mutación se relaciona con tumores más agresivos y con mayor resistencia a la quimioterapia, algunas otras asociaciones genéticas como la asociación de la codeleción 1p19q que en pacientes con astrocitoma se puede observar buena respuesta a la quimioterapia y mayor radiosensibilidad (8).

Otro campo de estudio respecto al pronóstico mediante el empleo de biomarcadores en pacientes con TSNC, corresponde al estudio de los mecanismos de la apoptosis. Las células crecen controladamente gracias a la expresión de genes que inducen señales de muerte en estadios definidos de diferenciación y en respuesta a estímulos fisiológicos determinados. Por lo anterior una alteración en la apoptosis ocasiona que células defectuosas no entren a apoptosis lo que se traduce clínicamente como una mala respuesta a quimioterapia (8).

El Bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma 2 gen) fue el primer protooncogen detectado; está localizado en el cromosoma 18, funciona como un supresor de la apoptosis y puede promover la transformación neoplásica. Forma parte de una familia de genes que intervienen en la regulación de la supervivencia de la célula, estos genes codifican proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas. La proteína BCL2 es una proteína antiapoptótica. Por lo tanto, las alteraciones en este gen pueden provocar un aumento en la expresión de la proteína citoplasmática Bcl-2, que origina inhibición de la apoptosis y da por resultado la supervivencia de la célula transformada (9).

En TSNC se ha demostrado que la sobreexpresión de Bcl-2 es notable en tejido tumoral en comparación con tejido de la periferia, además la expresión de Bcl-2 no se afecta por la edad del paciente ni por la estirpe histológica y algunos estudios reportan la resistencia a quimioterapia asociada a la sobreexpresión de Bcl-2. La mayor parte de los estudios realizados en TSNC con Bcl-2 han sido mediante inmunohistoquímica y demuestran una supervivencia de 29 % a 5 años para aquellos pacientes con Bcl-2 positivo mientras que los pacientes con Bcl-2 negativo presentaron supervivencia a 5 años de 64% (10).

La parte más vanguardista en el descubrimiento de factores pronósticos es el estudio del comportamiento biológico a través de cultivos celulares, el cultivar *in vitro* TSNC permite observar características como la velocidad de implante, la cantidad de resiembra y velocidad de crecimiento, así como desarrollo de neuroesferas y estudio de regulación de apoptosis (11).

El cultivo celular también permite el estudio de resistencia a fármacos, así como otros estudios como de biomarcadores mediante citometría de flujo e incluso obtener por este método el índice de DNA, con la superioridad a otros métodos, con esta técnica tenemos la seguridad de contar con tejido tumoral y se puede determinar en la misma medición marcadores específicos para cada clase de tumor. Los biomarcadores pueden ser intra o extracelulares y se cuenta con la ventaja de que se realizan en tejido vivo a diferencia de los estudios de inmunohistoquímica en donde la manipulación de la muestra es mayor, además que los tejidos se exponen a mayor cantidad de factores físicos (12,13).

Ya se ha establecido la asociación de Bcl-2 en astrocitomas por inmunohistoquímica pero no se ha realizado una determinación mediante citometría de flujo en cultivos celulares de TSNC, sin embargo se han realizado otros marcadores mediante citometría de flujo en cultivos celulares como CD133, nestina que han permitido evaluar otras características (13).

El tratamiento de los TSNC ha tenido avances importantes y gran parte de ello se debe a la categorización de la enfermedad. El tratamiento quirúrgico es la pieza más importante para mejorar el pronóstico, en los gliomas de bajo grado la resección quirúrgica completa por si sola aporta una posibilidad del 90 % de sobrevida, sin embargo la localización hace difícil la resección completa, por lo que se debe emplear quimioterapia sobre todo en pacientes que no son candidatos a radioterapia por edad con esquemas a base de carboplatino y vincristina, con resultados favorables y que se han mejorado en los últimos años al agregar temozolomida (14).

En nuestra unidad se ha empleado el esquema ICE (Carboplatino, Ifosfamida y Etoposido) pre y post radioterapia para gliomas de alto grado obteniendo una sobrevida global de 69 % a 60 meses. En relación al meduloblastoma de alto riesgo la sobrevida obtenida en nuestro medio con el esquema ICE es mayor al 57 % a 18 meses, algo muy semejante a la sobrevida observada en los ependimomas (15-18).

JUSTIFICACION:

Los TSNC son los tumores sólidos más frecuentes de la infancia y es precisamente en este grupo de tumores donde la estratificación sobre factores de riesgo no ha sido del todo confiable, es común que pacientes clasificados como de bajo riesgo presenten un comportamiento clínico agresivo y de forma contraria pacientes que se catalogan como de alto riesgo tienen un comportamiento benigno con respuesta rápida a la quimioterapia pero que son sometidos a quimioterapia intensiva con toxicidad elevada.

La sobrevida actual en los niños con tumores cerebrales continua siendo inferior al 60 % por lo cual se requiere profundizar en el estudio del comportamiento biológico de estos para poder estratificarlos de mejor manera y poder dar tratamientos individualizados que nos permitan mejorar la sobrevida.

Las anormalidades del ciclo celular y las vías apoptóticas son la llave en el futuro molecular de los TSNC y se encuentran bajo evaluación para intervención terapéutica potencial así como factores pronósticos por lo tanto el empleo de Bcl-2 como factor pronóstico puede ser útil como herramienta para clasificar desde un inicio a pacientes en un grupo de riesgo mayor o menor y de esta forma evitar la toxicidad innecesaria o en su defecto el empleo de terapias mas intensivas de forma inicial para evitar una progresión o recaídas que se traducen en un costo mayor y en una sobrevida muy baja.

Se ha demostrado que la alteración en Bcl-2 se correlaciona con resistencia a la quimioterapia y por tanto con mal pronóstico, nunca se ha evaluado la sobreexpresión de Bcl-2 en cultivo celular primario mediante citometría de flujo y su asociación a tratamiento de TSNC. Por lo que realizar este trabajo permitirá ofrecer a los pacientes con diagnostico de tumor de SNC un tratamiento individualizado de acuerdo a los factores pronósticos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

¿Existe asociación en la sobre expresión de Bcl-2 por citometría de flujo en cultivos celulares primarios con la sobrevida en niños con tumor cerebral?

OBJETIVOS:

GENERAL

Determinar si existe asociación en la sobreexpresión de Bcl-2 por citometría de flujo en cultivos celulares primarios de TSNC con la sobrevida, en niños con diagnóstico de tumor cerebral.

ESPECIFICOS.

- 1.- Determinar el porcentaje de sobre expresión de Bcl-2 en niños con tumor cerebral de acuerdo a su histología.
- 2.- Determinar asociación entre sobrevida y expresión de Bcl-2

HIPOTESIS DE TRABAJO.

La sobreexpresión de Bcl-2 por citometría de flujo en cultivos celulares primarios se asocia con disminución de 30% con la sobrevida, en niños con tumores cerebrales.

MATERIAL Y METODOS.

LUGAR: Laboratorio de investigación en tumores de SNC del Hospital de Pediatría del Centro Medico Nacional Siglo XXI (HPCMN SXXI).

TIPO DE ESTUDIO: Por el tipo de estudio es observacional, analítico, ambilectivo, longitudinal.

MUESTREO: No aleatorio, de casos consecutivos de todos los pacientes con diagnostico de tumor cerebral desde el primer cultivo de tumor cerebral del mes de septiembre del 2010 al mes de marzo del 2012.

UNIVERSO/POBLACION DE ESTUDIO: Todos los niños con Diagnostico de Tumor cerebral diagnosticados en el HP CMNS XXI comprendidos entre septiembre del 2010 a marzo 2012.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

CRITERIOS DE INCLUSION:

- Pacientes menores de 16 años.
- Ambos géneros.
- Pacientes a quienes se realizo biopsia o resección de tumor localizado en SNC compatible histológicamente con neoplasia maligna de SNC.
- Cultivos celulares positivos.

- **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**
- Expediente incompleto.

FACTIBILIDAD:

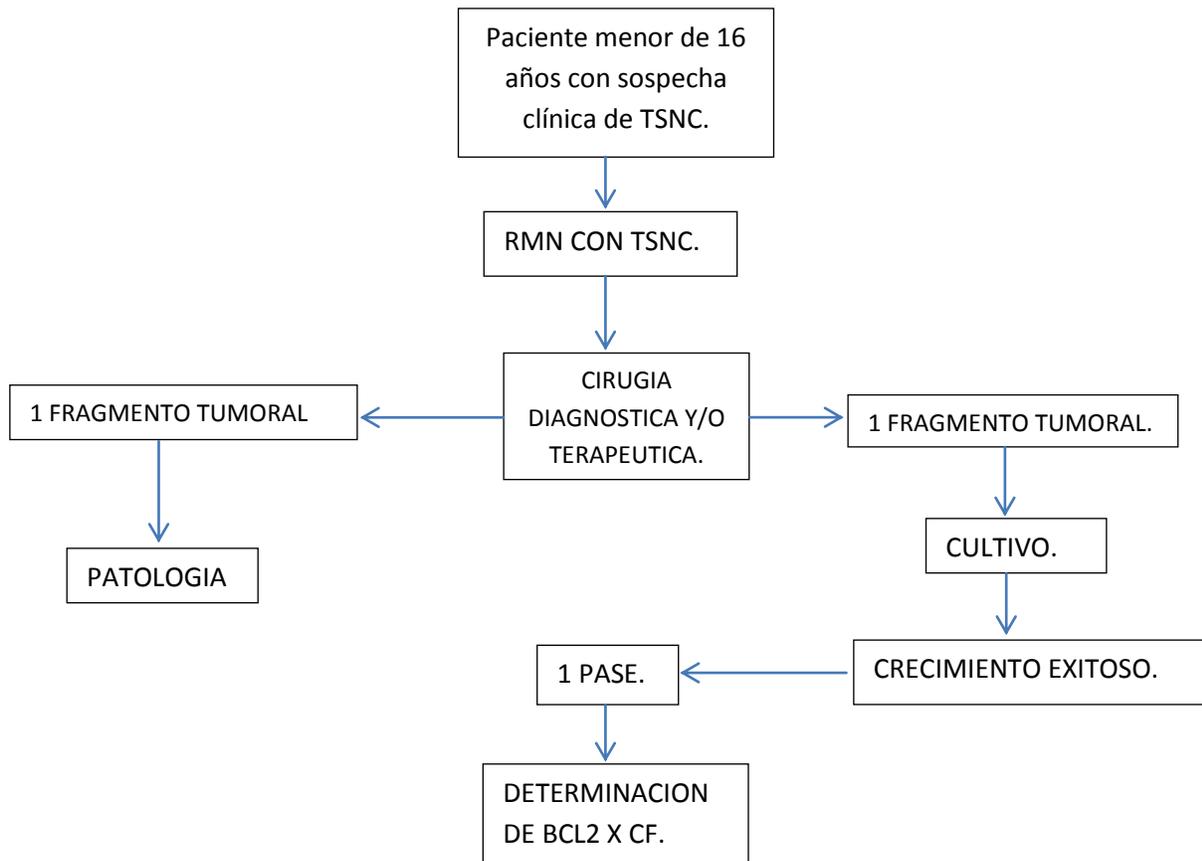
Se conto con los recursos humanos físicos y financieros para la realización de este estudio. Para cada paciente del estudio: expediente clínico radiológico, y muestra tumoral. Medico Subespecialista en oncología pediátrica, Medico Oncólogo Pediatra tutor del estudio, Biólogo molecular encargado de cultivos tumorales. Química farmacobióloga citometrista. Laboratorio de investigación en tumores cerebrales para la realización de este estudio.

Aspectos financieros: se conto con los recursos financieros propios de la unidad, medios de cultivo, incubadora, recipientes, frascos de crecimiento celular, tubos Ependorf, microscopio invertido, pipetas y todo el equipo necesario para llevar a cabo el protocolo de investigación.

DEFINICION DE VARIABLES:

Variable	Definición operacional	TIPO DE VARIABLE.	Escala de medición.	Unidades de medición.
Tiempo de sobrevida global	Numero de meses que viven los pacientes luego del diagnóstico realizado por el servicio de patología de HPCMNXXI	Dependiente	Cuantitativa discreta	Meses
Sobrevida libre de progresión	Periodo de tiempo que se encuentra entre la desaparición clínica de la enfermedad por cualquier método terapéutico y su reaparición.	Dependiente	Cuantitativa discreta	Meses
Localización de la tumoración	Sitio donde se encuentra la tumoración.	Independiente	Cualitativa nominal	Supratentorial. Fosa posterior Pineal. Medular
Porcentaje de resección.	Porcentaje de la tumoración resecada quirúrgicamente descrita en la hoja postquirúrgica.	Confusión	Cualitativa ordinal	Resección 100% 99- 90 % 89- 50 % Menor de 50%
Histología	Es la estructura microscópica del material biológico.	Independiente.	Cualitativa nominal	Astrocitoma de bajo grado. Astrocitoma alto grado. Meduloblastoma Ependimoma Pineoblastoma Tumor rabdoide teratoide.
Edad	Edad del paciente que se encuentra registrada en el expediente al momento del diagnóstico.	Universal	Cuantitativa continua	Años
Sexo	Genero que se encuentra registrado en el expediente.	Universal	Cualitativa nominal	Masculino Femenino
Bcl-2	Sobreexpresión de proteína derivada de Bcl2	Independiente.	Cualitativa nominal	Mayor a 50 % Menor a 50 %
Progresión tumoral.	Se valorara por medio de Resonancia Magnética de forma periódica.	Dependiente	Cualitativa Ordinal.	Positivo: incremento en volumen de tumoración o datos de espectroscopia compatibles con actividad tumoral. Negativo: sin datos de incremento en el volumen por RMN.

METODOLOGIA:



Obtención de la muestra:

Se obtendrá la muestra procedente de quirófano la cual será tomada por Neurocirujanos del HP CMNSXXI cegados al estudio. Las muestras se obtendrán mediante biopsia abierta, biopsia endoscópica o mediante estereotaxia. Las diferentes maneras de toma de biopsia permiten localizar únicamente tejido tumoral, dado que las cirugías de TSNC son de gran dificultad y únicamente permiten obtener tejido tumoral puesto que el extraer tejido sano puede desencadenar importantes secuelas.

Cultivo celular.

Se recibieron las muestras de material de biopsias procedentes de quirófano de las cuales una parte se fue a patología para su determinación de grado histológico y otra se transporto en medio de cultivo DMEM F-12. El procesamiento de la muestra es inmediato al llegar al laboratorio.

Se inició el proceso disgregando la muestra por pipeteo hasta tener una mezcla homogénea. Una vez disuelta la muestra se puso en un tubo falcon con 5 ml de ficoll a 4° C y se le agregó la muestra

lentamente por las paredes cuidando no romper las fases. Se centrifugó a 2000 rpm durante 30 min a 4° C.

Se recuperó la interfase en otro tubo falcon con medio de cultivo suficiente para alicuotar a 10 ml con todo y muestra. Esto se centrifugó a 1100 rpm durante 10 minutos.

El conteo de viabilidad celular se realizó con 10µl de muestra y 10µl de azul de tripano; en un tubo Eppendorf se mezcla la muestra hasta homogenizar y posteriormente se realizó conteo en cámara de neubauer.

Se colocaron las células y medio de cultivo en frasco de cultivo dentro de la incubadora de CO2 a 37 grados C. Al tener confluencia mayor a 70 % se realiza el pase y se obtienen células para la medición de BCL2 en el citómetro de flujo.

Cabe mencionar que algunas muestras se tomaran del banco de cultivos de tejido tumoral con el que se cuenta en el laboratorio, de las cuales se pudo obtener células viables y cultivar nuevamente el tumor.

Diagnostico histopatológico:

El diagnostico histopatológico se realiza por 2 médicos cegados a la investigación en el departamento de patología de esta unidad, utilizando tinciones de hematoxilina-Eosina principalmente y mediante muestras fijas en parafina con técnica de congelación.

Citometría de flujo.

La lectura de Bcl-2 se realizó en citómetro de flujo de la casa comercial Beckton Dickinson (BD) modelo FACScalibur utilizando los anticuerpos FITC Mouse Anti-Human Bcl-2 de la marca BD Pharmigen el cual es un anticuerpo monoclonal purificado que reacciona con Bcl-2 humano.

Se tomaron 20 000 células, se aplicaron 2 ml de solución salina isotónica o FACSFlow para lavado de células. Se centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos en una temperatura entre 19° y 25°, se decanta. Se agregó sol. permeabilizadora 100 microlitros, mezclamos para incubar por 10 minutos. Se agregó solución salina, centrifugamos y aplicamos 5 microlitros de anticuerpo, mezclamos nuevamente, se dejó incubar 15 a 20 min, agregamos sol. Salina 2 ml. Se centrifugó (3000 rpm x 3 min) y decantó, agregamos sol. Salina 1 ml y se analizó en el citómetro de flujo.

ASPECTOS ETICOS:

De acuerdo a la Ley General de Salud en su capítulo de investigación en seres humanos este protocolo se considera un estudio sin riesgo por lo que no se requiere consentimiento informado. Sin embargo puesto que se realizan pruebas en tejidos obtenidos del paciente se solicita consentimiento informado para el estudio y conservación de cultivo de TSNC. De acuerdo a la ley general de salud el hospital cuenta con autorización para conservación de tejidos humanos. Se explico de forma detallada en que consiste el protocolo así como los riesgos y beneficios que obtendrán. Se informo también que en el momento que se decida por parte de los tutores el paciente puede excluirse del estudio y retirar las muestras del banco de cultivos. De acuerdo al tratado de Helsinki cubre los requerimientos de beneficencia, autonomía y justicia.

ANALISIS ESTADISTICO:

Se realizó estadística descriptiva, para las variables cualitativas se calculó media o mediana. Análisis inferencial. Para buscar asociación entre variables se utilizó chi cuadrada y para validar el peso de cada variable en el pronóstico de estos pacientes se utilizó regresión múltiple. Para el calculo de sobrevivencia se empleó método de Kaplan Meyer y la diferencia estadística se valoró por log Rank test.

RESULTADOS:

Este estudio se realiza en HP CMN SXXI y Se incluyeron 18 pacientes: 11 (61%) sexo femenino y 7 (39%) sexo masculino, con una relación masculino: femenino de 1:1.5. La mediana de edad es de 4.5 años con una mínima de 1 año de edad y máxima de 16 años. El 50 % de la población tenía menos de 5 años.

De acuerdo a localización 7 pacientes presentaron la tumoración a nivel supratentorial, 9 pacientes en fosa posterior, 1 paciente presentó la tumoración a nivel pineal y 1 paciente a nivel de medula espinal. (tabla 1)

Por histología 5 pacientes presentaron ependimoma, 5 pacientes presentaron astrocitomas, 3 pacientes meduloblastoma, 2 pacientes tumor rabdoide teratoide. 1 paciente presentó carcinoma de plexos coroides, 1 paciente pineoblastoma y 1 paciente astrocitoma de alto grado.

Respecto del tratamiento quirúrgico 3 pacientes tuvieron resección del 100 % de la lesión, 8 pacientes tuvieron una resección menor al 49 % y el resto una resección de entre el 50- 99 %.

En este estudio dos pacientes no recibieron esquema de QT, 13 pacientes recibieron esquema ICE y 3 pacientes ICE-TMZ. Diez pacientes recibieron radioterapia (54.8 Gys) y 8 pacientes no recibieron esta modalidad de tratamiento.

La evolución que tuvieron los pacientes fue: Tres presentaron progresión tumoral, actualmente 12 pacientes se encuentran vivos de los cuales 7 son de sexo femenino y 5 del sexo masculino. Seis pacientes fallecieron con un seguimiento máximo a 20 meses. De los pacientes que fallecieron 4 eran de sexo femenino y 2 pacientes sexo masculino. Por histología 2 pacientes (33%) eran astrocitomas de bajo grado, 2 pacientes (33%) eran ependimomas y 2 pacientes (33%) tumor rabdoide teratoide. Por localización fallecieron 4 pacientes con tumores supratentoriales y 2 con tumoración en fosa posterior. Los 3 pacientes que presentaron progresión tumoral fallecieron. En cuanto a la resección quirúrgica a 2 pacientes a los que se les realizó resección quirúrgica completa fallecieron, y 1 paciente a quien se le realizó resección entre el 90-99% falleció; 3 pacientes a quienes se les realizó resección entre el 50-89 % viven. A 8 pacientes se les realizó resección menor al 50 % de los cuales 5 (62 %) están vivos.

Nueve pacientes recibieron radioterapia de los cuales 1 paciente falleció. De los 9 pacientes que no recibieron RT 5 (55 %) fallecieron.

Con respecto a la medición de BCL-2 por citometría de flujo en células de cultivo celular 5 pacientes presentaron valores mayores a 50 % y las mediciones fueron de 0% a 95% con una mediana de 29 %. El 23 % de los pacientes que presentaron una medición de BCL-2 menor a 50 % falleció, mientras que el 60 % de los pacientes que presentaron BCL2 mayor a 50 % falleció. (Tabla 3)

Tabla 1. Características de los pacientes

		<i>n</i>	%	Rango
Sexo	Mujeres	11	61	
	Hombres	7	39	
Edad (años)	Mediana: 4.5 años			1-16
Vivos		12	66.6	
Muertos		6	33.3	
Localización				
	• Supratentorial	7	38.9	
	• Fosa posterior	9	50	
	• Pineal	1	5.6	
	• medular	1	5.6	
Dx Histopatológico:				
	• Astrocitoma alto grado	1	5.6	
	• Astrocitoma bajo grado	5	27.8	
	• Meduloblastoma	3	16.7	
	• Pineoblastoma	1	5.6	
	• Ependimoma	5	27.8	
	• Carcinoma plexos coroideos	1	5.6	
	• T. rabdoide teratoide	2	11.1	
Progresión tumoral:				
	• Positiva	3	16.7	
	• Negativa:	15	83.3	
Recibieron radioterapia (54 Gys)		10	55.6	
% resección Quirúrgica:				
	• 100%	3	16.7	
	• 90-99%	4	22.2	
	• 50-89%	3	16.7	
	• Menor 49 %	8	44.4	

La sobrevida global fue de 41.5 % a 20 meses de seguimiento, con una media de sobrevida de 13.4 meses (IC95%=9.58- 17.4) (fig-1)

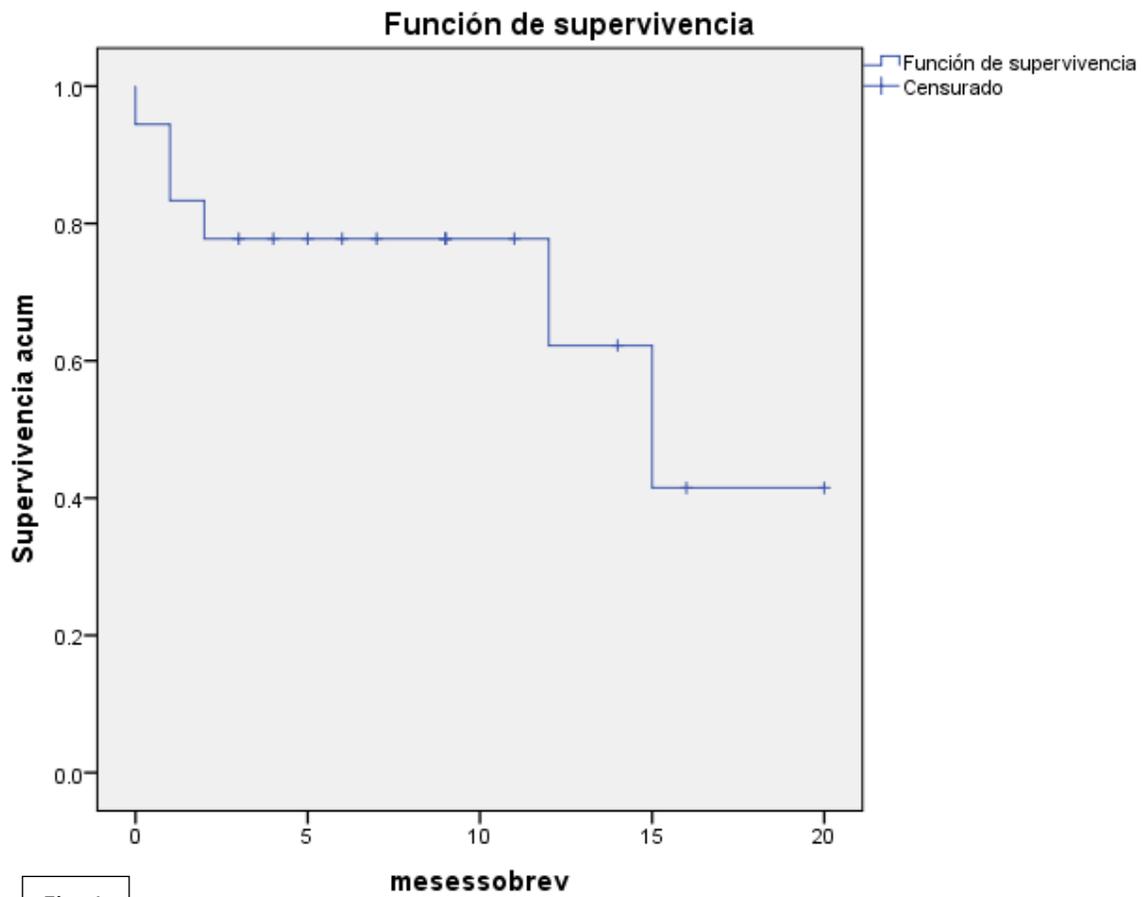


Fig. 1

Se realizaron curvas de sobrevivencia a 16 meses de acuerdo a género donde los pacientes femeninos tuvieron una sobrevivencia de 27 % comparada con aquellos de sexo masculino la cual fue de 71.4% (p: 0.84). (fig-2)

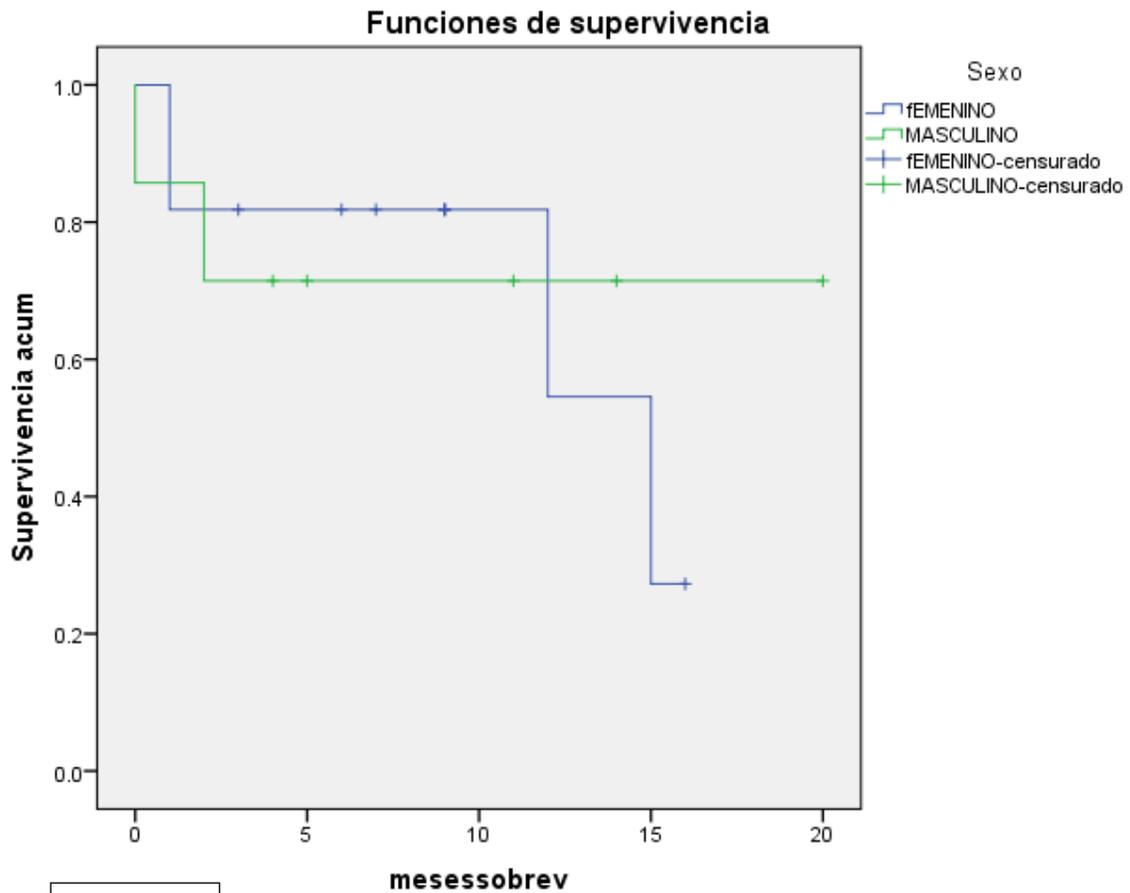


FIG. 2

De acuerdo al diagnostico histopatológico encontramos que los pacientes con astrocitoma de bajo grado presentan 40 % de sobrevivida a 20 meses. Astrocitoma de alto grado presentan sobrevivida de 100 % a 16 meses. Meduloblastoma presentan sobrevivida de 100 % a 4 meses, ependimoma 40 % a 14 meses y tumor Rabdoide teratoide de 0 % a 2 meses. (LogRT: 0.048). (fig 3).

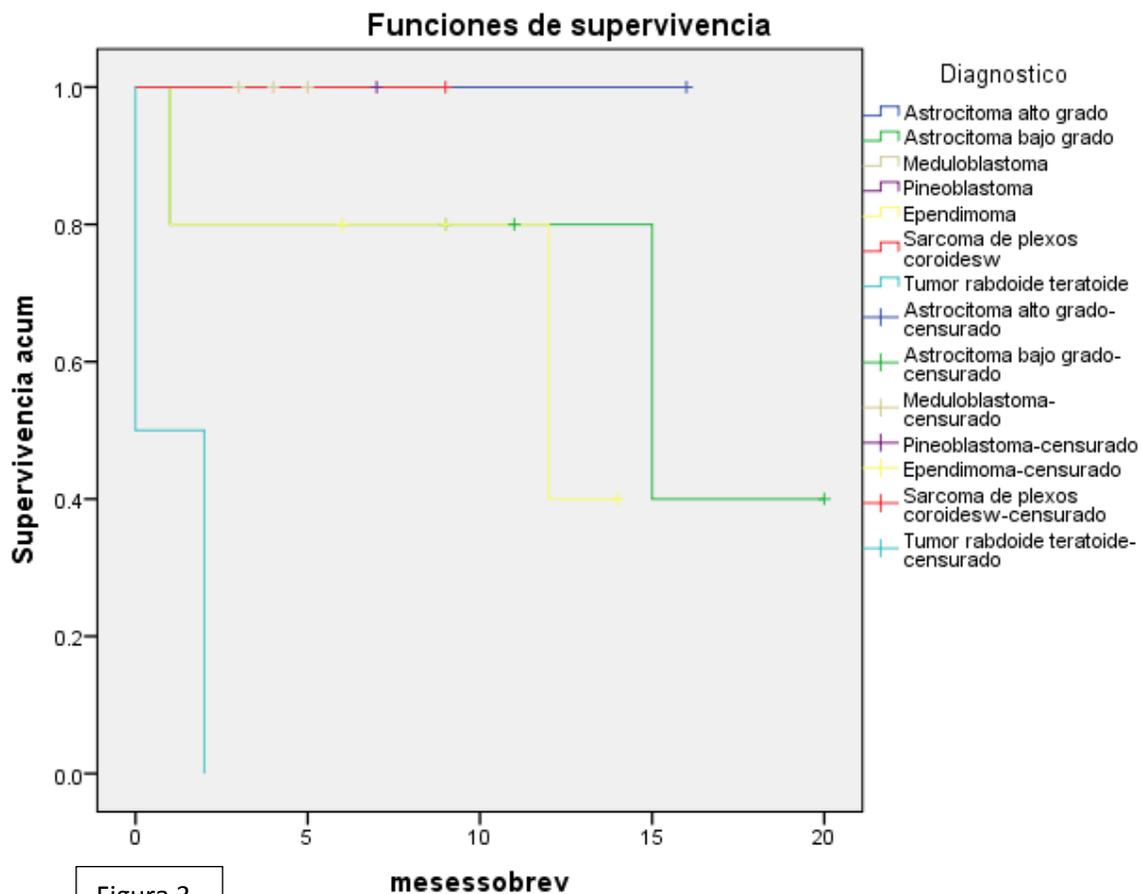
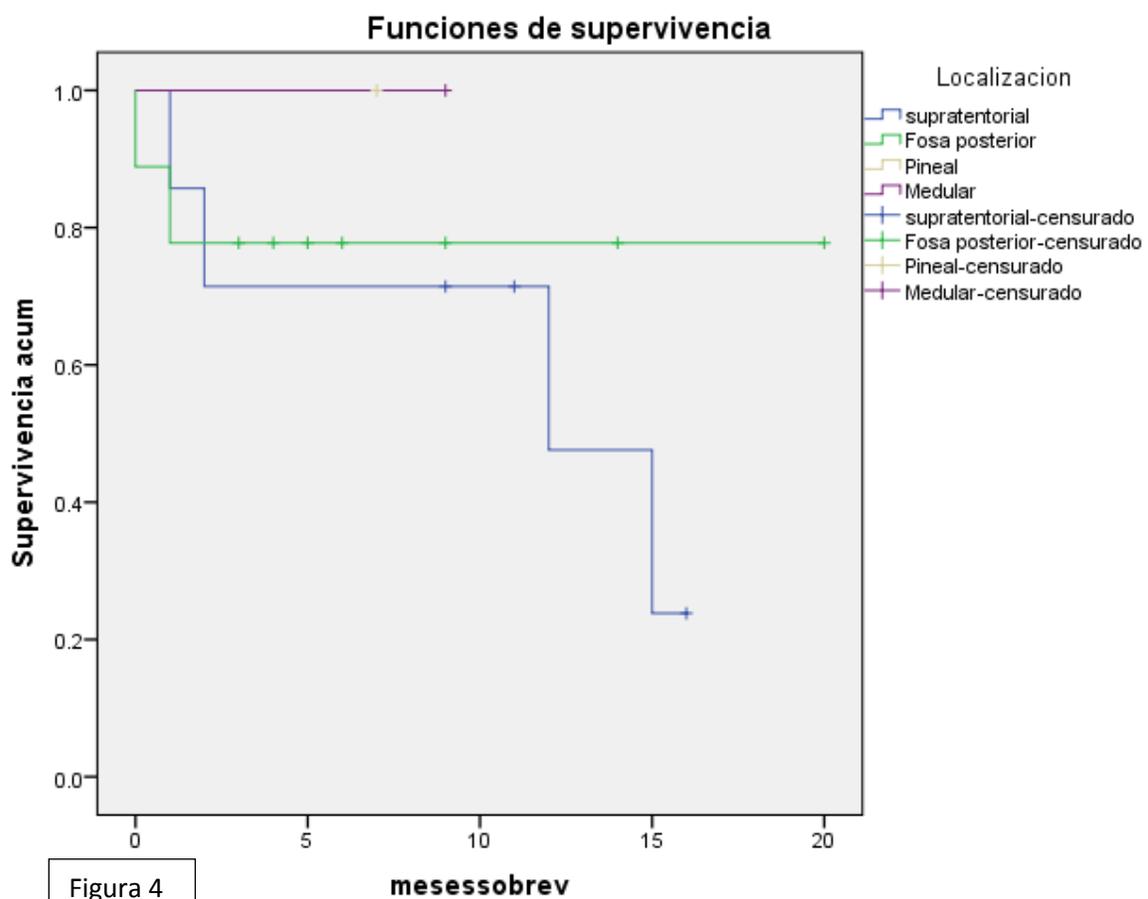


Figura 3

La sobrevida de acuerdo a la localización los pacientes que presentaron localización supratentorial tienen sobrevida de 23.8 % a 16 meses, pacientes con tumoración en fosa posterior presentan sobrevida de 77.8 % a 20 meses mientras que los pacientes con tumoración medular y pineal mostraron sobrevida de 100 %. (LogRT: 0.757). (fig 4)



De acuerdo a la presencia de progresión tumoral la sobrevida para aquellos con progresión fue de 0 % vs aquellos sin progresión 65 % a 20 meses (LogRT= 0.057) (fig 5).

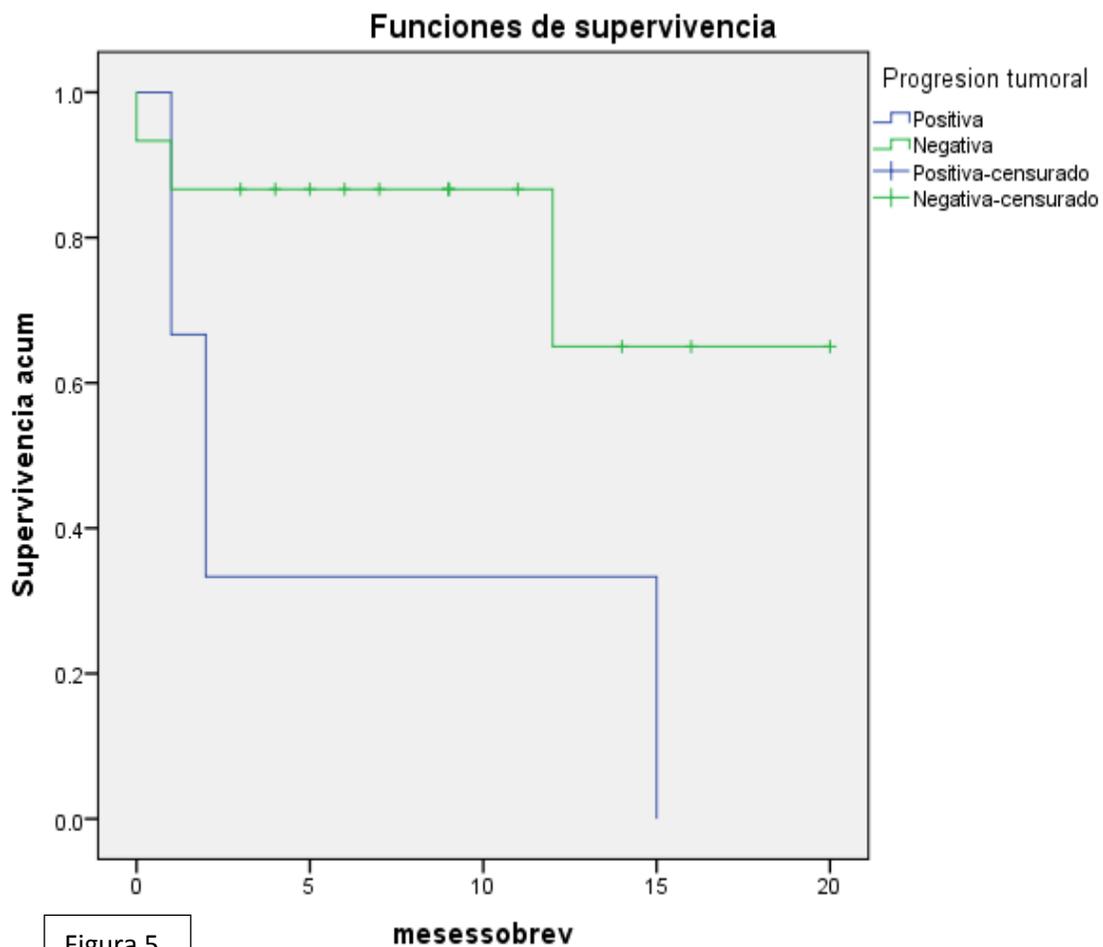
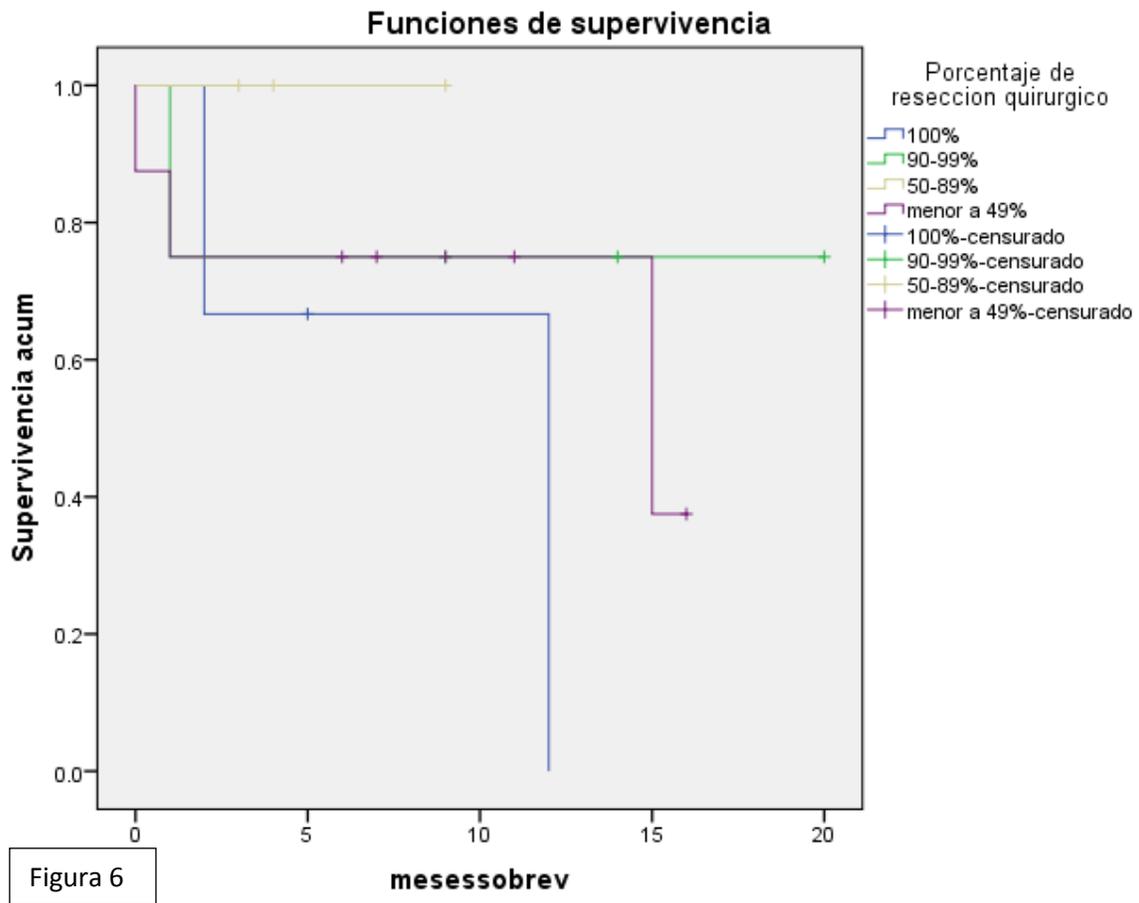


Figura 5

La sobrevida en pacientes que tuvieron resección entre 50-89 % tuvo una sobrevida del 100 %, mientras que solamente el 65 % de los pacientes que tuvieron una resección entre 90-99% presentaron una sobrevida a 12 meses. Pacientes con resección menor al 50 % tuvieron sobrevida de 67.5 % a 20 meses. Los pacientes que tuvieron una resección del 100% fallecieron antes de 12 meses. (LogRT: 0.506). (fig 6)



Los pacientes que recibieron RT muestran sobrevida de 66 % a 20 meses mientras que los pacientes que no recibieron RT tienen sobrevida de 0 % a 20 meses. (LRT: 0.02) (Fig:7)

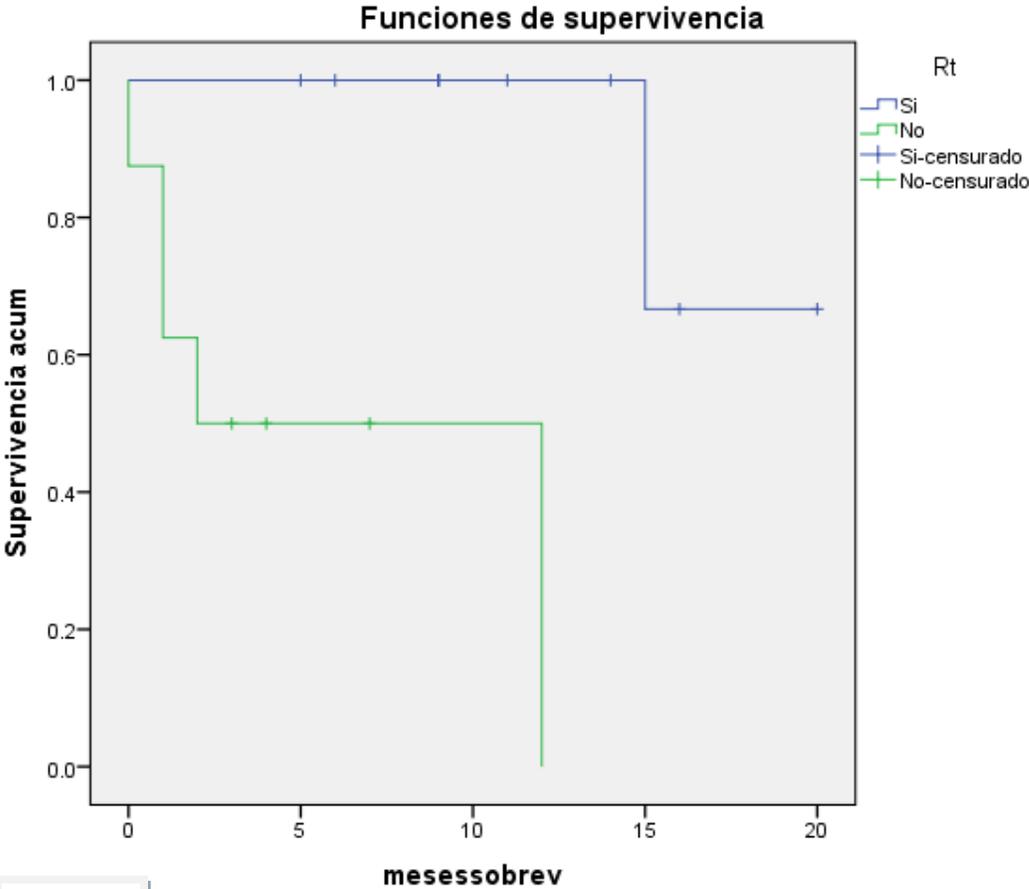


Figura 7

La sobrevida en pacientes que presentaron BCL-2 en un porcentaje menor a 50 % es de 56.4% a 20 meses, mientras que los pacientes con BCL-2 mayor a 51% mostraron sobrevida de 0% a 12 meses (LRT: 0.046%). (Fig.: 8)

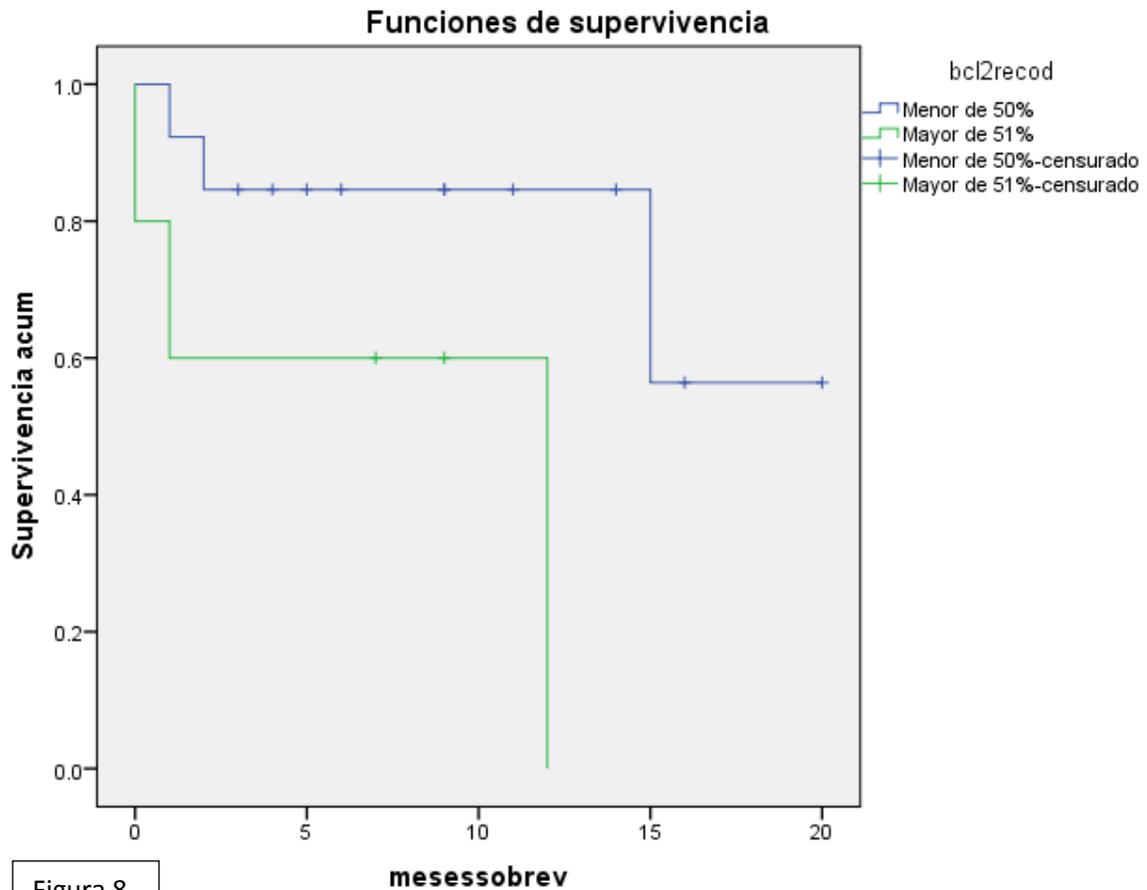


Figura 8

Al realizar modelo de regresión logística se encontraron como las variables que persistieron con significancia estadística fueron la edad menor o mayor a 3 años, y la presencia o no de progresión tumoral. (Tabla 2)

	Coeficiente de error.		C. tipificados Beta	t	Sig.
	B	Error tip			
Constante	2.804	0.619		4.533	0.001
Diagnostico	0.81	0.042	0.311	1.933	0.077
Resultado de Bcl2	0.80	0.172	0.076	0.467	0.649
Radioterapia	0.120	0.179	0.127	0.670	0.516
Edad mayor o menor de 3 años	-0.364	0.163	-0.376	-2.234	0.045
Progresión tumoral	- 0.803	0.190	-0.635	-4.218	0.001

TABLA 3.			
DIAGNOSTICO	LOCALIZACIÓN	% Bcl-2 Positivo > 50	VIVO.
Astrocitoma bajo grado.	Supratentorial	Negativo	Si
Astrocitoma bajo grado	Holomedular	Negativo	Si
Astrocitoma bajo grado	Fosa posterior	Negativo	Si
Astrocitoma bajo grado	Supratentorial	Negativo	No
Astrocitoma bajo grado	Supratentorial	Positivo	No
Astrocitoma alto grado	Supratentorial	Negativo	Si
Meduloblastoma	Fosa posterior	Negativo.	Si
Ependimoma	Supratentorial	Positivo	Si
Ependimoma	Fosa posterior	Negativo	Si
Ependimoma	Fosa posterior	Negativo	No
Ependimoma	Supratentorial	Positivo	No
Meduloblastoma	Fosa posterior	Negativo	Si
Carcinoma plexos coroideos	Fosa posterior	Negativo	Si
Ependimoma	Fosa posterior	Negativo.	Si
Pineoblastoma	Supratentorial	Positivo	Si
Tumor Rabdoide teratoide	Supratentorial	Negativo	No
Tumor rabdoide teratoide	Fosa posterior	Positivo	No
Meduloblastoma	Fosa posterior	Negativo	Si

DISCUSION:

Los avances en las técnicas de diagnóstico molecular han permitido al clínico establecer factores pronósticos para cada paciente y de este modo poder ofrecerle el mejor tratamiento posible de acuerdo a las características histológicas, biológicas y moleculares de cada tumor.

Uno de los factores pronósticos más estudiados hasta el momento son las alteraciones de la familia de genes Bcl2. Esta familia representa una diversa serie de reguladores apoptóticos que se activan de forma dinámica en respuesta a estímulos extrínsecos e intrínsecos.

Uno de los genes más importantes que se encuentran en esta familia es el gen BCL2 que se localiza en el cromosoma 18 y que codifica una proteína con función antiapoptótica. Inicialmente esta proteína se descubrió en linfomas y se creía dependía únicamente de linfomas con traslocación 14;18, posteriormente el estudio de esta proteína se extendió y actualmente se ha demostrado asociación entre la sobreexpresión de la proteína Bcl2 con resistencia a la quimioterapia en varios tipos de tumores. El cromosoma 18 tiene gran importancia sobre todo en los astrocitomas de niños mexicanos pues como se ha reportado por Rioscovian Et al el 85 % de los pacientes con este tipo de tumor presenta alteración en este cromosoma. La función de la proteína Bcl2 es antiapoptótica pues evita la liberación de citocromo C de la mitocondria evitando así continuar con la secuencia apoptótica. Se ha estudiado también la función anti-crecimiento de esta proteína como se ha comentado por Huang quienes refieren además de conferir resistencia a la apoptosis, retrasa la entrada a ciclo celular a través del incremento de p 27 que inhibe a CDK y disminuye los niveles de RB fosforilada y E2F funcional con lo que la célula retrasa el inicio de ciclo celular dando por resultado un índice de proliferación bajo. Esto se refiere como explicación del porque se expresa sobre todo en gliomas de bajo grado lo cual coincide con los estudios de inmunohistoquímica realizados por Krajewski en donde se reporta positividad en el 93 % de gliomas de bajo grado mientras que fue negativa la presencia de Bcl2 por inmunohistoquímica en Glioblastoma multiforme. En nuestro estudio la positividad fue mayor al 40% en todos los pacientes con astrocitomas de bajo grado supratentoriales, mientras que para el astrocitoma anaplásico y los astrocitomas de bajo grado de cerebelo no hubo una positividad mayor al 51%. En el caso de los meduloblastomas los 3 pacientes presentaron resultados menores de 20 % para bcl2, esto es muy semejante a lo reportado por inmunohistoquímica por Krajewski quienes reportaron solamente 25 % de pacientes con meduloblastoma positivo para bcl2 pero solamente 5 % presento positividad intensa. En el caso de los ependimomas como se ha documentado por Rushing los ependimomas presentan positividad solo en grados bajos lo cual contrasta en nuestro estudio en donde los ependimomas que tienen una localización supratentorial tienen un valor de bcl2 por citometría de flujo mayor a 50 % en relación con los que presentaron esta tumoración en fosa posterior que presentaron valores de bcl2 menores de 50 %.(19-24)

Consideramos el empleo de citometría de flujo como un método más eficiente pues es más objetivo, desde que se menciona por Barthel. El citómetro de flujo ya se esperaba como una herramienta para el diagnóstico y seguimiento de cáncer, la posibilidad de realizar una citología cuantitativa ha ayudado a dilucidar la heterogeneidad del cáncer, incluso en algunos casos ayuda a

diferenciar entre células cancerígenas y células normales. El empleo del citómetro de flujo con marcadores de superficie ha sido de los usos mas extensos, en nuestro caso combinamos el empleo de citometría de flujo con cultivos celulares, este tipo de estudios se realiza de forma frecuente para estudios de líneas celulares. Un ejemplo es la búsqueda de cáncer Stem cell en TSNC, en donde se cultiva el tumor en medios suplementados con factores de crecimiento, lo cual permite el desarrollo de neuroesferas en cortos periodos de tiempo, en esta clase de estudios como los reportados por Singh el empleo de citometría de flujo es para separar poblaciones celulares específicas. Es importante mencionar que en la mayor parte de estudios de cultivos de células tumorales las células son suplementadas con factores de crecimiento específicos además de que la gran mayoría de estudios se realizan con líneas celulares. El estudio de cultivos celulares en TSNC permite evaluar las características biológicas, genéticas y marcadores celulares. Dentro de las características biológicas que se pueden evaluar mediante cultivo de células tumorales tenemos la velocidad de implante, la velocidad de crecimiento, la formación de neuroesferas, tomando en consideración que nuestros medios de cultivo no están suplementados con factores de crecimiento.

En nuestro estudio evaluamos la positividad en cultivos celulares, en base a lo descrito previamente el empleo de citometría de flujo es mas sensible que la inmunohistoquímica, es cuantitativo y en cuanto al cultivo celular además de permitirnos evaluar las características biológicas del tumor funciona como un medio de selección de células tumorales, pues es muy difícil lograr un pase o al menos un crecimiento acelerado de células no tumorales en un medio de cultivo no suplementado con factores de crecimiento; esto se ha documentado en varios estudios como el de Hemmati donde se refiere que incluso las neuroesferas no tumorales están faltas de la capacidad de cultivarse por mas de un mes. También es importante mencionar que la técnica que se realizó tiene menos exposición de tejido a medios físicos y químicos, si tomamos en consideración la técnica de inmunohistoquímica a pesar esta técnica es el estándar morfológico tanto para diagnostico como para búsqueda de antígenos o anticuerpos específicos. Debido a que previamente no se había descrito la medición de bcl2 por citometría de flujo en cultivos celulares no se han realizado estudios que confirmen que tanto el tejido basal como el cultivo expresen la misma cantidad de positividad, además que la cantidad de pacientes que incluimos en nuestro estudio no es suficiente para confirmar los resultados obtenidos. (25-28)

En cuanto a la sobrevida en nuestro estudio los pacientes que presentaron positividad a bcl2 mayor a 51% no tuvieron sobrevida a 12 meses a diferencia de los pacientes que tuvieron valores de bcl2 menor a 50 % quienes tuvieron una sobrevida de 56 % a 20 meses (p: 0.046) , estos resultados no se habían reportado previamente pero llama la atención que los pacientes que presentaron positividad importante a BCL2 son los pacientes con tumores supratentoriales aunque no hubo significancia estadística, pero esto se podría asociar con lo reportado por Gajjar pues los pacientes con tumoración de cerebello tienen mejor pronostico, en nuestro estudio llama la atención que de los 7 pacientes con tumoración supratentorial 4 (57%) fallecieron, mientras que de los 9 pacientes que presentaron tumoración en fosa posterior solamente 2 (22%) fallecieron. La sobreexpresión de bcl2 podría ser la causa de un peor pronóstico en tumores supratentoriales al

ocasionar una replicación celular más lenta y una resistencia a la apoptosis al estabilizar la membrana mitocondrial que se traduce en mala respuesta a quimioterapia y a radioterapia lo cual también ya ha sido reportada pero en líneas celulares de meduloblastoma. (29-31)

Se confirmó lo ya conocido sobre los tumores de SNC pues los pacientes menores de 3 años presentan una sobrevida menor, sin embargo no tuvo significancia estadística que podría explicarse por la poca cantidad de pacientes incluidos en el estudio.

Llama la atención que los pacientes que tuvieron diagnóstico de astrocitoma de bajo grado tuvieron la mortalidad más elevada, junto con los pacientes con T. Rabdoide teratoide. En cuanto a los astrocitomas esto podría explicarse por la localización de los mismos, pues de los pacientes con astrocitoma de bajo grado la localización era de predominio supratentorial y en el caso de los T. rabdoide teratoide ya es conocida su poca respuesta a quimio y radioterapia. (32)

Se confirma también que la RT es un factor determinante en la sobrevida con 66 % de sobrevida a 20 meses para los que sí recibieron contra 0 % ($p: 0.02$).

Una diferencia en el estudio es la sobrevida de 0% a 12 meses de los pacientes con resección de la tumoración de 100% y del 65 % de los pacientes con resección de 90-99% ($p: 0.506$) pues normalmente este es un factor de buen pronóstico, en nuestro caso tal vez sea secundario a la heterogeneidad de la población estudiada y al tamaño de la muestra.

CONCLUSIONES:

El tratamiento personalizado de los pacientes con TSNC es el futuro en la oncología, para que esto pueda ser posible el estudio del comportamiento biológico además del estudio histopatológico es parte fundamental en el estudio de los niños con cáncer.

Es necesario realizar más estudios para determinar la utilidad de Bcl-2 en tumores supratentoriales que histopatológicamente corresponden a tumores de bajo grado pues de confirmarse que juegan un papel en la resistencia a la Quimio y Radioterapia el empleo de fármacos antiBcl-2 podría ser un factor determinante para mejorar la sobrevida en estos pacientes.

BIBLIOGRAFIA:

1. López-Aguilar E. La Medicina Traslacional en los Tumores Cerebrales Pediátricos; GAMO 2011; 10: 6-12.
2. Fisher J., Schwartzbaum J., Wrensch M., Wiemels J. Epidemiology of Brain Tumor. *Neurol Clin* 2007; 25: 867-890.
3. Fajardo A, Breve Reporte del Registro de Cáncer en niños (periodo 1996-2007) del Hospital de Pediatría del Centro Medico Nacional Silo XXI, coordinación de investigación en salud. IMSS. 2010.
4. Farrel C., Plotkin S. Genetic Causes of Brain Tumors: Neurofibromatosis, Tuberous Sclerosis, Von Hippel-Lindau, and Other Syndromes. *Neurol Clin* 2007; 25: 925- 946.
5. Packer R, MacDonald T, Vezina G. Central nervous system tumor. *Pediatr Clin N Am* 2008; 55: 121-145.
6. Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W, Burger P, Jouvet A, Schelthauer B, Klehues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central Nervous System. *Acta Neuropathol* 2007; 114: 97-109.
7. Gajjar A, Hernan R, Kocak M, Et al. Clinical, Histopathologic, and Molecular Markers of Prognosis: Toward a New Disease Risk Stratification System for Medulloblastoma. *J Clin Oncol* 2004; 22: 984- 993.
8. López-Aguilar E, Sepulveda-Vildosola A, Rioscovian-Soto A. Et al. Sobreexpresión de p53 Como Factor Pronostico en niños con Astrocitomas. GAMO 2011; 10: 6-12.
9. López-Aguilar E, Rioscovian-Soto A, Sepúlveda VA, Siordia G, Figueroa-Rosas L, De La Cruz-Yáñez H. Sobreexpresión de BCL-2 como factor pronostico en niños con Astrocitomas. GAMO 2011; 10: 6-12.
10. Tyagi D, Sharma BS, Gupta SK, Kaul D, Vasishta RK, Khosla VK. Expression of Bcl2 proto-oncogene in primary tumors of the central nervous system. *Neurol India* 2002;50:290
11. Panosyan E, Laks D, Masterman-Smith M. Et al. Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passageable neurosphere formation. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 55: 644-651
12. Michaud W, Nichols A, Mroz E, Et al. Bcl-2 Blocks Cisplatin-Induced Apoptosis and Predicts Poor Outcome Following Chemoradiation Treatment in Advanced Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 1645-1654.
13. Wang H, Zhang S, Wang S, Et al. REV3L confers Chemoresistance to Cisplatin in Human Gliomas: The Potential of its RNAi for Synergistic Therapy. *Neuro Oncology.* 2009; 11: 790-802.
14. Pollak I. Diagnostic and Therapeutic Stratification of Childhood Brain Tumors: Implications for Translational Research. *J Child Neurol.* 2008; 23: 1179-1185.
15. López-Aguilar E, Rivera M, Cerecedo D, Et al. Preirradiation ifosfamide, Carboplatino and Etoposide (ICE) for the treatment of high- grade astrocitomas in children. *Childs Nerv Syst.* 2003; 19: 818- 823.

16. López-Aguilar E, Sepulveda-Vildosola AC, Rivera-Marquez H, Et al. Survival of Patients with Medulloblastoma Treated with Carboplatin and Etoposide Before and After Radiotherapy. Archives of Medical Research. 1998; 29: 313- 317
17. López-Aguilar E, Sepulveda-Vildosola A, Betanzos Cabrera Y, Et al. Factores Pronosticos y Sobrevida de Pacientes pediátricos con Ependimomas. Gac Med Méx. 2009; 145: 7- 13.
18. Pritchard JR, Gilbert LA, Meacham CE, Ricks JL, Jiang H, Lauffenburger DA, Hemann MT. Bcl-2 family genetic profiling reveals microenvironment-specific determinants of chemotherapeutic response. Cancer Res. 2011; 17:5850-5858.
19. López-Aguilar E, Rioscovian-Soto A. Asociación de alteraciones cromosómicas mediante CGH con la sobrevida en pacientes pediátricos con astrocitoma. Tesis. 2012.
20. Pezzella F, Cordell K, Gatter C, Et al. Expression of the Bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 Chromosomal translocation. AJP. 1990; 137: 225- 232.
21. Kouri F, Jensen S, Stegh A. The Role of Bcl2 Family Proteins in therapy Responses of Malignant Astrocytic Gliomas: Bcl2L12 and Beyond. The Scientific World Journal. 2011; vol. 2012: 1-8
22. Krajewsky S, Krajewska M, Ehrmann J, Et al. Inmunohistochemical Analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1 and Bax in tumors of central and peripheral Nervous System Origin. AJP. 1997. 150: 805- 814.
23. Huang D, O'Reilly L, Strasser A, et al. The anti-apoptosis function of BCL-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. EMBO journal. 1997; 16: 4628- 4638.
24. Rushing E, Brown D, Hladik C, Et al. Correlation of bcl-2, p53 and MIB-1 expression with ependymoma grade and subtype. Mod Pathol. 1998; 11: 464-70.
25. Barlogie B, Raber M, Schumann J, Et al. Flow Cytometry in clinical Cancer Research. Cancer res. 1983. 43: 3982-3997.
26. Hemmati H, Nakano I, Lazareff J, Et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. PNAS. 2003. 100: 15178- 15183.
27. Singh S, Clarke I, Terasaki M, Et al. Identification of cancer stem cell in Human Brain tumors. Cancer Res. 2003: 5821-5828.
28. Xu J, Erdreich-Epstein A, Gonzalez-Gomez I, Et al. Novel cell lines established from pediatric brain tumors. J. Neurooncol. 2012; 107: 269-280.
29. Gajjar A, Sanford R, Heideman R, et al. Low-grade astrocytoma: a decade of experience at St. Jude Children's Research Hospital. J Child Neurol. 1997. 15: 2792-2799.
30. Rogers D, Nylander K, Mi Z, Et al. Molecular predictors of human nervous system cancer Responsiveness to Etoposide Chemotherapy. Cancer chemother Pharmacol. 2008; 62: 699-706.
31. Hilden J, Meerbaum S, Burger P, Et al, Central Nervous System Atypical Teratoid/Rhabdoid tumor: results of Therapy in children enrolled in a Registry. J. Clin Oncol. 2004; 22: 2877-2884.

**SOBRE EXPRESION DE Bcl-2 POR CITOMETRIA DE FLUJO EN CULTIVOS
CELULARES PRIMARIOS Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA AL
TRATAMIENTO Y SOBREVIVENCIA EN PACIENTES PEDIATRICOS CON TUMOR
CEREBRAL.**

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES:

	MAY - JUN- 2011	JUL - AGO. 2011	SEP - DIC. 2011	ENE- FEB. 2012	MAR- ABR. 2012	MAY- JUN. 2012	JUL- SEP. 2012
PLANTEAMIENTO	XX						
INFORMACION BIBLIOGRAFIA.		XX					
ELABORACION.			XX				
RECOLECCION DE DATOS.					XX		
RESULTADOS						Xx	
DISCUSION						xx	
PRESENTACION DE EXAMEN.							XX
PUBLICACION							XX

Anexo 1:

Table 1 The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Reprinted from Ref. 35

TUMOURS OF NEUROEPITHELIAL TISSUE		Neuronal and mixed neuronal-glial tumours	
Astrocytic tumours		Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	9493/0
Pilocytic astrocytoma	9421/1 ¹	Desmoplastic infantile astrocytoma/ganglioglioma	9412/1
Pilomyxoid astrocytoma	9425/3*	Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1	Gangliocytoma	9492/0
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	Ganglioglioma	9505/1
Diffuse astrocytoma	9400/3	Anaplastic ganglioglioma	9505/3
Fibrillary astrocytoma	9420/3	Central neurocytoma	9506/1
Gemistocytic astrocytoma	9411/3	Extraventricular neurocytoma	9506/1*
Protoplasmic astrocytoma	9410/3	Cerebellar liponeurocytoma	9506/1*
Anaplastic astrocytoma	9401/3	Papillary glioneuronal tumour	9509/1*
Glioblastoma	9440/3	Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle	9509/1*
Giant cell glioblastoma	9441/3	Paraganglioma	8680/1
Gliosarcoma	9442/3		
Gliomatosis cerebri	9381/3		
		Tumours of the pineal region	
Oligodendroglial tumours		Pineocytoma	9361/1
Oligodendroglioma	9450/3	Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3
Anaplastic oligodendroglioma	9451/3	Pineoblastoma	9362/3
		Papillary tumour of the pineal region	9395/3*
Oligoastrocytic tumours			
Oligoastrocytoma	9382/3	Embryonal tumours	
Anaplastic oligoastrocytoma	9382/3	Medulloblastoma	9470/3
		Desmoplastic/nodular medulloblastoma	9471/3
Ependymal tumours		Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3*
Subependymoma	9383/1	Anaplastic medulloblastoma	9474/3*
Myxopapillary ependymoma	9394/1	Large cell medulloblastoma	9474/3
Ependymoma	9391/3	CNS primitive neuroectodermal tumour	9473/3
Cellular	9391/3	CNS Neuroblastoma	9500/3
Papillary	9393/3	CNS Ganglioneuroblastoma	9490/3
Clear cell	9391/3	Medulloepithelioma	9501/3
Tanycytic	9391/3	Ependymoblastoma	9392/3
Anaplastic ependymoma	9392/3	Atypical teratoid / rhabdoid tumour	9508/3
Choroid plexus tumours		TUMOURS OF CRANIAL AND PARASPINAL NERVES	
Choroid plexus papilloma	9390/0	Schwannoma (neurilemoma, neurinoma)	9560/0
Atypical choroid plexus papilloma	9390/1*	Cellular	9560/0
Choroid plexus carcinoma	9390/3	Plexiform	9560/0
		Melanotic	9560/0
Other neuroepithelial tumours			
Astroblastoma	9430/3	Neurofibroma	9540/0
Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1	Plexiform	9550/0
Angiocentric glioma	9431/1*		

¹ Morphology code of the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (814A) and the Systematized Nomenclature of Medicine (<http://snomed.org>). Behaviour is coded /0 for benign tumours, /3 for malignant tumours and /1 for borderline or uncertain behaviour.

* The italicised numbers are provisional codes proposed for the 4th edition of ICD-O. While they are expected to be incorporated into the next ICD-O edition, they currently remain subject to change.

Anexo 1 continuación:

Table 1 continued

Perineurioma		Haemangiopericytoma	9150/1
Perineurioma, NOS	9571/0	Anaplastic haemangiopericytoma	9150/3
Malignant perineurioma	9571/3	Angiosarcoma	9120/3
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)		Kaposi sarcoma	9140/3
Epithelioid MPNST	9540/3	Ewing sarcoma - PNET	9364/3
MPNST with mesenchymal differentiation	9540/3	Primary melanocytic lesions	
Melanotic MPNST	9540/3	Diffuse melanocytosis	8728/0
MPNST with glandular differentiation	9540/3	Melanocytoma	8728/1
		Malignant melanoma	8720/3
		Meningeal melanomatosis	8728/3
TUMOURS OF THE MENINGES		Other neoplasms related to the meninges	
Tumours of meningeothelial cells		Haemangioblastoma	9161/1
Meningioma	9530/0	LYMPHOMAS AND HAEMATOPOIETIC NEOPLASMS	
Meningothelial	9531/0	Malignant lymphomas	9590/3
Fibrous (fibroblastic)	9532/0	Plasmacytoma	9731/3
Transitional (mixed)	9537/0	Granulocytic sarcoma	9930/3
Psammomatous	9533/0	GERM CELL TUMOURS	
Angiomatous	9534/0	Germinoma	9064/3
Microcystic	9530/0	Embryonal carcinoma	9070/3
Secretory	9530/0	Yolk sac tumour	9071/3
Lymphoplasmacyte-rich	9530/0	Choriocarcinoma	9100/3
Metaplastic	9530/0	Teratoma	9080/1
Chordoid	9538/1	Mature	9080/0
Clear cell	9538/1	Immature	9080/3
Atypical	9539/1	Teratoma with malignant transformation	9084/3
Papillary	9538/3	Mixed germ cell tumour	9085/3
Rhabdoid	9538/3		
Anaplastic (malignant)	9530/3	TUMOURS OF THE SELLAR REGION	
Mesenchymal tumours		Craniopharyngioma	9350/1
Lipoma	8850/0	Adamantinomatous	9351/1
Angiolipoma	8861/0	Papillary	9352/1
Hibernoma	8880/0	Granular cell tumour	9582/0
Liposarcoma	8850/3	Pituitary	9432/1*
Solitary fibrous tumour	8815/0	Spindle cell oncocytoma of the adenohypophysis	8291/0*
Fibrosarcoma	8810/3		
Malignant fibrous histiocytoma	8830/3	METASTATIC TUMOURS	
Leiomyoma	8890/0		
Leiomyosarcoma	8890/3		
Rhabdomyoma	8900/0		
Rhabdomyosarcoma	8900/3		
Chondroma	9220/0		
Chondrosarcoma	9220/3		
Osteoma	9180/0		
Osteosarcoma	9180/3		
Osteochondroma	9210/0		
Haemangioma	9120/0		
Epithelioid haemangioendothelioma	9133/1		

Anexo 2:

	I	II	III	IV
Astrocytic tumours				
Subependymal giant cell astrocytoma	•			
Pilocytic astrocytoma	•			
Pilomyxoid astrocytoma		•		
Diffuse astrocytoma		•		
Pleomorphic xanthoastrocytoma		•		
Anaplastic astrocytoma			•	
Glioblastoma				•
Giant cell glioblastoma				•
Gliosarcoma				•
Oligodendroglial tumours				
Oligodendroglioma		•		
Anaplastic oligodendroglioma			•	
Oligoastrocytic tumours				
Oligoastrocytoma		•		
Anaplastic oligoastrocytoma			•	
Ependymal tumours				
Subependymoma	•			
Myxopapillary ependymoma	•			
Ependymoma		•		
Anaplastic ependymoma			•	
Choroid plexus tumours				
Choroid plexus papilloma	•			
Atypical choroid plexus papilloma		•		
Choroid plexus carcinoma			•	
Other neuroepithelial tumours				
Angiocentric glioma	•			
Chordoid glioma of the third ventricle		•		
Neuronal and mixed neuronal-gliial tumours				
Gangliocytoma	•			
Ganglioglioma	•			
Anaplastic ganglioglioma			•	
Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	•			
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	•			
Central neurocytoma				
Central neurocytoma		•		
Extraventricular neurocytoma				
Extraventricular neurocytoma		•		
Cerebellar liponeurocytoma				
Cerebellar liponeurocytoma		•		
Paraganglioma of the spinal cord				
Paraganglioma of the spinal cord	•			
Papillary glioneuronal tumour				
Papillary glioneuronal tumour	•			
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle				
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle	•			
Pineal tumours				
Pineocytoma	•			
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation		•	•	
Pineoblastoma				•
Papillary tumour of the pineal region		•	•	
Embryonal tumours				
Medulloblastoma				•
CNS primitive neuroectodermal tumour (PNET)				•
Atypical teratoid / rhabdoid tumour				•
Tumours of the cranial and paraspinal nerves				
Schwannoma	•			
Neurofibroma	•			
Perineurioma	•	•	•	
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)		•	•	•
Meningeal tumours				
Meningioma	•			
Atypical meningioma		•		
Anaplastic / malignant meningioma			•	
Haemangiopericytoma		•		
Anaplastic haemangiopericytoma			•	
Haemangioblastoma	•			
Tumours of the sellar region				
Craniopharyngioma	•			
Granular cell tumour of the neurohypophysis	•			
Pituicytoma	•			
Spindle cell oncocytoma of the adenohypophysis	•			