



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,**  
**ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.**

**Campo del conocimiento: Oncología Pediátrica.**

**TÍTULO**

**BCL-2 COMO PREDICTOR DE RECAIDA EN TUMORES DE SISTEMA NERVIOSO  
CENTRAL EN LA EDAD PEDIATRICA.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS.**

**PRESENTA:**

**HORACIO MARQUEZ GONZALEZ.**

**TUTOR:**

**ENRIQUE LÓPEZ AGUILAR**  
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,  
Odontológicas y de la Salud

**MÉXICO, D.F. JUNIO 2014**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Número de aceptación del protocolo:**

**R-2012-3606-77**



**Tutor :**

**Dr. Javier Enrique López Aguilar**

**Médico Oncólogo Pediatra.**

**Jefe del departamento de Oncología Médica del HP CMN SXXI**

**Correo electrónico: oncolab@yahoo.com.mx**

**Alumno:**

**Horacio Márquez González**

**Pediatra**

**horaciomarquez84@hotmail.com**





**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
Coordinación de Investigación en Salud

**Dictamen de Autorizado**

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 3603  
HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, D.F. SUR

FECHA **07/12/2012**

**DR. JAVIER ENRIQUE LÓPEZ AGUILAR**

**P R E S E N T E**

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

**ASOCIACION DE LA EXPRESION DE BCL2 EN LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO COMO PREDICTOR DE RECAIDA EN TUMORES DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL QUE SE DISEMINAN A NEUROEJE EN PACIENTES PEDIATRICOS. ESTUDIO DE COHORTE.**

que usted sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

|                         |
|-------------------------|
| <b>Núm. de Registro</b> |
| <b>R-2012-3603-77</b>   |

ATENTAMENTE

**DR. HERMILO DE LA CRUZ YANEZ**

Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3603

**IMSS**

SEGURO SOCIAL Y SALUD PARA TODOS



## Tabla de contenido

|  |    |
|--|----|
| Palabras Clave .....   | 5  |
| Resumen Estructurado .....   | 6  |
| Marco Teórico .....  | 7  |
| Planteamiento del problema.....  | 24 |
| Pregunta de investigación.....   | 24 |
| Justificación .....  | 25 |
| Hipótesis .....  | 25 |
| Objetivos.....   | 25 |
| Métodos.....   | 26 |
| Tabla de variables:.....   | 29 |
| Tamaño de muestra.....   | 32 |
| Plan de análisis estadístico .....   | 33 |
| Consideraciones éticas .....   | 33 |
| Resultados.....  | 35 |
| Discusión .....  | 37 |
| Conclusiones .....   | 41 |
| Anexos .....   | 42 |
| Anexo 1.....   | 50 |
| <i>Metodología para determinar número de células tumorales por Citometría de flujo ...</i> | 50 |
| Referencias bibliográficas.....  | 51 |



## Palabras Clave

SNC: Sistema Nervioso Central.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

LCR: Líquido Cefalorraquídeo



## Resumen Estructurado

A nivel mundial, las neoplasias son la tercera causa de muerte en la edad pediátrica, de éstas, las de sistema nervioso central ocupan el segundo lugar.

Las nuevas terapéuticas han mejorado la esperanza de vida de estos tumores a 5 años.

BCL-2 es una proteína que codifica mediante diversos dominios de la célula la inmortalidad a través de la inhibición del sistema de caspasas (principales responsables de la apoptosis) La determinación de dichas proteínas puede favorecer en quehacer clínico para ofrecer pronóstico y un manejo dinámico del tratamiento.

**Objetivo:** Determinar la asociación de la expresión de BCL-2 como predictor de recaída en pacientes pediátricos con tumores de sistema nervioso central que se diseminan a neuroeje en pacientes pediátricos.

**Tipo de estudio:** Estudio de cohorte.

**Métodos:** Se incluyeron pacientes con diagnóstico reciente de tumores de SNC con diseminación a neuroeje: meduloblastomas, ependimomas, pinealoblastomas y germinales. Posterior a la resección quirúrgica se tomó LCR y se incluyeron a los pacientes con celularidad positiva, de estos se determinó mediante citometría de flujo la positividad para Bcl-2. Se siguieron durante el primer año de tratamiento y se determinaron otros factores de riesgo asociados: resección, radioterapia, quimioterapia, sitio de presentación. Se determinó la variable dependiente de recaída por medio de Resonancia Magnética Nuclear.

**Análisis estadístico:** se realizarán medidas de dispersión y de tendencia central, cálculo de sobrevida por método de Cox y de riesgos por Hazard ratio. Se realizará análisis de sobrevida por Kaplan Meier para determinar la probabilidad de estar libre de la recaída con la presencia de BCL-2.

**Resultados:** La cohorte de conformó por 57 pacientes, con una de los cuales 35 (61%) correspondieron al sexo masculino, con una mediana de edad al inicio del diagnóstico de 120 meses (15-98).

El Bcl-2 se expresó en 31 pacientes (53%) y la recaída en 16 (26%). Se diferenció una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de la proteína Bcl-2 con un HR de 6.7(1.7-24) confirmando una probabilidad de estar libre de recaída en 12 meses del 31%.

**Conclusiones:** Hasta el momento de seguimiento, el Bcl-2 es un factor predictor independiente de recaída en tumores de SNC .



## Marco Teórico

### *Epidemiología del cáncer de SNC.*

En cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, tan sólo en 2008 fue la causa del 13% de todas las muertes (7.8 millones). De éstas los tumores de sistema nervioso central presentaron una incidencia de 3.5x100,000 habitantes y una mortalidad de 2.5 x 100,000. .En la edad pediátrica, Los tumores del sistema nervioso central en niños, presentan una incidencia de 2.76 a 4.03/100,000 niños al año . En Estados Unidos se diagnostican al año, entre 2500 a 3500 casos nuevos de tumores cerebrales en niños El “Central Brain Tumor Registry” de USA (2007 – 2008), reportó las siguientes frecuencias en el grupo de edad de 0 a 14 años: 15.5% para tumores embrionarios incluyendo al meduloblastoma, 2.8% para glioblastomas y 20.5% para los astrocitomas pilocíticos vs 5.6%, 3.8% y 14.6% respectivamente, en el grupo de 15 a 19 años.

Los demás astrocitomas representaron un 9.5% y 10.4% respectivamente en los 2 grupos de edad previamente mencionado.

1

En México, en 1987, los tumores cerebrales ocupaban la segunda causa de muerte en el grupo etario comprendido entre los 5 y 14 años, y la tercera parte de las causas de muerte, después de las malformaciones y de los accidentes, en el grupo de edades comprendidas entre 1 y 4 años<sup>2</sup>.

En relación a la mortalidad, de 1990-1994, los tumores de sistema nervioso central, en derechohabientes del IMSS, ocuparon en tasa de 10x6 por edades: de 0-4 años, 9.4; 5-9 años , 9.41; 10-14 años, 7.1, y global 8.75. Siendo el Distrito Federal, el que presenta mayor porcentaje de muertes en un 10%<sup>3</sup>.

Apartir de 2004 se realizaron registros de las unidades de atención de todo el país pertenecientes el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) que reporta que los tumores del sistema nervioso central en niños presentan una frecuencia más baja en relación a los niños norteamericanos (12% vs 20 %) con una tasa de 14.7 por cada 100,000 niños, pertenecientes a la región sur del país (Distrito Federa, Oaxaca, Chiapas, Morelos y Guerrero); el 90% pertenecen a meduloblastomas, astrocitomas, tumores germinales y pinealoblastomas.<sup>4</sup>





La mortalidad de estas neoplasias es alta, es la sexta causa de muerte en la edad preescolar, y la novena causa en la edad escolar. No obstante existe una disminución del 23% desde 1975 debido a los avances en el tratamiento con quimioterapia<sup>5</sup>.

La mayoría de tumores infantiles son de origen embrionario y se caracterizan por desarrollarse en las primeras dos décadas de la vida, cursar con un corto período de latencia y localizarse dentro del neuroeje con un crecimiento rápido, agresivo e invasivo. El 40% son infratentoriales, el 54% supratentoriales y el 6% se localizan en la médula. Respecto de la localización anatómica, los tumores de la fosa posterior y de áreas paraselares son más frecuentes en la infancia y adultos jóvenes, mientras que en el adulto predominan los tumores supratentoriales. Las diseminaciones de ocurrir suelen suceder dentro del neuroeje y sólo en muy raras ocasiones fuera de él. La asociación con carcinógenos ambientales es rara, y en comparación con los que se presentan en la edad adulta la presentación de metástasis es muy rara (un 4% frente al 25%). Son más quimiosensibles y radiosensibles y presentan mayor tasa de curaciones que los tumores de la edad adulta<sup>6</sup>.

El diagnóstico se realiza con la Tomografía Axial Computada (TAC) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fundamentalmente y el tratamiento es el quirúrgico y si es preciso tratamiento oncológico<sup>7 8</sup>.

La forma más común de presentación de los tumores cerebrales es un déficit neurológico progresivo (68%), frecuentemente paresia (45%), seguido por cefalea (54%) y crisis epilépticas (26%). No existen signos o síntomas patognomónicos para el diagnóstico de un tumor cerebral en pacientes aminasen, inicialmente van en relación al incremento de la presión intracraneana, lo que puede deberse o a una masa que crece y ocupa espacio o a obstrucción en la circulación del líquido cefalorraquídeo<sup>9</sup>.

Las recaídas de los tumores de sistema nervioso central se presentan aproximadamente en el 30% de los tumores, de éstas, el 80% se presentan durante los primeros 12-24 meses después de iniciado el tratamiento<sup>10</sup>.

Cuando se combinan dos síntomas como cefalea o vómito, es más sugestivo de una tumoración.

En 2006, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la clasificación de los tumores del SNC, la cual la divide en 15 grupos: atrocíticos, oligodendroglía, ependimales, neuroepiteliales, neuronales, de la región pineal, embionarios, de nervios espinales y paraespinales, meníngeos, del sistema hematopoyético, células germinales, de s los síndromes de tumores familiares, de la región selar y metastásicos<sup>11</sup>.



Los tumores con diseminación en neuroeje son los de las familias correspondientes a las células endodermiales, la región pineal y embrionarios; específicamente: meduloblastomas, endodimomas, pialoblastomas, y germinales. A continuación se mencionan aspectos relevantes de cada uno de estas neoplasias.

Clasificación de los tumores de Sistema Nervioso Central por la OMS.

---

**Tumores del tejido neuroepitalial**

- Tumores astrocíticos
- Oligodendrogiales
- Gliomas mixtos
- Ependimarios
- Plexos coroideos
- Gliales de origen incierto
- Neuronales mixtos
- Neuroblásticos
- Región pineal.
- Embrionarios
- Neuroectodérmico primitivo.
- Rabdoide

---

**Tumores de nervios periféricos**

- Schwannoma
- Neurofibroma
- Perineuroma
- De la vaina nerviosa
- melanótico

---

**Meninges**

- Células meningioteliales
- No meningoendoteliales
- Melanocíticas

---

**Linfomas y Neoplasias Hematopoyéticas**

---

**Células germinales**

---

**Región selar**

---

**Metastásicos**

---

### *Meduloblastomas*

El término meduloblastoma fue acuñado en 1925 por Bailey y Cushing cuando describieron clínica y patológicamente las características de las lesiones en 29 pacientes con “ un tumor muy celular y de un tipo celular peculiar.”<sup>12</sup>



Los meduloblastomas se originan a partir de células granulares del cerebelo cerca del techo del cuarto ventrículo. Se pueden diseminar por contigüidad hacia el pedúnculo cerebelar, a lo largo del piso del cuarto ventrículo, hacia la médula cervical o cerca del tentorium<sup>13</sup>.

Es el tumor maligno cerebral más frecuente de la infancia y representa el 15% al 20% de los tumores cerebrales y 30% a 40% de todos los tumores de fosa posterior en este grupo de edad, con una incidencia de alrededor de 6 casos por millón de habitantes por año en los EE.UU.. Las tasas de incidencia estandarizadas Mundial son de 5,5 casos por cada millón de años del niño en los niños .Las edades máximas para la presentación son entre 3 y 8 años. Hay un discreto predominio masculino (1,5:1) . Dentro de su comportamiento tienen una propensión marcada a las semillas dentro de las vías del líquido cefalorraquídeo, con evidencia de diseminación metastásica como ocurre en entre un 11% y 43% de los casos al momento del diagnóstico.

La presentación de datos clínicos son más frecuentes los de hipertensión endocraneana, debido a que los meduloblastomas se localizan en el cuarto ventrículo, por lo que hay obstrucción del flujo de líquido cefalorraquídeo y como consecuencia hidrocefalia, somnolencia, estupor, náusea y vómito, la sintomatología es de predominio matutino debido a un aumento de la presión intracraneana por disminución de la absorción y elevación de presión arterial de bióxido de carbono y al despertar hay sintomatología. Asimismo, hay afección de pares craneales principalmente del cuarto y sexto. A la exploración se observara papiledema bilateral si es severa puede ocasionar escotomas hasta ceguera<sup>8</sup>, ataxia, *nistagmus*. En niños mas jóvenes puede haber datos de hemorragia subaracnoidea secundaria a sangrado tumoral<sup>14</sup>.

Los factores de riesgo que influyen en la evolución natural de esta tumoración incluyen: la ploidía celular, la expresión del receptor de neurotrofina-3 (TrkC), expresión del MYCC y/o ERBB2, delección del p17, sobreexpresión del PDGF, expresión del p53 y survivina<sup>15, 16</sup>. Se ha reportado menor sobrevida en los pacientes que expresan BCL-2 en los cortes tumorales que en aquellos que no lo hacen.<sup>17</sup>

En el momento del diagnóstico existe una diseminación a través del líquido cefalorraquídeo hacia otros sitios intracraneales, la médula espinal, o ambos en el 20-30% de los pacientes<sup>18</sup>.

Es obligado que en los pacientes de reciente diagnóstico se realice estudio de neuroimagen y citología de LCR para determinar la extensión de la enfermedad<sup>19</sup>.

Asimismo en estudios retrospectivos se ha determinado que el pronóstico de la



enfermedad se relaciona con la variedad celular, anaplasia y desmoplasia y sobre todo la presencia de diseminación en neuroeje<sup>20</sup>.

### *Pinealoblastomas*

Es un tumor embrionario maligno primitivo de la glándula pineal, que afecta principalmente al grupo en edad pediátrica, frecuentemente asociado con diseminación vía LCR. Se compone de capas gruesas de células pequeñas con núcleos redondos de contorno irregular y escaso citoplasma. En cuanto a la incidencia los pineoblastomas son raros, constituyen aproximadamente el 40% de los tumores parenquimatosos de la región pineal. Se presentan a cualquier edad, pero la mayoría se presenta en las primeras dos décadas de vida con una media de edad de 18.5 años; sin predominio de género. La media de supervivencia varía de 24 a 30 meses<sup>21, 22</sup>.

En el estudio de neuroimagen en la RMN se observa una imagen heterogénea hipo o isointensa<sup>23, 24</sup>. Es un tumor potencialmente agresivo, con siembra a líquido cefalorraquídeo<sup>25, 26</sup>.

La extensión de la enfermedad al momento del diagnóstico mediante detección vía LCR o RMN, determina la supervivencia del paciente. La extensión de la resección y la radioterapia determina el pronóstico<sup>27</sup>. Siendo las metástasis a SNC y columna vertebral la principal causa de muerte<sup>28</sup>. En ocasiones, el tumor pineal permanece asintomático y se detecta como hallazgo incidental en estudios de imagenología; en estos casos el pronóstico mejora.

El inmunofenotipo de los pineoblastomas está determinado por marcadores entre los que se encuentran receptores neurogénicos de la glía. Positividad para sinaptofisina, tubulina III y cromogranina A<sup>29, 30</sup>.

### *Tumores Germinales.*

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



tumores primarios intracraneales, y aproximadamente del 3-4% de éstos afectan a niños<sup>31, 32, 33</sup>.

Aproximadamente el 80% de los tumores de células germinales de SNC afecta a sujetos menores de 25 años de edad, con un pico de incidencia entre los 10-14 años de edad, y predomina principalmente en varones<sup>34, 35, 36</sup>.

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

Como otros tumores de células germinales extragondales, las variantes de SNC afectan principalmente la línea media: 80% o más se desarrolla en estructuras cerca del tercer ventrículo, siendo la región de la glándula pineal el principal sitio de origen, seguido del compartimento supraselar<sup>37</sup>. Otros sitios pueden ser la región intraventricular, periventricular difusa, ganglios basales, tálamo, intramedular e intraselar.

Los hallazgos de imagenología son inespecíficos<sup>38, 39</sup>. En la RMN se observan como masas sólidas iso o hipertensas similares a la materia gris; también existen hallazgos como hidrocefalia, invasión a estructuras vecinas y metástasis óseas vía LCR; éstas últimas se visualizan como zonas lineares o nodulares que se extienden sobre la superficie ventricular o en el espacio subaracnoideo.

El tratamiento de los tumores con diseminación al neuroeje, se utilizan esquemas ya establecidos como: bleomicina, etopósido y carboplatino. En algunas fases puede administrarse ciclofosfamida y BCNU<sup>40</sup>.

### **Factores de riesgo de los tumores de sistema nervioso central**

Cada uno de los tumores muestra un comportamiento distinto de acuerdo a su tipo histológico, sin embargo está comprobado que existen factores en común que influyen directamente en la sobrevida de los pacientes, entre los comprobados:

- Edad: Los tumores que debutan en niños menores de 3 años tienen peor pronóstico debido a que no puede ofrecerse radioterapia, esta terapia protege de 20-30% la recaída durante el tratamiento, de tal manera que los pacientes que prescinden de esta terapia tienen mayor riesgo de recaída.<sup>41</sup>
- Ubicación: Se refiere al sitio primario :infra o supratentorial. Los tumores infratentoriales habitualmente afectan estructuras vitales y no se recomienda su resección por esta misma causa<sup>42</sup>.



- Tratamiento quirúrgico: Esta descrito que la resección quirúrgica total ofrece un mejor pronóstico a los pacientes, comparado con aquellos que se realiza parcialmente o que no se lleva a cabo. Incluso la resección parcial ofrece peor pronóstico, debido a que se estimulan mecanismos de crecimiento acelerado que favorecen recaída temprana<sup>43</sup>.
- Tipo y grado histológico: Los meduloblastomas tienen peor pronóstico que el resto de los tumores embrionarios<sup>44</sup>

### *Ciclo celular*

El ciclo celular, es una secuencia de pasos que tiene como objetivos la formación de células hijas idénticas funcionalmente independientes. Cuenta con dos fases gigantes: la interfase y la mitosis<sup>45, 46</sup>

La interfase se divide a su vez en tres: la fase **G1** (Grow 1) en la que se acumula el ATP necesario e incrementa el material genético y el tamaño y número de los organelos celulares; la **fase S** ( síntesis), caracterizada por la replicación del ADN (ácido desoxirribonucléico), y la Fase G2, que otorga un tiempo de organización y de preparación celular antes de la división.

Previo a que la célula llegue a la fase de división han pasado hasta este momento pasos esenciales que aseguran que el contenido celular está en condiciones adecuadas para que las células hijas sean totalmente autosuficientes.

Existen un proceso complejo de regulación, integrado por puntos de control en fases estratégicas para evaluar la secuencia y definir si la célula está en condiciones o no de continuar a la siguiente fase.

Los efectores principales son:

- *Proteínas que permiten el progreso del ciclo:* son dos grandes familias, las ciclinas, de las cuales se conocen 6 y de la cuál se ha podido determinar la función de cuatro de ellas (1,2,4 y 6); y las ciclinas ( A,B,D y E ); la unión de ambos complejos permite la fosforilación de proteínas. La interrelación de ambas es estrictamente necesaria para que la función sea llevada en tiempo y forma adecuados.



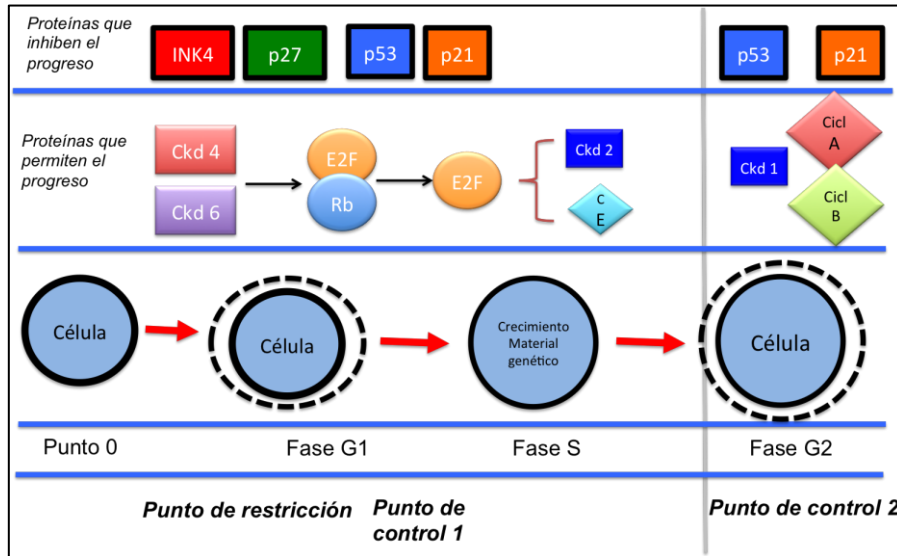
- y las proteínas que inhiben : son la INK 4, la CIPs y algunos factores de proliferación celular.

En conjunto la interacción de ambos tipos de proteína forman un punto de restricción y dos de control que son:

- **Punto de restricción:** al final de la G1, si este punto de restricción no se supera, se compromete todo el ciclo celular. La meta final de este punto es que las cinasas 4 y 6 fosforilen a una proteína llamada Rb( proteína del retinoblastoma) para que libere al factor de transcripción E2F y estimule la producción de la cinasa 2 y la ciclina E, que son necesarias para la fase S; entonces la INK4 (p16) y la CIP (p27) bloquean a las cinasas y ciclinas evitando la fosforilación del Rb y impidiendo irremediablemente que la célula pase a fase S.
- **Primer punto de control:** se encuentra al final del punto de restricción, es decir en G1. Este punto se encarga de revisar si el medio carece estas tres condiciones: tamaño celular adecuado, disponibilidad de alimento y material genético suficiente. Participan la cinasa 2 y la ciclina E (activadas en el punto de restricción), que inactivan a la Rb favoreciendo que la E2F inicie la síntesis de ADN. En este punto existen proteínas inhibidoras: el factor de transcripción p53 y una CIP, la p21 que al encontrar errores en el material genético bloquean a la cinasa 2 y ciclina E, deteniendo la replicación.
- **Segundo punto de control:** se encarga de revisar que el material genético se haya duplicado completamente, no tenga errores y que el medio extracelular sea adecuado. Los responsables son el complejo cinasa 1 y ciclina A y B, que se encargan de inducir el ensamble del huso mitótico y corroborar que los cromosomas se ajusten a éste, así como la condensación del material genético. La p53 y la p21 tienen la autoridad de inhibir el complejo cdk1-ciclina A,B si existen condiciones poco favorables.



La mitosis  
tiene como  
último



objetivo la división sistematizada de la cromatina duplicada para la creación de dos células idénticas, está conformada por las siguientes fases:

- Profase: la cromatina previamente difusa se condensa y conforma los cromosomas, los microtúbulos citoplasmáticos que forman el citoesqueleto integran el uso mitótico.
- Metafase: los microtúbulos alínean a los cromosomas en el ecuador.
- Anafase: los cinetocoros apareados se separan permitiendo que cada cromátida sea llevada al plano polar de la célula hija.
- Telofase: los cromosomas llegan al extremo polar, desaparecen los microtúbulos y los cinetocoros y se forma una nueva envoltura nuclear. Al mismo tiempo, la cromatina condensada se expande y los nucléolos reaparecen.
- Citocinesis: Es la división del citoplasma.

### *Bcl-2 y Apoptosis*

El vocablo proviene del griego apo-TEO-sis que significa desprendimiento de las hojas del árbol en otoño. Se define como la muerte celular programada. Ha sido conocido por varios nombres. Virchow, en 1858, fue el primer investigador en describir los procesos de muerte celular y, basándose sólo en parámetros macroscópicos, los definió como degeneración, mortificación y necrosis.

En 1879, utilizando observaciones microscópicas se introducen los términos *Karyorhesis* y *Karyolysis*, que hacen referencia a la desintegración y desaparición del núcleo. Diez años





más tarde, Arnheim, propone los términos *piknosis* y marginación de la cromatina. Flemming, estudiando los folículos de los ovarios de los mamíferos, observó y describió la desaparición de células, denominando a este proceso *chromatolisis*, término que fue reutilizado por Gräper, en 1914, como antónimo de los procesos de mitosis. Pero no fue hasta 1972 cuando Kerr, Wyllie y Currie implantan el término:apoptosis<sup>47</sup>.

Es una compleja secuencia de señalizaciones que intervienen directamente sobre la compactación del citoplasma celular, la degradación del DNA celular y destrucción de la pared celular, existen dos fases en la cascada de la apoptosis: la que se lleva en el citoplasma y en la mitocondria<sup>48</sup>. Esta cascada puede definirse para su comprensión en distintas fases:

- Activación: A nivel general las señales que intervienen en la apoptosis celular inician desde la periferia (membrana celular) a través de los receptores específicos del Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que se produce en macrófagos y linfocitos T ; la interleucina 1, en linfocitos T; y el FAS. Dentro de la célula inician una secuencia activadora de caspasas que llevan finalmente a la muerte celular. Los receptores de muerte se caracterizan por presentar un dominio extracelular, rico en cisteína y un segundo dominio de localización citoplasmática conocido como el “dominio de la Muerte”que es el responsable de la activación de la maquinaria apoptótica. Una vez activados, los receptores transfieren la información al interior celular mediante un sistema complejo de interacciones proteína-proteína que activan diversas cascadas celulares<sup>49</sup>.
- Señalización: Una vez que se han activado los receptores, inicia una activación secuencializada de segundos mensajeros que activan la cascada intracelular, entre los más decritos: p53, BLC-2 y ceramidas.
- Ejecución: El organelo final para la destrucción celular es la mitocondria. Uno de los acontecimientos principales que tienen lugar en la mitocondria es la alteración de la permeabilidad de sus membranas debido a la formación de un complejo multiproteico (poro de permeabilidad transitoria mitocondrial) que conduce a la liberación del contenido intramitocondrial como el citocromo C mediante el sistema de caspasas, el factor inductor de apoptosis y miembros de la familia de caspasas. Otros episodios son alteraciones en la cadena transportadora de electrones, pérdida del potencial electroquímico de membrana y cambios del ciclo metabólico de óxido/reducción<sup>50</sup>.



## *Bcl-2*

Es una sigla que proviene de *B-Cell lymphoma 2*, se trata de una familia de proteínas conformada aproximadamente por 25 miembros, que fueron identificados por primera vez en 1984 cuando se estudiaba la alteración de los genes 14 y 18 en los linfomas foliculares, dicha mutación ocasiona la traslocación de los locus que codifican la formación de cadenas pesadas de inmunoglobulinas, la disregulación tiene como consecuencia mecanismos de activación repetida de familias antiapoptóticas de Bcl-2, que perpetúa la producción clonal de células hematopoyéticas<sup>51,52</sup>.

Su función está relacionada con la supervivencia celular y no con su proliferación. Y de acuerdo a lo anterior, existen dos funciones básicas: pro-apoptosis y anti-apoptosis.

Aunque en general se conocen a todas estas proteínas como Bcl, hasta el momento se han clasificado 3 familias conformadas por los siguientes miembros:

- **Anti-apoptótica Bcl-2:** Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W MCL, Bcl2A1, Bcl-B
- **Familia Bax, pro-apoptótica:** Bax, Bak, Bok
- **Familia BH3, pro-apoptótica:** Bad, Bid, Bik, Blk, BimL, PUMA, NOX, BMF, HRK

Las subfamilias tienen semejanzas en su estructura, con cuatro regiones denominadas dominios de homología (BH), los dominios BH1, BH2, BH3 y BH4 son responsables de formar una zona de interacción entre las familias antiapoptóticas y proapoptóticas, de esta manera pueden inhibirse.

El estudio de estas subfamilias ha revelado importantes interacciones en el ciclo celular, en la regulación de la apoptosis y en el desarrollo de enfermedades neoplásicas

El Bcl-2, muestra un dominio predominantemente citoplasmático, tiene la capacidad de interactuar directamente en la cascada intrínseca a través del complejo Citocromo C/Apaf-1/procaspasa 9 bloqueando la actividad proteolítica de las caspasas, también puede actuar a través del dominio BH3 en los receptores Fas y bloquear la actividad de la caspasa-8, infiriendo también en la vía extrínseca; las semejanzas en la estructura permite bloquear a los integrantes de la subfamilia proapoptótica del complejo Bax y pueden regular el comportamiento del calcio citosólico del retículo endoplásmico. Específicamente tiene aportación en el primer punto de regulación del ciclo celular al favorecer la fosforilación de Rb y la liberación de E2F e impidiendo que p27 detenga el proceso, por tal motivo prolonga la fase G1 y facilita a la célula pasar a la siguiente fase



del ciclo<sup>53</sup>.

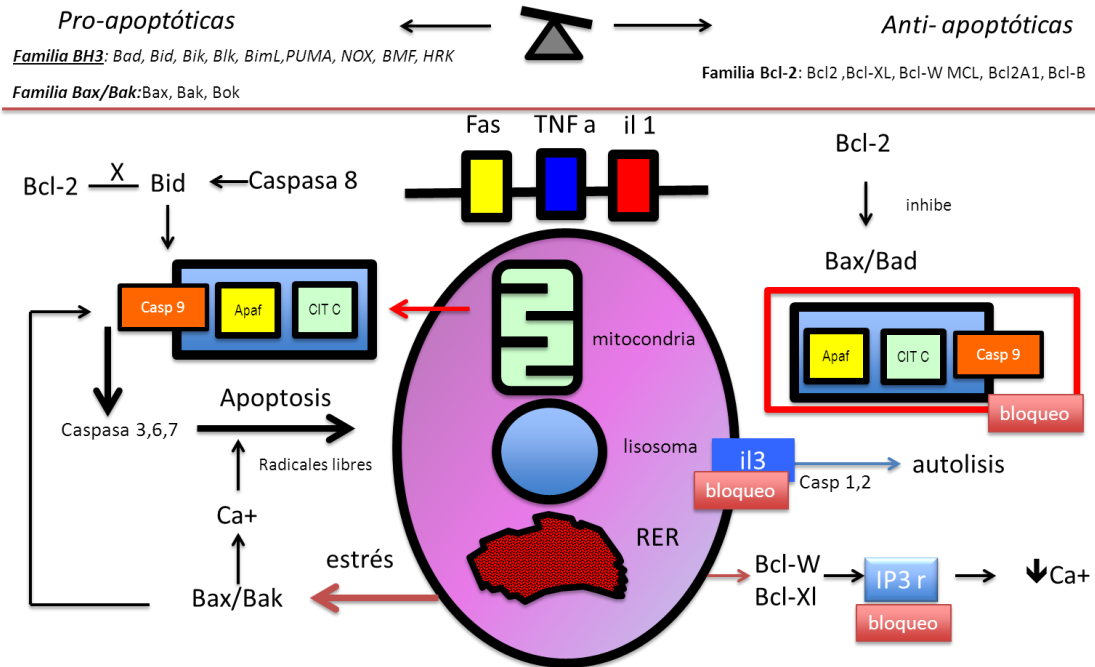
Bcl-xl y Bcl-W protegen a las células de los daños ocasionados por citotóxicos, rayos ultravioleta, rayos gamma y drogas quimioterapéuticas.

La familia Bax son especialmente influyentes en la apoptosis de muchas células, en presencia de señales citotóxicas, la sobreexpresión de Bax y Bak realiza cambios membranales y bloquea la acción de Bcl-2 ( y sus integrantes), las teorías actuales suponen que Bax/Bak se encuentran secuestradas en una proteína nuclear (proteína 14-3-3) y que el daño del DNA es un factor de liberación para que se inicie la cascada apoptótica. Existen mucha teorías que sugieren la manera en la que Bax/Bak permeabilizan la membrana, probablemente la más apoyada sea la existencia de un particular canal en la membrana mitocondrial que liberen al citocromo C y con él, la secuencia de pasos que termina con la activación de la caspasa 3<sup>54</sup>.

La familia de BH3 ( BH3 only proteins), ha sido motivo de múltiples publicaciones acerca de los factores que favorecen su activación, por ejemplo Bim requiere la particular activación de linfocitos autoreactivos, de aquí se desprenden las asociaciones encontradas con enfermedades autoinmunes; Bad requiere de factor activador epidermoide; Bmf la señalización de células epiteliales lesionadas. Noxa y PUMA/Bbc3 son activadas por p53. La cualidad de esta subfamilia es que son dinámicas, ya que son estimuladas por las mismas cinasas que intervienen en el ciclo celular y su actividad apoptótica prescinde del complejo Bax/Bak para matar, es decir, por sí solas no pueden iniciar la activación de caspasas, pero son especialmente sensibles y su amplia red de miembros activan tanto a la familia Bax/Bak como a Bcl-2.

Existen por lo menos cuatro modelos que sugieren la ruta de activación de cada uno de los miembros de las subfamilias de Bcl-2, y aunque existen variaciones todas coinciden con la siguiente ruta: la familia de los BH3 activa a la subfamilia Bax/Bak que a su vez inicia el complejo citocromo c/Apaf-1/ procaspasa 9 y la cascada de las caspasas, Bcl-2 está silente en estos pasos de manera que de ser necesario, interviene en el proceso y bloquea la activación<sup>55</sup>.





### Proteína P-53<sup>56</sup>

Esta proteína expresa su función durante la replicación del DNA celular y mitocondrial, detecta secuencias incoherentes, cuando éstas se manifiestan bloquea el proceso de secuencialización e induce el proceso apoptótico.

Se ha descrito en algunas enfermedades como el cáncer una proteína llamada Mdm-2 que se unen a la porción terminal de la proteína P-53 y bloquean su acción; ocasionando que la duplicación del DNA continúe incoherente y exprese mutaciones.

### Caspasas<sup>57</sup>

Son las proteínas encargadas del proceso final de la apoptosis; se encuentran inactivas dentro de la célula en forma de zimógenos o procaspasas.

Se han descrito 10 de ellas, como familia de proteín-cinasa que constan de un prodominio N-terminal y dos subunidades, una grande p20 y otra pequeña p10.

Existen dos familias de procaspasas, la I ( 1,2,8,9 Y10) y la II (3,6,7); la diferencia entre ambas consiste en que las de clase I, tiene la capacidad de autoactivarse y activar las de clase II.

Las caspasas activas actúan hidrolizando a las diversas proteínas, del citoesqueleto,



nucleares, proteínas que intervienen en la división celular, en el control del ciclo celular, reparación, replicación y transcripción del ADN.

La primera parte de la cascada actúa sobre la membrana celular ocasionando su destrucción y la segunda directamente sobre la mitocondria .

Todas las caspasas inducen la vía extrínseca y mitocondrial; con excepción de la 8 que únicamente actúa sobre la destrucción de la pared celular.

### *Apoptosis y cáncer .*

La apoptosis está íntimamente relacionada con el proceso fisiopatológico de las neoplasias, existe una sobreexpresión de la proteína BCL-2, así como una disminución en de la actividad del p53; favoreciendo la inmortalidad y los errores de replicación de la célula tumoral. Este comportamiento se ha reportado en leucemias, linfomas, renales, sistema nervioso central, pulmón, melanoma y sarcomas<sup>58</sup>.

En tumores del SNC en especial astrocitomas, la expresión del BCL-2 es un factor de mal pronóstico para la sobrevida, un estudio realizado en un hospital de tercer nivel de atención a los cuales se les realizó medición de la proteína, se demostró que aquellos que la expresaron tuvieron una sobrevida del 29% comparado con 64% de aquellos pacientes que no la expresaron<sup>59</sup>.

En tumores de SNC que diseminan a neuroeje, se sobreexpresan y su función es defectuosa predisponiendo a errores en el ciclo de replicación, proliferación y desarrollo de neoplasias de alto grado de malignidad, disminuyendo la sobrevida y favoreciendo el riesgo de desarrollar de glioblastoma multiforme (OR 4.4).



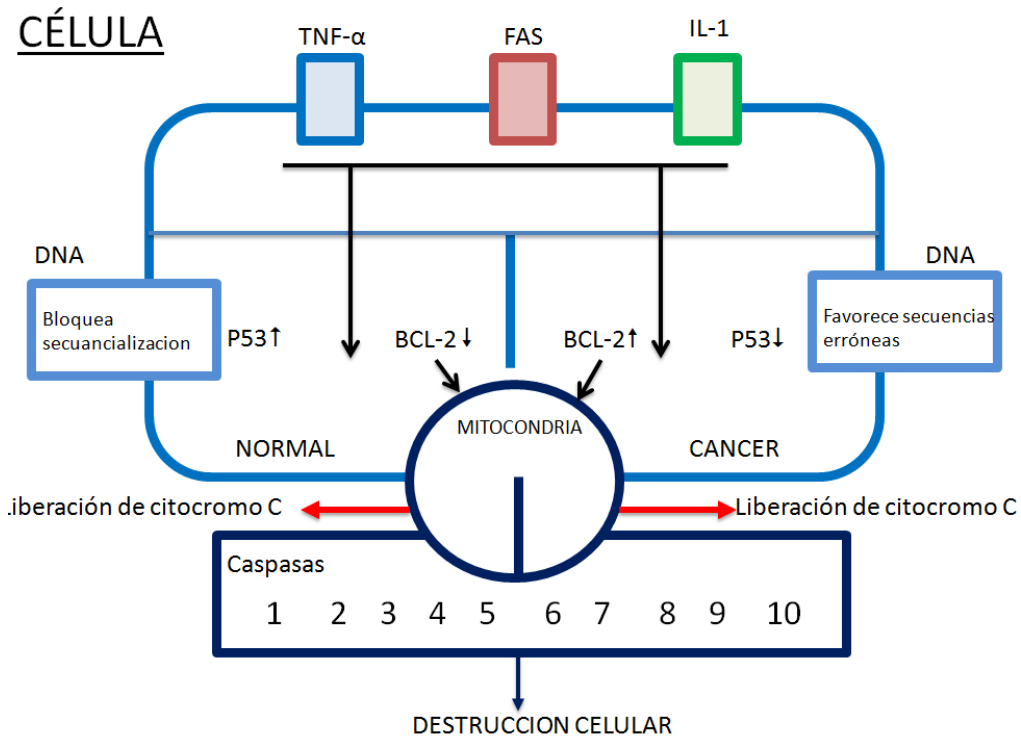


Figura 1

El p53 de igual manera se asocia a menor sobrevida en los pacientes con astrocitomas que lo expresan<sup>60</sup>, mientras que en los meduloblastomas se expresa principalmente en aquellos que son relacionados a síndromes genéticos como Neurofibromatosis. Ebehart y colaboradores, publicaron en 2005 una cohorte de 64 pacientes con meduloblastoma , de los cuales 18 expresaron p53 asociados estadísticamente con peor pronóstico<sup>61</sup>.

### Recaída

La sobrevida de los pacientes que presentan recaída durante algún momento de su evolución puede disminuir hasta 30%. La frecuencia de las mismas puede variar entre un 10 al 30% , dependiendo del tumor y sus factores de riesgo asociados<sup>62</sup>. El seguimiento se otorga por rutina mediante resonancia magnética (RM) y la evolución clínica. Actualmente existe una clasificación denominada RECIST ( por sus cifras en inglés: Response Evaluation, Criteria in Solid Tumors)<sup>63</sup> quienes definen un incremento de más



del 30% del tumor en su diámetro mayor o la aparición de una nueva lesión.

El factor más asociado a la recaída del tumor es la resección incompleta de la lesión y el abandono del tratamiento neoadyuvante<sup>64</sup>.

### *Citometría de flujo*

Método analítico por el que se mide la emisión de múltiples fluorescencias y la dispersión de luz ("light scatter") de células o partículas microscópicas, alineadas secuencialmente mediante una corriente líquida laminar, cuando son presentadas de una en una y a gran velocidad (hasta miles de células/segundo) frente a un haz de luz láser de longitud de onda adecuada; su utilidad puede aplicarse para identificar secuencias de DNA, proteínas extracelulares, complejos inmunes circulantes, viriones individuales, liposomas, cromosomas aislados, así como bacterias, hongos y viriones<sup>65</sup>.

La medición de estos fragmentos se realiza mediante fluorescencia, pasando las partículas a través de un haz de luz que mide el tamaño de éstas por el espectro de luz que emiten. Para favorecer esto se aplican *anticuerpos monoclonales específicos, dirigidos contra proteínas de membrana o intracitoplasmáticas, que llevan apareado un fluorocromo para su detección y visualización* mediante un sistema informático apropiado. Posee una sensibilidad superior a  $1 \times 10^{-4}$ , es decir, es capaz de detectar una célula tumoral entre 10,000 células normales. Mediante esta técnica pueden identificarse proteínas como BCL-2, p-53 y otros oncogenes y sugerir mediante esta celularidad la actividad tumoral de las neoplasias<sup>66</sup>.

Las cualidades de la citometría de flujo sobre la inmunohistoquímica es que ofrece información dinámica del comportamiento celular de manera objetiva, es decir la inmunohistoquímica arroja información sobre el campo analizado y el grado en el que las células expresaron la proteína, mientras que la citometría de flujo demuestra el número de células y la intensidad en la que se expresan.

Mediante esta técnica puede definirse la presencia de Enfermedad Residual Mínima (ERM) como la identificación de células tumorales posterior al tratamiento quimioterapéutico.

En el Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI (HP CMN SXXI), se realizó un estudio en 15 pacientes con tumores de SNC, en el cuál se definió EMR como la identificación de células tumorales en citometría de flujo posterior a quimioterapia, se



demonstró que en la determinación inicial, 11 pacientes (73%) no presentaron células neoplásicas, mientras que en la segunda determinación (post 2º curso de quimioterapia) sólo cinco pacientes (33%) fueron negativos. En la tercera determinación (post 4º curso de quimioterapia) cuatro pacientes (26%) fueron negativos. Hasta el momento sólo cinco pacientes cuentan con celularidad normal por citometría. Estos resultados refutan la idea de que entre cada ciclo de quimioterapia existe una disminución de los oncogenes proapoptóticos, sin embargo su incremento pueda favorecer en la respuesta al tratamiento, la probabilidad de recaída o la intensidad de la enfermedad. En este caso, la elaboración de estudios de seguimiento ayudarían a determinar si la expresión de oncogenes como el BCL-2 durante los ciclos de quimioterapia son factores de recaída de los tumores de SNC.





## Planteamiento del problema

En las últimas décadas, los avances en quimioterapia y radioterapia han mejorado de forma considerable las posibilidades de supervivencia de los niños afectados de patología oncológica. Sin embargo, el riesgo de recurrencia continúa siendo un obstáculo importante para su remisión.

Los tumores de sistema nervioso central en la edad pediátrica tienen un comportamiento particular a diferencia del adulto, aunque histológicamente sean de bajo grado, se comportan agresivamente y muestran mayor resistencia a la quimioterapia; la tendencia de los razonamientos actuales explican que este fenómeno se deba a que el tumor expresa marcadores como el BCL-2 que intervienen directamente sobre el ciclo celular.

Estos marcadores pueden ofrecer al clínico información pronóstica sobre el tumor y su comportamiento molecular, pudiendo predecir su respuesta a pesar de los factores pronósticos y de esta forma justificar cambios dinámicos al manejo.

## Pregunta de investigación.

¿Cuál es la asociación de la expresión de Bcl-2 en LCR medido por citometría de flujo como predictor de recaída en tumores de SNC que se diseminan a neuroeje en pacientes pediátricos?



## Justificación

Debido a los avances en el tratamiento de niños con cáncer, actualmente se ha incrementado la sobrevivencia a 5 años. El tratamiento es similar en la mayor parte de los tumores de sistema nervioso central, no obstante, el seguimiento de estos pacientes se limita a los estudios de imagen y en la mayoría de los casos las recaídas se diagnostican hasta que se encuentran en una etapa avanzada de la enfermedad.

La citometría de flujo tiene la capacidad de detectar la expresión de oncogenes que intervienen directamente en la apoptosis. Mediante la obtención de muestra de líquido cefalorraquídeo pueden obtenerse células afectadas y de esta manera predecir el comportamiento del tumor.

La citometría de flujo a diferencia de la inmunohistoquímica ofrece parámetros celulares objetivos y cuantitativos sobre la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis.

Un estudio realizado en el HP CMN SXXI comprobó mediante citometría un aumento en el porcentaje oncogen BCL-2 en los tumores de SNC entre cada ciclo de quimioterapia, independientemente del comportamiento del tumor en los estudios de imagen<sup>67</sup>.

Resulta necesario realizar seguimiento a estos resultados para evaluar la utilidad la presencia de BCL-2 al final de los ciclos de quimioterapia para predecir recaídas en tumores de SNC.

## Hipótesis

Existirá una probabilidad del 30% de presentar recaída durante el primer año de tratamiento en aquellos pacientes pediátricos con tumores embrionarios de sistema nervioso central que expresen Bcl-2 en LCR determinado por citometría de flujo, atendidos en un hospital de tercer nivel de atención.

## Objetivos

### Objetivo general:

Determinar la asociación de la expresión de Bcl-2 como predictor de recaída en pacientes pediátricos con tumores de sistema nervioso central que se diseminan a neuroeje en pacientes pediátricos.



## Métodos

### *Universo y muestra*

Se examinará población con diagnóstico de tumores de SNC que de acuerdo a la clasificación de la OMS se diseminan por líquido cefalorraquídeo, que sean diagnosticados en la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (UMAE HP CMN SXXI) en un lapso de 1 año a partir de la aceptación del protocolo.

### *Tipo de estudio*

Diseño: Cohorte dinámica

Por seguimiento: longitudinal.

Por recolección de los datos: ambielectivo.

Por el tipo de análisis: analítico.

Por el tipo de maniobra: observacional.

### *Criterios de inclusión, exclusión y eliminación*

#### **Criterios de inclusión**

- Pacientes de cualquier sexo, entre 1 y 17 años de edad.
- Pacientes con diagnóstico histopatológico de acuerdo a la clasificación de la OMS de cualquiera de los tumores de SNC que se diseminen a neuroeje ( meduloblastomas, ependimomas, pinealoblastomas, embrionarios).
- Que lleven tratamiento quimioterapéutico durante el primer año con el esquema utilizado en el servicio de Oncología del UMAE HP CMN SXXI.
- Que la biopsia, resección total o parcial del tumor se haya realizado en el hospital donde se llevará a cabo el estudio.
- Determinación de líquido cefalorraquídeo al momento del diagnóstico antes de la primera quimioterapia.
- Pacientes que completen tratamiento y seguimiento en el UMAE HP CMN SXXI.

#### **Criterios de exclusión**

- No deseo de participar en el estudio
- Tumores con celularidad negativa en muestra de LCR.



### ***Criterios de eliminación***

- Pacientes con expediente incompleto.
- Muestra de líquido cefalorraquídeo insuficiente para realización de Bcl-2.

### **Métodos**

Se captarán a los pacientes de reciente ingreso con la sospecha de tumor embrionario de SNC con diseminación a neuroeje y se incluirán una vez que se haya corroborado el diagnóstico por clínica, imagen y reporte histopatológico.

El paciente posterior a ser sometido al procedimiento quirúrgico de extirpación total, parcial o biopsia y de confirmación histológica se tomará una muestra de LCR posterior a un periodo de lavado de 2 semanas posquirúrgica y se determinará la celularidad (positiva o negativa), incluyéndose a los primeros y determinando mediante citómetro la presencia de Bcl-2

Se realizará seguimiento del tamaño del tumor mediante estudio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) durante el periodo de la administración de 12 ciclos de quimioterapia y 12 meses después de ésta; con un espacio comprendido entre 3 y 4 meses una vez realizado el diagnóstico.

Se registrarán las recaídas durante el periodo del tratamiento y seis meses posterior a él.

El inicio de entrada a la cohorte: diagnóstico de meduloblastoma, pinealoblastoma o tumor germinal.

Término de la cohorte: al momento de la defunción, primer año posterior al tratamiento quimioterapéutico o recaída.

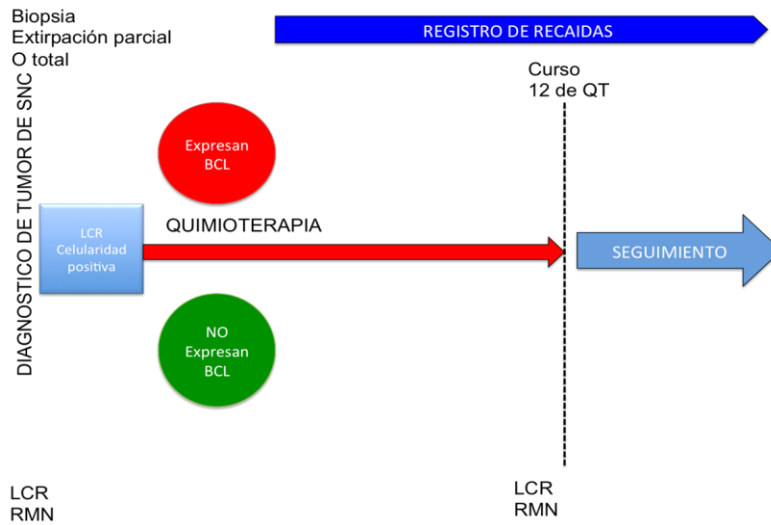
Todos los gastos fueron cubiertos por el presupuesto y equipo del Laboratorio de Tumores Cerebrales del UMAE HP CMN SXXI.

**Población expuesta:** pacientes con tumor embrionario de SNC, celularidad positiva que exprese BCL-2 en líquido cefalorraquídeo por citometría de flujo.

**Población no expuesta:** pacientes con tumor embrionario de SNC, celularidad positiva que no exprese BCL-2 en líquido cefalorraquídeo por citometría de flujo.

**Evento incidente:** Recaída (definida como presencia de nuevas tumoraciones posteriores a la resección quirúrgica o incremento de la lesión previa por RMN de más del 30%)



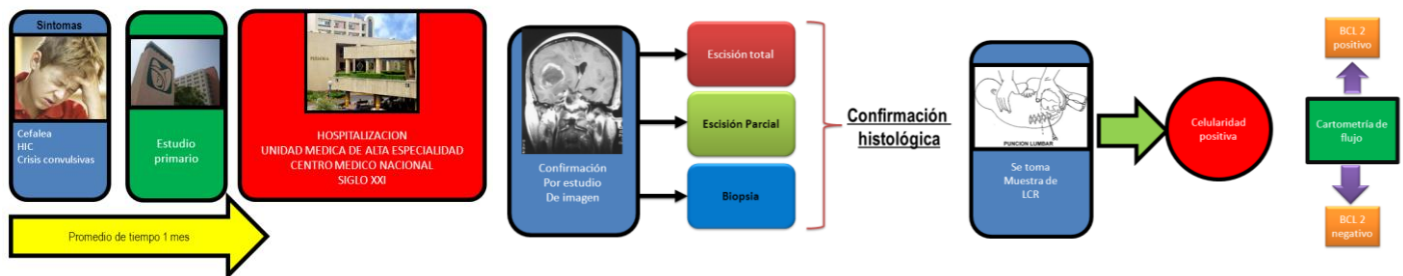


*Logística del estudio:*

El paciente inicia los síntomas en promedio un mes antes de su ingreso al hospital de referencia, durante ese periodo las manifestaciones ( crisis convulsivas, hipertensión endocraneana y cefalea). Una vez ingresado se solicita Resonancia Magnética Nuclear (RMN) confirmando tumoración, posteriormente se realiza tiempo quirúrgico donde se realiza cirugía la cual puede ser: total, parcial o exclusivamente biopsia.

Una vez confirmado el diagnóstico se toma primera muestra muestra punción lumbar antes de iniciar tratamiento quimioterápico, cuando la celularidad es positiva se realiza citometría de flujo y se cuantifica la expresión de BCL 2 por este método.

Logística.



## Tabla de variables:

| VARIABLE                          | DEFINICIÓN CONCEPTUAL  | DEFINICIÓN OPERACIONAL  | TIPO DE VARIABLE             | MEDICION.  |
|-----------------------------------|--|---|------------------------------|--|
| <b>DEMOGRAFICAS</b>               |  |   |                              |  |
| <b>Sexo</b>                       | Características fenotípicas que califican al sujeto en femenino o masculino  | Sexo<br><br>Fenotípico  | Cualitativa<br><br>nominal   | 1: hombre<br><br>2: mujer  |
| <b>Edad</b>                       | Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la muerte del mismo  | Edad cumplida en meses desde el nacimiento hasta el día de la última consulta.                          | Cuantitativa<br><br>discreta | Número de meses  |
| <b>Localización del tumor</b>     | Localización intracraneal del tumor.   | Sitio en el que se encuentra el tumor en el cráneo por reporte del cirujano o RMN                       | Cualitativa<br><br>nominal   | 1: infratentorial<br><br>2: supratentorial   |
| <b>Tipo de tumor</b>              | Reportado por el servicio de patología, en relación al porcentaje de anaplasia encontrado en el espécimen de la tumoración por estudio histopatológico.      | Clasificación histopatológica de los tumores de sistema nervioso central de acuerdo al manual de la OMS | Cualitativa<br><br>nominal   | 1: meduloblastoma<br><br>2: germinal<br><br>3: pinealoblastoma<br><br>4.ependimoma |
| <b>Tiempo de sobrevida global</b> | Número de meses que viven los pacientes luego del diagnóstico de astrocitoma realizado por el servicio de patología de HPCMNXI y registrado en el expediente |   | Cuantitativa<br><br>discreta | <b>Meses</b>   |



|   |   |  |                      |   |
|---|---|--|----------------------|---|
| <b>Clasificación del comportamiento</b> | <p>Posterior al tratamiento quirúrgico y durante el seguimiento</p> <p>Estable: no hay cambios en el 25% del tumor</p> <p>Respuesta parcial: disminución entre un 25 a 50% del diámetro perpendicular</p> <p>Progresión: Incremento de más del 25% del volumen tumoral.</p> | <p>Se realizó en dos tiempos:</p> <p>Al finalizar los 12 ciclos de quimioterapia y al completar los 24 meses de seguimiento desde el diagnóstico del tumor</p> | Cualitativa nominal. | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Respuesta completa</li> <li>2. Estable</li> <li>3. Respuesta parcial</li> <li>4. Progresión.</li> </ol> |
|---|---|--|----------------------|---|

#### VARIABLES CONFUSORAS.

|                                       |   |   |                     |                                      |
|---------------------------------------|---|---|---------------------|--------------------------------------|
| <b>Radioterapia</b>                   | La <b>radioterapia</b> es una forma de tratamiento basado en el empleo de radiaciones ionizantes (rayos X o radiactividad, la que incluye los rayos gamma y las partículas alfa).                 | Tratamiento coadyuvante en pacientes mayores de 3 años.   | Cualitativa nominal | SI<br>No                             |
| <b>Resección quirúrgica</b>           | Procedimiento empleado por cirujano para extraer un tejido patológico ya sea total o parcial.   | Extirpación de tejido tumoral, reportado en hoja quirúrgica   | Cualitativa nominal | 1: biopsia<br>2: parcial<br>3: total |
| <b>Evento de fiebre y neutropenia</b> | Proceso caracterizado por presentarse durante el nadir de la quimioterapia los siguientes datos: fiebre >38°C, con o sin respuesta inflamatoria sistémica, neutropenia <1500 neutrofilos/ $\mu$ l | Cualquier evento de fiebre >38.3°C, con datos de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica posterior al día 7 de quimioterapia, con neutrófilos de 1500 cel/ $\mu$ l documentado en el expediente. | Cualitativa nominal | 1. Presente<br>2. ausente            |



|   |  |   |                            |   |
|---|--|---|----------------------------|---|
| <b>Diferimiento de quimioterapia &gt; 1 mes</b> | Suspensión de alguno de los ciclos de quimioterapia durante la fase de tratamiento de neoadyuvancia.                   | Cualquier diferimiento mayor a un mes de la quimioterapia por las siguientes causas:<br><br>-enfermedad infecciosa<br><br>-ausentismo | Cualitativa<br><br>nominal | 1. Presente<br><br>2. ausente   |
| <b>Variables independientes</b>                 |  |   |                            |   |
| <b>BLC-2 en porcentaje</b>                      | Familia de proteínas expresadas en células tumorales que limita la apoptosis impidiendo la destrucción del citocromo C | Presencia en porcentaje en muestra de líquido cefalorraquídeo mediante citometría de flujo.   | Cualitativa<br><br>nominal | 0: por debajo del porcentaje determinado como riesgo<br><br>1: por arriba del porcentaje determinado como riesgo. |
| <b>Dependiente</b>                              |  |   |                            |   |
| <b>Recaída</b>                                  | Presencia de células tumorales en sistema nervioso central cuando existió previamente respuesta al tratamiento         | Incremento en el tamaño del tumor de más del 30% o presencia de nuevas lesiones en Resonancia Magnética nuclear                       | Cualitativa<br><br>nominal | 0: negativo<br><br>1: positivo  |





## Tamaño de muestra

Se realizó un análisis preliminar en 29 pacientes. En total, 16 pacientes fallecieron de los cuales, 5 expresaron BCL2 (59)

$$n = \frac{z_{\alpha}^2 \times p \times q}{d^2}$$

$$Z_{\alpha}^2 = 3.84$$

$$p = 0.7$$

$$q = 0.3$$

$$d^2 = 0.09$$

Por lo tanto el tamaño de muestra esperado es de : **9 pacientes en cada grupo +30% de pérdidas**

Total de pacientes: 23. Se agregaran 10 pacientes por cada variable confusora ( quimioterapia, radioterapia, resección) en total **53 pacientes**.



## Plan de análisis estadístico

La información recolectada en los cuestionarios, se codificará en forma numérica y capturada en una base de datos en el paquete estadístico SPSS versión 17.

|                    |   |
|--------------------|---|
| <b>Descriptivo</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Estimación de medidas de tendencia central y dispersión para variables continuas y la estimación de proporciones para variables categóricas</li><li>• Tasa de supervivencia por método actuarial= número de individuos que sobreviven en el tiempo t/total de número de individuos.</li></ul>   |
| <b>Inferencial</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Prueba de <math>X^2</math> para asociación de variables dicotómicas</li><li>• Prueba de T o de U de Mann Whitney de acuerdo a la distribución de las variables continuas.</li><li>• Análisis de ANOVA o Kruskal Wallis dependiendo de la distribución para determinar diferencias de medias entre el nivel de BCL-2 y las diferentes estirpes tumorales.</li><li>• Análisis de sobrevida por Kaplan Meier .</li><li>• Cálculo de riesgo por medio de Harzard en modelo de proporciones de COX</li></ul> |

## Consideraciones éticas

**Riesgo de la investigación:** Según la Ley general de Salud en materia de la investigación para la salud el presente estudio se considera de riesgo mínimo por tratarse de una punción para obtención de LCR que se realiza por rutina en estos pacientes (Artículo 17).

**Confidencialidad:** Se otorgará la seguridad a los familiares de los participantes de que no se revelará la identidad de los mismos según el Artículo 21 Fracción VIII de la Ley General de Salud.

**Condiciones en las que se solicitará consentimiento informado:** La carta de consentimiento informado se solicitará previo a la inclusión del participante al estudio, . Será solicitado por el investigador principal y colaboradores. El participante tiene la libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento de la investigación (Artículo



21, Fracciones I-VII de la Ley General de Salud).

También se realizará carta de consentimiento para el procedimiento de punción lumbar.

**Factibilidad:** Se trata de un estudio que aborda un tema prioritario en un Hospital de referencia del país. El marcador se realiza por rutina por el Laboratorio de Tumores de Sistema Nervioso Central del UMAE HP CMN SXXI.

Al mes ingresan 12 casos nuevos, de los cuales al menos 5 son tumores que se diseminan al neuroeje, por lo que en un año pueden obtenerse 60 casos, por lo que se obtiene el tamaño de muestra.



## Resultados

En el periodo de seguimiento, se integró la cohorte con un total 57 pacientes, de los cuales 35 (61%) correspondieron al sexo masculino, con una media de edad al inicio del diagnóstico de  $9.3 \pm 3$  años. El tumor más frecuente correspondió al Meduloblastoma en 24 casos (42%) y la mediana del tiempo de evolución, hasta la fecha actual es de 24(16-25) meses.

La localización del tumor fue 34(60%) infratentorial, y el 65% se clasificaron de alto riesgo. La mediana del tamaño del tumor fue de 5(4-13)  $\text{cm}^3$  y de resección durante el procedimiento quirúrgico fue de 80% (60-90%) .

Se registraron 16 recaídas que corresponden a una proporción acumulada de sobrevida a recaída de 24 meses de 71%. Y se reportaron 6 (10%) muertes relacionadas durante todo el tiempo de seguimiento. El resto de las características de muestra en la **tabla 1**.

El Bcl-2 se expresó en el LCR en 31(53%) pacientes y se encontró un área bajo la curva de 0.85,  $p=0.001$  ( gráfica 1), encontrando que la expresión al 25% representa el mejor punto de corte para recaída.

Se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de Bcl-2 expresados en porcentaje en el LCR de los pacientes contra el tamaño del tumor reportado en  $\text{cm}^3$  por el cirujano, con un valor de  $r^2$  de 0.88,  $p < 0.0001$  ( gráfico 2).

Al realizar una comparación entre los pacientes que expresaron Bcl-2 el LCR mayor al 25% contra quienes lo expresaron en menor porcentaje se encontraron diferencias estadísticamente significativas en: el tiempo de evolución con una mediana 15(14-25) meses del primer grupo vs 24(22-25) meses del segundo,  $p=0.01$ .

La mediana de resección del tumor en los pacientes que expresaron Bcl-2  $>25\%$  fue de 65% (50-75) comparado con 85%(70-90) de los que expresaron Bcl-2 menor al 25%,  $p=0.02$ .

Y la recaída se presentó en el 63% de los pacientes con Bcl-2  $>25\%$  contra 15% de los que lo expresaron menor al 25%,  $p=0.0001$ . El resto de las diferencias se muestran en la tabla 2.

Al realizar un análisis comparativo entre los distintos tipos de tumores (ver tabla 3) se encontraron diferencias intergrupo con el sexo ( $p=0.002$ ), los eventos de fiebre y neutropenia (  $p=0.02$ ), y la localización infratentorial ( $p=0.001$ )



Se calculó el RR de cada uno de los factores propuestos entre el grupo que presentó recaída contra el que no la desarrolló (ver tabla 4), reportándose las siguientes variables estadísticamente significativas: la expresión de Bcl-2>25% con RR de 9.7 (2.5-25),  **$p=0.002$**  y el alto grado de malignidad con RR de 3(1.1-7.2),  $p=0.01$

En el modelo de proporciones de COX se introdujeron las mismas variables y el resultado demostró independencia en las siguientes variables: Bcl-2>25% con HR de **6.7(1.7-24)**  **$p=0.001$**  y el evento de fiebre y neutropenia con HR =**3.7(1-12)**  **$p=0.03$**

Se realizó una curva de Kaplan Meier ( curva de sobrevida 1) donde se observa la probabilidad que tiene la cohorte de estar libre de recaída, observando una mediana de 77% a los 20 meses.

Y una segunda curva donde se demuestra que la probabilidad de estar libre de recaída al expresar Bcl-2 >25% es del 35% contra 85% de aquellos quienes no lo expresaron,  $p<0.0001$ .



## Discusión

Los tumores de SNC como ya se expuso previamente corresponden a la segunda neoplasia más frecuente en la edad pediátrica después de las leucemias.

En Estados Unidos de Norteamérica a través del NCI (National Cancer Institutes) y el SEER program (Surveillance, Epidemiology and End Results) reportan que estos cánceres representan el 16% de todos los tumores en la edad pediátrica<sup>68</sup>. El 52% correspondieron a los atrociomas, 21% a tumores neuroectodérmicos primitivos, gliomas 15% y ependimomas del 9%

El registro nacional de cáncer en México (RNCM)<sup>4</sup>, esfuerzo realizado por el IMSS por reflejar el comportamiento de las neoplasias en la edad pediátrica, demostró que estos tumores corresponden al total de 12% de todos los cánceres<sup>69</sup>. Del total, 90% se debe a los subtipos de Astrociomas, embrionarios (meduloblastomas) y ependimomas.

El Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, es un centro de referencia para el diagnóstico y tratamiento de estas neoplasias. La cohorte que motivó el desarrollo de este estudio excluyó los astrociomas e incluyó únicamente a tumores con diseminación al neuroeje. Encontramos que en orden de frecuencia, los meduloblastomas representaron el 42%, seguido por ependimomas 35%, pinealoblastomas 11% y germinales 12%. Esta se parece más a los reportes en el documento de clasificación de tumores de SNC de 2007 de la OMS<sup>6</sup>.

En relación a la edad de presentación, encontramos una mediana de 10 años (1.1-16.5), lo que concuerda con los reportes de NCI y el RNCM<sup>4,52</sup>.

Allen propuso una escala de severidad en dos variedades pronosticas<sup>70</sup>: riesgo promedio y alto. Nosotros encontramos que momento del diagnóstico el 65% se clasificaron como de alto grado, debido a que muchos de ellos son de fosa posterior, en niños menores de tres años y sobre todo con enfermedad metastásica al neuroeje. Este porcentaje no refleja en momento alguno los datos esperados en población abierta pero es esperado en nuestra cohorte debido a que el criterio de inclusión fue precisamente la presencia de células metastásicas en LCR.

Al analizar por cada uno de los tumores el sexo y la edad de presentación, observamos que se conserva una relación a la reportada por la OMS: para los meduloblastomas predominio del sexo masculino en una edad menor de 10 años; en ependimomas, mujeres de menos de 10 años al igual que los pinealoblastomas; y una presentación total del sexo masculino en los tumores germinales tal cual se reporta en la base ya mencionada<sup>6</sup>.



El tratamiento quirúrgico es la piedra angular en estas neoplasias<sup>71</sup>, se considera exitosa a la extirpación de más del 80%, nuestros pacientes recibieron este beneficio en apenas el 40% de los casos probablemente asociado a que estos tumores son infratentoriales y la resección quirúrgica total ofrece mayor riesgo que beneficio al comprometer estructuras vitales.

La neoadyuvancia compuesta por la quimioterapia y la radioterapia<sup>72</sup> está claramente identificadas como tratamientos que incrementan la sobrevida global de los pacientes, en el caso de la quimioterapia encontramos que el número de ciclos se correlaciona con el tiempo de evolución lo que refleja un adecuado apego a la terapéutica; sin embargo la radioterapia se aplicó en la mayoría de los sujetos y fueron únicamente 10 casos donde el tratamiento quimioterapéutico se difirió más de un mes por alguna causa.

La recaída de nuestra cohorte fue del 28%, con una proporción acumulada de sobrevida a la recaída del 71%. Si bien no hay un dato crudo del porcentaje de recaídas, su presentación va desde el 10 hasta el 30% dependiendo de las series analizadas, y la mayoría se presentan entre el primer y segundo año, incluso a cinco años después de terminar el tratamiento<sup>73</sup>. Estamos conscientes que el tiempo de seguimiento hasta ahora es el mínimo reportado para recaídas y probablemente la incidencia será mayor en los siguientes 5 años de seguimiento.

Tomando en cuenta que los 57 casos presentaron infiltración a SNC, la determinación del Bcl-2 mediante la citometría de flujo fue en el 53% de los casos. Sin embargo para no sobreestimar la presentación del mismo se decidió determinar un punto de corte ( resultando 25%) para determinar su positividad en este tipo pacientes.

Como previamente se ha mencionado, el Bcl-2 se ha encontrado en distintos tipos de neoplasias con un rol francamente determinado como en linfomas<sup>74</sup>, cáncer de mama<sup>75</sup>, próstata<sup>76</sup> y estómago donde se ha confirmado su asociación con menor sobrevida.

En el caso de los tumores de SNC, Lopez-Aguilar JE<sup>45</sup> encontró asociación en tumores de astrocitomas la cual presentó tendencia a la significancia estadística por falta de tamaño de muestra, en meduloblastomas, el manual de la OMS para clasificación de tumores de SNC publica la presencia de Bcl-2 en meduloblastomas la cual puede asociarse a resistencia al tratamiento<sup>6</sup>. Sin embargo, la mayoría de los artículos relacionados con el tema concretan su papel y sugieren la realización de estudios grandes con múltiples marcadores para aseverar las interacciones<sup>77</sup>.

En nuestra cohorte la comparación entre los grupos con y sin expresión Bcl-2 demuestra que no hay diferencias en la presentación del sexo, la edad de presentación, el tiempo de



evolución de la enfermedad, el tipo de tumor, tratamiento quirúrgico, quimio y radioterapéutico, datos que nos demuestran que la población que conforma la cohorte es homogénea y que sus características no inclinaron los resultados hacia un extremo de los grupos analizados; en el caso de la recaída, es evidente que la población expuesta presentó en mayor frecuencia la recaída en comparación con los sujetos sin el factor de riesgo, lo cual es estadísticamente significativo.

Las diferencias de presentaciones entre los tumores y el sexo de los pacientes son predecibles y acordes a la literatura, como ya se expuso previamente<sup>6</sup>.

El tratamiento quirúrgico total fue más frecuentemente realizado en los meduloblastomas ( $p=0.03$ ), seguido por los tumores germinales que mostraron una tendencia similar sin ser significativa ( $p=0.06$ ) esto se deba probablemente a que la presentación de estos tumores es en cerebelo y que no comprometen de primera instancia zonas del tallo donde la resección es peligrosa<sup>78</sup>.

En relación a los factores de riesgo ya establecidos para mortalidad, se demostró en el modelo bivariado que al comparar a los sujetos que presentaron recaída con aquellos que no la manifestaron no existe significancia en variables como: localización, diferimiento de tratamiento, resección parcial o eventos de fiebre y neutropenia. Y El riesgo relativo fue significativo en la expresión de Bcl-2 de líquido cefalorraquídeo así como el alto grado de malignidad reportado por patología.

El análisis de proporciones de Cox demostró un HR ajustado significativo nuevamente en la expresión de Bcl-2 y demuestra independencia los eventos de fiebre y neutropenia; esto resulta novedoso ya que no encontramos en la literatura algún estudio con resultados semejantes a este.

La curva es francamente explicativa cuando se demuestra la diferencia que existe en los tumores que expresan Bcl-2 comparados con aquellos que no lo hacen y en donde la probabilidad de estar libre de recaída en los sujetos expuestos es apenas del 31% a 24 meses.

Es imposible explicar toda la gama del comportamiento de los tumores de SNC a través de un solo predictor, estamos de acuerdo que nuestros resultados demuestran una franca asociación entre la expresión de Bcl-2 y las recaídas tempranas, sin embargo el riesgo ajustado es marcado probablemente porque las variables comparadas fueron ya demostradas en **mortalidad**, no en recaídas y que es necesario comparar otros marcadores como el AKT o Ki67 que ya han sido previamente descritos como asociados a mortalidad en estos tipos de tumores.





Consideramos que el Bcl-2 es una propiedad incluida en la célula tumoral, pero que hay factores que pueden modificar su expresión (no es tema de esta tesis), por ejemplo, se ha descrito que las células cancerosas in vitro pueden verse estimuladas por la radiación terapéutica para sobreexpresar la proteína Bcl-2<sup>79</sup>.

Y se han publicado que algunos fármacos quimioterapéuticos como la ifosfamida, el etoposido o el vp16 tienen en modelos animales propiedades inespecíficas para atenuar la expresión de esta proteína<sup>80</sup>; aunque también se ha descrito que los tumores mayores de 2mm en ratas pueden desarrollar resistencia dado que al parecer existe un medicamento aún no aclarado entre los niveles incrementados de Bcl-2 y la expresión de GST-mu que condiciona resistencia a drogas como la vincristina. En nuestro caso, el Hospital de Pediatría mantiene un esquema quimioterapéutico estandarizado con triple droga (ifosfamida, etopósido y VP16) y este estudio no puede demostrar dichas asociaciones.

Si bien el tratamiento quirúrgico es hasta ahora la mejor herramienta terapéutica, también se ha nombrado un comportamiento reactivo del tumor una vez que es manipulado quirúrgicamente, mediado por factores estimulantes de angiogénesis que ocasionan desmedida replicación celular y que aprontan el inicio del tratamiento neoadyuvante<sup>81</sup>. En nuestra cohorte no encontramos un riesgo estadísticamente significativo en relación a la intervención quirúrgica, pero es evidente que menos de la mitad de los pacientes contaron con una resección exitosa y el resto fue manipulado de alguna manera para el diagnóstico.

Así también, existe evidencia de que el bloqueo de la apoptosis no es exclusivamente responsable de Bcl-2. El p53 tiene un papel importante en la interfase para inducir el bloqueo en la fase S, sin embargo el comportamiento en las neoplasias parece atenuar su respuesta y favorecer el paso del ciclo celular con errores cromosómicos graves; también el AKT ha sido evidenciado como fosforilador de proteínas que favorecen la resistencia de la apoptosis<sup>82</sup>.

El Bcl-2 por otra parte, parece que en las neoplasias como el linfoma tiene una incrementada actividad contra los otros complejos propaoptóticos, especialmente en las familias BH3 que quedan bloqueadas con facilidad y limitan la producción del apoptosoma<sup>83</sup>.

Esperamos que la unión de los tratamientos: quirúrgico adecuado, quimioterapia completa y radioterapia presentara evidencia en la protección de recaída, no fue así, pero como ya se ha mencionado es necesario un seguimiento más prolongado.



Hasta este momento, consideramos que nuestro estudio presenta las siguientes limitaciones:

- Sesgo de seguimiento: si bien durante el primer año se presentan la mayor parte de las recaídas, la mayoría reportan un periodo de 2 a 5 años donde puede presentarse.
- No descartamos un sesgo de mala clasificación en el diagnóstico de la estirpe histológica, ya que aunque el personal de patología cuenta con la experiencia, no se realizó concordancia intra ni interobservador para evidenciar un valor de kappa.
- Sesgo de información: el reporte de la resección quirúrgica se hace por el neurocirujano, en algunos casos se menciona exclusivamente como resección completa y no se estipula el porcentaje total, por lo que la variable de resección quirúrgica puede limitarse a los datos referidos por el cirujano.

Ya que se trata de una cohorte dinámica pueden enriquecerse los datos con la medición de nuevos predictores que puedan explicar el efecto de Bcl-2 y el desenlace de la variable dependiente.

Consideramos que nuestros resultados hasta ahora mostrados son valiosos y justifican continuar con la observación y la comparación de otros marcadores.

## Conclusiones

- El tumor más frecuentemente encontrado que presenta celularidad positiva es el meduloblastoma
- En nuestra cohorte la frecuencia de recaída se presentó en 26%.
- La presentación etaria de los tumores es igual a la reportada en la literatura.
- Los factores predictores de mortalidad no están asociados hasta el momento con recaída.
- La expresión de Bcl-2 y los eventos de fiebre y neutropenia son factores de riesgo significativos para predecir muerte en niños con tumores de SNC.



## Anexos

**Tabla 1:** Características generales de la cohorte de sujetos con tumores de SNC que se diseminan a neuroeje.

| Variable                               |                       |            |
|--|-----------------------|------------|
| Sexo                                   | Hombre                | 35 (61%)   |
|  | Mujer                 | 22 (39%)   |
| Edad al momento del diagnóstico (años) |                       | 9.3±3      |
| Tiempo de evolución (meses)            |                       | 24(16-25)  |
| Tipo de tumor                          | Meduloblastoma        | 24 (42%)   |
|  | Ependimoma            | 20 (35%)   |
|  | Pinealoblastoma       | 6 (11%)    |
|  | Germinal              | 7 (12%)    |
| Tamaño del tumor (cm <sup>3</sup> )    |                       | 5(4-13)    |
| Porcentaje de resección quirúrgica     |                       | 80%(60-90) |
| Alto grado de malignidad               |                       | 37(65%)    |
| Localización                           | Supratentorial        | 23(40%)    |
|  | Infratentorial        | 34(60%)    |
| Clasificación de la respuesta          | Respuesta completa    | 19(33%)    |
|  | Enfermedad estable    | 15(26%)    |
|  | Enfermedad progresiva | 7(12%)     |
| Evento de fiebre y neutropenia         |                       | 33(58%)    |
| Diferimiento de quimioterapia >1 mes   |                       | 10(17%)    |
| Tratamiento quirúrgico                 | Total                 | 23(40%)    |
|  | Parcial               | 30(52%)    |
|  | Biopsia               | 4 (8%)     |
| Radioterapia                           |                       | 52(91%)    |
| Bcl-2 (%)                              |                       | 4.3(0-26)  |
| Bcl-2 positivo                         |                       | 31(53%)    |
| Recaída                                |                       | 16 (28%)   |
| Muerte                                 |                       | 6(10%)     |



**Tabla 2:** Diferencias entre el grupo con Bcl-2 positivo y negativo en pacientes con tumores de SNC que se diseminan a neuroeje.

| Variable                                       | Bcl-2 <25%<br>n=41 | Bcl-2 >25%<br>n=16 | Valor p           |
|--|--------------------|--------------------|-------------------|
| <b>Sexo</b>                                    |                    |                    |                   |
| Hombre   | 23 (56%)           | 12(75%)            | 0.1               |
| Mujer  | 18 (44%)           | 4(25%)             |                   |
| <b>Edad (años)¥</b>                            | 8±3                | 9.1±3              | 0.2               |
| <b>Tiempo de evolución (meses)**</b>           | 24(22-25)          | 15(14-25)          | <b>0.01</b>       |
| <b>Tumor***</b>                                |                    |                    |                   |
| Meduloblastoma                                 | 16 (39%)           | 8 (50%)            | 0.2               |
| Ependimoma                                     | 14 (34%)           | 6 (37%)            |                   |
| Pinealoblastoma                                | 6 (14%)            | 1 (6%)             |                   |
| Germinal                                       | 5 (12%)            | 1 (6%)             |                   |
| <b>Alto grado de malignidad*</b>               | 25(61%)            | 12(75%)            | 0.2               |
| <b>Localización Infratentorial*</b>            | 23(56%)            | 11(69%)            | 0.2               |
| <b>Porcentaje de resección**</b>               | 85(70-90)          | 65(50-75)          | <b>0.002</b>      |
| <b>Comportamiento al tratamiento***</b>        |                    |                    |                   |
| Respuesta completa                             | 19 (46%)           | 5(0%)              | <b>&lt;0.0001</b> |
| Enfermedad estable                             | 14 (34%)           | 5(6%)              |                   |
| Progresión                                     | 2 (5%)             | 5(31%)             |                   |
| Recaída  | 6(15%)             | 10(63%)            |                   |
| <b>Evento de fiebre y neutropenia*</b>         | 25(61%)            | 8(50%)             | 0.3               |
| <b>Diferimiento de quimioterapia &gt;1mes*</b> | 6(14%)             | 4(25%)             | 0.2               |
| <b>Radioterapia (sí)*</b>                      | 36(87%)            | 15(93%)            | 0.1               |
| <b>Muerte*</b>                                 | 5(12%)             | 1(6%)              | 0.4               |

\*Chi cuadrada.

\*\* U de Mann Whitney

\*\*\* Chi cuadrada lineal.

¥= t de studen



**Tabla 3:** Diferencias entre los 4 tipos de tumor: meduloblastomas , ependimomas, pineablastomas y germinales que se diseminan a neuroeje.

| Variable                               | Meduloblastoma | Pinealoblastoma | Ependimoma | Geminal   | Valor de p   |
|--|----------------|-----------------|------------|-----------|--------------|
| <b>Sexo*</b>                           |                |                 |            |           |              |
| Hombre                                 | 18(75%)        | 2(33%)          | 8(40%)     | 7(100%)   | <b>0.002</b> |
| Mujer                                  | 6(25%)         | 4(64%)          | 12(60%)    |           |              |
| <b>Edad (años)‡</b>                    | 9.4±3          | 10±4            | 8±3        | 11.7±3    | 0.2          |
| <b>Tiempo de evolución (meses)**</b>   | 24(15-25)      | 24(22-24)       | 22(18-25)  | 24(14-25) | 0.9          |
| <b>Tamaño tumor (cm³)**</b>            | 7(4-13)        | 4(3-6.5)        | 4(3-17)    | 4(3-20)   | 0.3          |
| <b>Porcentaje de resección**</b>       | 55(40-85)      | 90(75-95)       | 85(80-90)  | 60(50-85) | <b>0.07</b>  |
| <b>% Bcl-2**</b>                       | 8(0-26)        | 2(0-12)         | 12(0-22)   | 12(0-70)  | 0.5          |
| <b>Bcl2&gt;25%*</b>                    | 8(33%)         | 1(16%)          | 6(30%)     | 2(28%)    | 0.8          |
| <b>Radioterapia (sí)*</b>              | 24(100%)       | 5(83%)          | 16(80%)    | 7(100%)   | <b>0.08</b>  |
| <b>Evento de fiebre y neutropenia*</b> | 13(54%)        | 5(83%)          | 8(40%)     | 7(100%)   | <b>0.02</b>  |
| <b>Infratentorial*</b>                 | 20(83%)        | 3(50%)          | 5(25%)     | 6(85%)    | <b>0.001</b> |
| <b>Alto grado de malignidad</b>        | 16 (67%)       | 2(33%)          | 13(65%)    | 6(85%)    | 0.5          |
| <b>Respuesta*</b>                      |                |                 |            |           |              |
| Respuesta completa                     | 11(45.8%)      | 2(33%)          | 5(25%)     | 1(14%)    | 0.1          |
| Enfermedad estable                     | 3(12.5%)       | 3(50%)          | 6(30%)     | 3(42%)    |              |
| Progresión                             | 2(8.3%)        | 0(0%)           | 4(20%)     | 1(14%)    |              |
| <b>Recaída*</b>                        | 8(33%)         | 1(17%)          | 5(25%)     | 2(29%)    | 0.6          |
| <b>Muerte*</b>                         | 4(17%)         | 1(17%)          | 1(5%)      | 0(0%)     | 0.1          |

\*Chi cuadrada lineal

\*\* Kruskal Wallis

‡ ANOVA

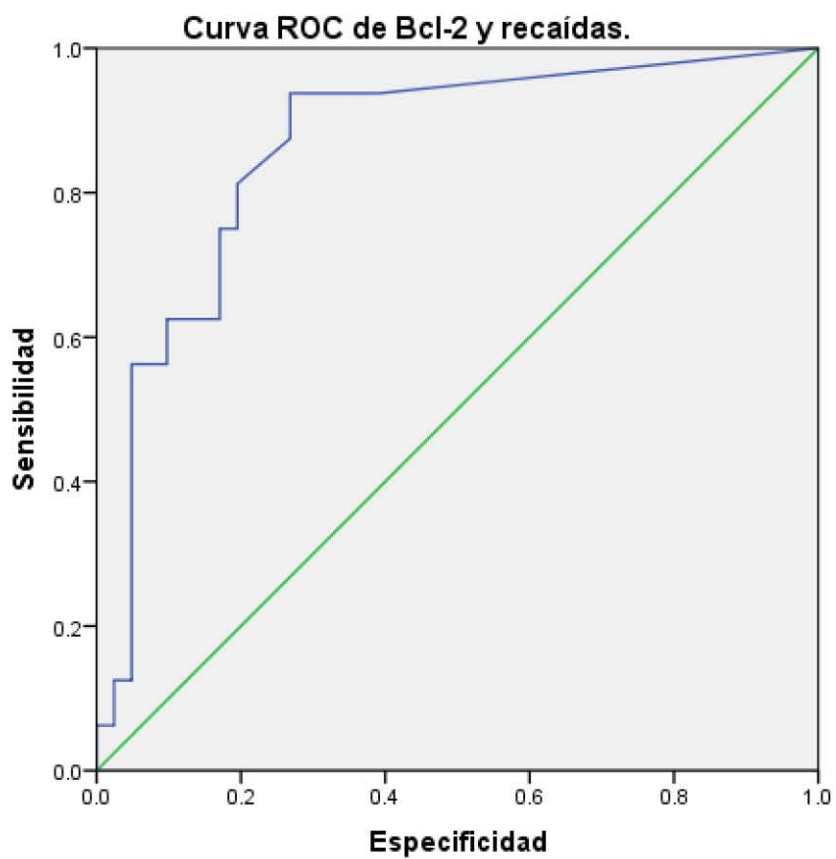


Tabla 4: Modelo bivariado para estimación del riesgo de recaída en pacientes con tumores de SNC que se diseminan a neuroeje.

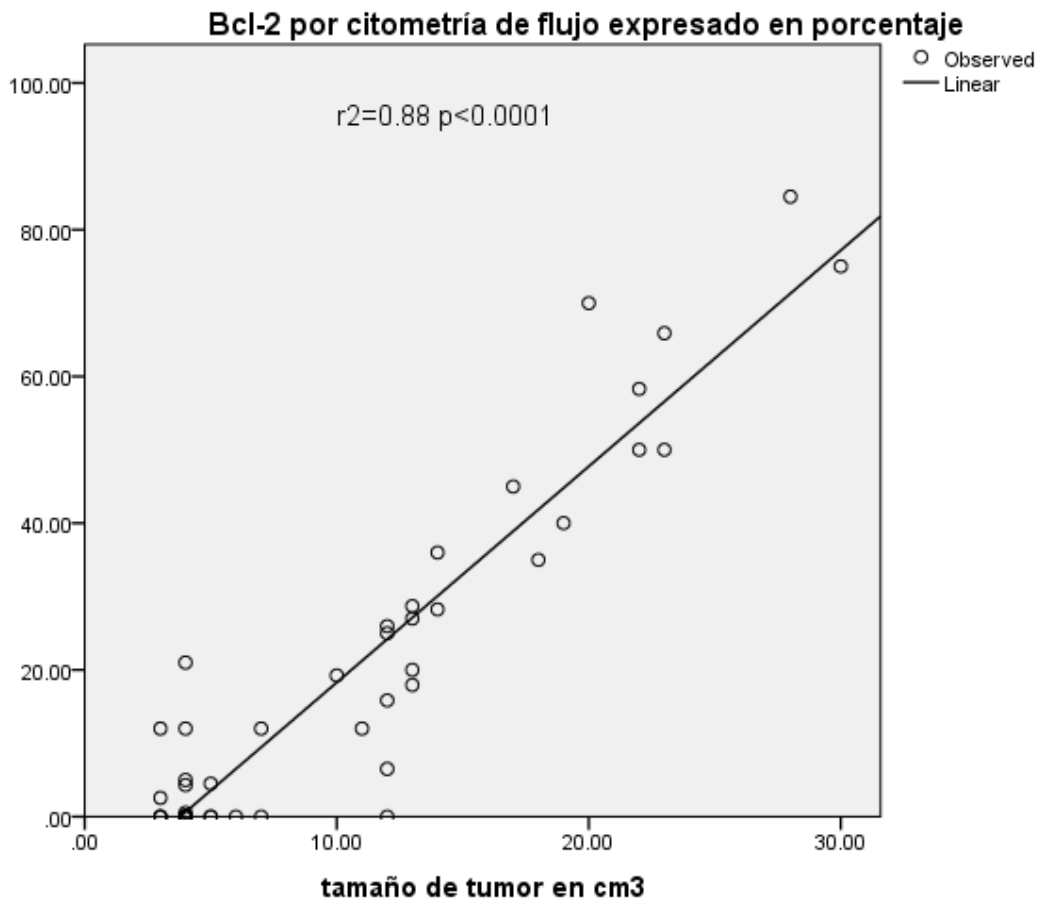
| Variable                            | Sin recaída<br>n=41 | Con recaída<br>n=16 | RR (IC 95%)<br>Crudo | HR (IC-95%)<br>Modelo |
|-------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| Bcl-2>25%                           | 6(15%)              | 10(63%)             | <b>9.7(2.5-25)</b>   | <b>6.7(1.7-24)</b>    |
| Infratentorial                      | 23(56%)             | 11(69%)             | 1.7(0.5-5.8)         | 0.6(0.1-4)            |
| Alto grado de malignidad            | 24(59%)             | 13(81%)             | <b>3(1.1-7.2)</b>    | 2.3(0.6-8)            |
| Resección parcial                   | 18(44%)             | 15(87%)             | 5.4(1.3-23)          | 2.7(0.9-14)           |
| Evento de Fiebre y neutropenia      | 22(54%)             | 11(68%)             | 1.9(0.5-6.4)         | <b>3.7(1-12)</b>      |
| Radioterapia (no)                   | 4(10%)              | 1(6%)               | 1.4(0.2-8.7)         | 1.2(0.1-12)           |
| Diferimiento de quimioterapia >1mes | 7(17%)              | 3(18%)              | 1.3(0.4-14)          | 2(0.5-7)              |



Gráfico 1: Curva ROC



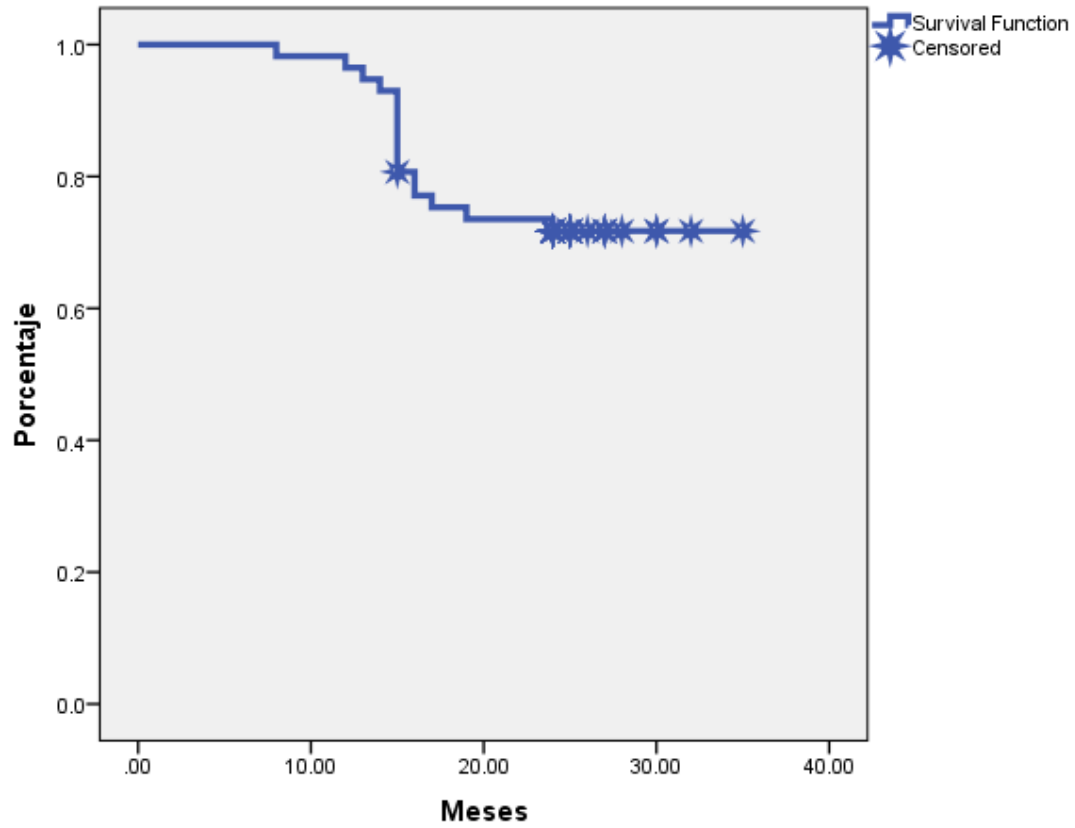
Gráfica 2: Correlación entre el nivel de Bcl-2 medido por citometría de flujo en LCR y tamaño del tumor en cm<sup>3</sup>





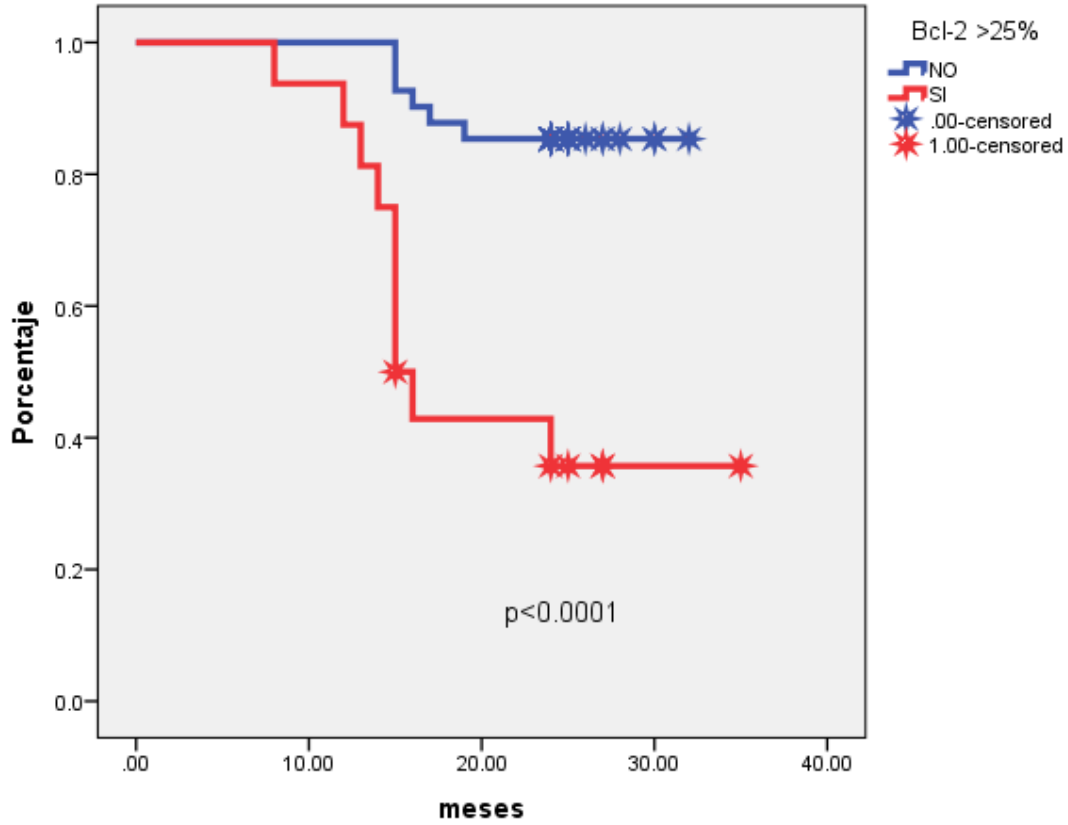
Curva de sobrevida 1

**Curva de sobrevida general de pacientes pediátricos con tumore de SNC que se diseminan a neuroeje.**



Curva de sobrevivida 2

Probabilidad de estar libre de recaída en pacientes pediátricos con tumores de SNC que se diseminana a neuroeje que expresan Bcl-2



## Anexo 1

### *Metodología para determinar número de células tumorales por Citometría de flujo*

Para cada tubo se tomará una muestra de líquido cefalorraquídeo al diagnóstico del paciente y posterior a cada curso de quimioterapia durante los primeros 6 cursos, y se cuantificará por Citometría de flujo el número de células neoplásicas a través de marcaje por medio del anticuerpo monoclonal específico: **Bcl-2** para **Tumores Germinales, Ependimomas, Meduloblastomas y Pinealoblastomas.**

#### **Preparación de muestra para su lectura en citómetro**

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

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

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

- Si el anticuerpo era marca DB se aplicaron sólo 5 microlitros, caso contrario 20 microlitros.
  - Si el anticuerpo es **intracelular** se aplicó la técnica de permeabilización a la muestra después de haber decantado BCL2.
1. Se etiquetará el tubo con líquido cefalorraquídeo, se aplicaron marcadores o anticuerpo de acuerdo al tipo de neoplasia y después la muestra de acuerdo al número de población por microlitro.

#### **Reacción antígeno-anticuerpo**

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

2. Para lisar se aplicó 2 mililitros de solución Lisis y esperó entre 5 a 7 minutos.

3. Para aforar se aplicará 2 mililitros de solución salina isotónica o PBS o FACSCFlow (lavado de células).

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

4. Se centrifugará a 3000 rpm durante tres minutos a una temperatura entre 19°C y 25°C, se decantó (tirar en la tarja parte líquida y secar). Agregará solución salina isotónica 1 mililitro.

- Para anticuerpos intracelulares se permeabilizará con solución permeabilizadora 100 microlitros y mezclará, dejando reposar (incubar) por 7 minutos.
- Se agregará solución salina, centrifugar, para este paso la muestra se había permeabilizado.
- Se aplicará 5 microlitros de anticuerpo y dejar reposar por 15 a 20 minutos, agregando solución salina 2 mililitros.



- Se centrifugará y decantará, además de agregar solución salina 1 mililitro.

### ***Metodología para determinar presencia de células tumorales por citomorfológico***

1. Se preparará frotis en dos portaobjetos aplicando 0.5mL de muestra de líquido cefalorraquídeo.
2. Se centrifugará a 1500 rpm durante 10 minutos a una temperatura entre 20°C y 24°C, se fijó en etanol del 96° durante cinco minutos. Se colocaron las dos laminillas en una canastilla.
3. Se teñirá en hematoxilina de Hallis, filtrada reciente, de 6 a 15 minutos. Posteriormente se lavaron las laminillas en agua corriente por 5 minutos.
4. Se diferenciará en etanol ácido al 1%, 1 a 2 remojones, y posteriormente se lava en agua corriente por 5 minutos.
5. Se colocará las laminillas en una solución débil de agua amoniacal hasta que las secciones se veían color azul brillante, y se enjuagará en agua corriente por 10 minutos.
6. Se contrastará en la solución de eosina por dos minutos, y posteriormente se lavó en agua corriente.
7. Se deshidratará y aclarará a través de dos cambios de etanol del 96° cada uno, y posteriormente dos cambios de etanol absoluto.
8. Se realizarán diez baños en alcohol xilol 50% y 50%. Posteriormente se aplicarán diez baños en xilol.
9. Se montará en medio resinoso y una vez preparada la laminilla, estaba lista para observarse al microscopio. Se observó de color azul el núcleo y de color rosado o rojo el citoplasma<sup>84</sup>.

## **Referencias bibliográficas.**

- 1) **Vázquez SR, Martínez AA, Llorente OL, Rojo CP, Hinojosa BJ.** Síntomas y signos iniciales de los tumores cerebrales pediátricos. *Neurología* 2008; 23 (2):122-132.
- 2) **Kieran M.** Tumors of the brain and spinal cord. Orkin S. *Oncology of infancy and childhood.* Ed. Saunders Elsevier. 2009; 601-720.
- 3) **CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of United States).** 2010. *Statistical Report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in United States 2004-2006.* <http://www.cbtrus.org/2007-2008/2007-20081.html>



- 
- 4) **Fajardo-Gutierrez A, Rendon-Macías ME, Mejía-Aranguré JM.** Epidemiología del cáncer en niños mexicanos. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2011;49(1):s43-s70.
  - 5) **Fajardo Gutiérrez A, Juárez-Ocaña S, González-Miranda G, Palma Padilla V, Carreón-Cruz R, Mejía-Álvarez MC, Mejía-Arangure JM.** Incidence of cancer in children resident in ten jurisdiction of de Mexican republic: importance of de cáncer registry. *BMC Cancer.* 2007;7:68
  - 6) **Kleihues P, Louis D, Scheithauer B, Rorke L, Reifenberger G, Burger P, et al.** The WHO Classification of Tumors of the Nervous System. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.* 2002;61(3):215-225.
  - 7) **López E, Sepúlveda A.** Clinical and molecular Parameters for Risk stratification in Mexican Children with Medulloblastoma. *Arch. Med Res,* 2007; 38: 769-773.
  - 8) **Chiechi MV, Smirniotopoulos JG, Mena H .** Pineal parenchymal tumors: CT and MR features. *J Comput Assist Tomogr.* 1995; 19: 509-517.
  - 9) **Fleming AJ, Chi SN.** Brain tumors in children. *Curr Probl Pediatr Adolesc Care.* 2012;42(4):80-103.
  - 10) **Saran FH, Driever PH, Thilmann C..** Survival of very young children with medulloblastoma (primitive neuroectodermal tumor of the posterior fossa) treated with craniospinal irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;42:959–967.
  - 11) **David N Lois, Oriko Oghaki, Otmar Wistler, Webster Cavenee.** WHO classification of the central tumour system. *German Cancer Research Center.Heildeberg* 2007.p 12-56
  - 12) **Muñoz-Tagle J, Cruz-Morales J, Sánchez-Rodríguez G, Guerrero-Guerrero A, Muñoz-Bellizzia JA, Alejo-Hernández A.** Experiencia en el manejo de meduloblastomas en el servicio de neurocirugía pediátrica del Hospital General del Centro Médico Nacional La Raza. *Arch Neurocién (Mex).* 2005;10(3):150-155.
  - 13) **Giangaspero F, Chieco P, Ceccarelli C, Lisignoli G, Pozuolli R, Gambacorta M, Rossi G, Burger PC .** “Desmoplastic” versus “classic” medulloblastoma: comparison of DNA content, histopathology and differentiation. *Virchows Arch A PatholAnatHistopathol.* 1991; 418: 207-214.
  - 14) **Koci TM, Chiang F, Mehringer CM.** Adult cerebellar medulloblastoma: imaging features with emphasis o MR. *AJNR.* 1993; 14:929-39.
  - 15) **Gilbertson RJ, Clifford SC.** PDGFRB is overexpressed in metastatic medulloblastoma. *Nat Genet.* 1993;35: 197-198.
  - 16) **Gilbertson RJ, Jaros E, Perry RH, Kelly PJ, Lunec J, Pearson AD.** Mitotic percentage index: a new prognostic factor for childhood medulloblastoma. *Eur J Cancer.* 1997. 33: 609-615.
  - 17) **McLendon RE, Friedman HS, Fuchs HE, Kun LE, Bigner SH.** Diagnostic markers in paediatric medulloblastoma: a Paediatric Oncology Group Study. *Histopathology.* 1999;34(2):154-62.
  - 18) **Zerbini C, Gelber RD, Weinberg D.** Prognostic factors in medulloblastoma, including DNA ploidy, *J ClinOncol.* 2003; 11 (4): 616-22,



- 
- 19) **Herrick MK, Rubinstein LJ**. The cytological differentiating potential of pineal parenchymal neoplasms (true pinealomas). A clinicopathological study of 28 tumours. *Brain*. 2001; 102: 289-320.
- 20) **Mena H, Rushing EJ, Ribas JL, Delahunt B, McCarthy WF**. Tumors of pineal parenchymal cells: a correlation of histological features, including nucleolar organizer regions, with survival in 35 cases. *Hum Pathol*. 1995; 26: 20-30.
- 21) **Herrick MK, Rubinstein LJ**. The cytological differentiating potential of pineal parenchymal neoplasms (true pinealomas). A clinicopathological study of 28 tumours. *Brain*. 1973; 102: 289-320.
- 22) **Mena H, Rushing EJ, Ribas JL, Delahunt B, McCarthy WF**. Tumors of pineal parenchymal cells: a correlation of histological features, including nucleolar organizer regions, with survival in 35 cases. *Hum Pathol*. 1995 26: 20-30.
- 23) **Chiechi MV, Smirniotopoulos JG, Mena H**. Pineal parenchymal tumors: CT and MR features. *J Comput Assist Tomogr* 1995; 19: 509-517.
- 24) **Nakamura M, Saeki N, Iwadate Y, Sunami K, Osato K, Yamaura A** Neuroradiological characteristics of pineocytoma and pineoblastoma. *Neuroradiology*. 2000; 42: 509-514.
- 25) **Constantine C, Miller DC, Gardner S, Balmaceda C, Finlay J**. Osseous metastasis of pineoblastoma: a case report and review of the literature. *J Neurooncol*. 2005; 74: 53-57.
- 26) **Schild SE, Scheithauer BW, Schomberg PJ, Hook CC, Kelly PJ, Frick L, Robinow JS, Buskirk SJ**. Pineal parenchymal tumors. Clinical, pathologic, and therapeutic aspects. *Cancer*. 1993; 72: 870-880.
- 27) **Lee JY, Wakabayashi T, Yoshida J**. Management and survival of pineoblastoma: an analysis of 34 adults from the brain tumor registry of Japan. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2005; 45: 132-141.
- 28) **Marcus DM, Brooks SE, Leff G, McCormick R, Thompson T, Anfinson S, Lasudry J, Albert DM**. Trilateral retinoblastoma: insights into histogenesis and management. *Surv Ophthalmol*. 1998; 43: 59-70.
- 29) **Jouvet A, Saint-Pierre G, Fauchon F, Privat K, Bouffet E, Ruchoux MM, Chauveinc L, Fevre-Montange M**. Pineal parenchymal tumors: a correlation of histological features with prognosis in 66 cases. *Brain Pathol*. 2000; 10: 49-60.
- 30) **Mena H, Rushing EJ, Ribas JL, Delahunt B, McCarthy WF**. Tumors of pineal parenchymal cells: a correlation of histological features, including nucleolar organizer regions, with survival in 35 cases. *Hum Pathol*. 1995; 26: 20-30.
- 31) **Bjornsson J, Scheithauer BW, Okazaki H, Leech RW**. Intracranial germ cell tumors: pathobiological and immunohistochemical aspects of 70 cases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1985; 44: 32-46.
- 32) **Rueda P, Heifetz SA, Sesterhenn IA, Clark GB**. Primary intracranial germ cell tumors in the first two decades of life. A clinical, light-microscopic, and immunohistochemical analysis of 54 cases. *Perspect Pediatr Pathol*. 1987; 10: 160-207.



- 
- 33) **Schild SE, Scheithauer BW, Haddock MG, Wong WW, Lyons MK, Marks LB, Norman MG, Burger PC.** Histologically confirmed pineal tumors and other germ cell tumors of the brain. *Cancer*.1996; 78: 2564-2571.
- 34) **Bjornsson J, Scheithauer BW, Okazaki H, Leech RW .**Intracranial germ cell tumors: pathobiological and immunohistochemical aspects of 70 cases. *J NeuropatholExpNeurol*.1985; 44: 32-46.
- 35) **Ho DM, Liu HC .** Primary intracranial germ cell tumor.Pathologic study of 51 patients. *Cancer*. 1992; 70: 1577-1584.
- 36) **Sawamura Y, Ikeda J, Shirato H, Tada M, Abe H.** Germ cell tumours of the central nervous system: treatment consideration based on 111 cases and their long-term clinical outcomes. *Eur J Cancer*. 1998; 34: 104-110.
- 37) **Hoffman HJ, Otsubo H, Hendrick EB, Humphreys RP, Drake JM, Becker LE, Greenberg M, Jenkin D.** Intracranial germ-cell tumors in children. *J Neurosurg*.1991; 74: 545-551.
- 38) **Fujimaki T, Matsutani M, Funada N, Kirino T, Takakura K, Nakamura O, Tamura A, Sano K .** CT and MRI features of intracranial germ cell tumors. *J Neurooncol*.1994; 19: 217-226.
- 39) **Liang L, Korogi Y, Sugahara T, Ikushima I, Shigematsu Y, Okuda T, Takahashi M, Kochi M, Ushio Y.** MRI of intracranialgerm-celltumours. *Neuroradiology*;2002: 44: 382-388.
- 40) **CA. Regueiro.** Tratamiento de los tumors germinales y otros de la región pineal. *Neurocirugía* 2003;14:127-139.
- 41) **Saran FH, Driever PH, Thilmann C.** Survival of very young children with medulloblastoma (primitive neuroectodermal tumor of the posterior fossa) treated with craniospinal irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;42:959–967.
- 42) **Tomita T, McLone DG.** Brain tumors during the first twenty-four months of life. *Neurosurgery* 1985;17:913–919.
- 43) **Cohen BH, Packer RJ, Siegel KR..** Brain tumors in children under 2 years: treatment, survival and long-term prognosis. *Pediatr Neurosurg* 1993;19:171–179.
- 44) **Duffner PK, Horowitz ME, Krischer JP.**The treatment of malignant brain tumors in infants and very young children: an update of the Pediatric Oncology Group experience. *Neurooncol* 1999;1:152–161.
- 45) **Lomanto-Díaz L, Ortiz-Cala OL, Bretón-Pinto CO, Gómez-Lizcano AI, Mesa-Cornejo VM.** El ciclo celular. *MedUNAB*.2003;16(6):21-29.
- 45) **Alberts, Bruce;** Johnson Alexander; Lewis;Raff, Martin, Roberts, Keith. *Molecular Biology of the Cell*. 4 edición. Garland Science, 2002.



- 
- 47) **Deigner HP, Kinscherf R.** Modulating apoptosis: current applications and prospects for future drug development. *Curr Med Chem* 1999;6:399-414.
- 48) **Thompson CB.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment diseases. *Science*.1995 267:456-462
- 49) **Jordan J.** Apoptosis, muerte celular programada. *OFFARM*.2003: 22(6):100-105.
- 50) **Reed JC.** Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:111-21.
- 51) **Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay M-F, Breire J, Lavignac C, et al.** Prognostic significance of Bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*.1996;87:265-272.
- 52) **Ikegaki N, Katsumata M, Minna J, Tsujimoto Y.** Expression of BCL-2 in small lung carcinoma cells. *Cancer res*.1994;54:6-8.
- 53) **Kluck RM, Esposti MD, Perkins G, Renken C, Kuwana T, Bossy-Wetzel E, Goldberg M, Allen T, Barber MJ, Green DR, et al.** The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *J Cell Biol*.1999;147: 809–822.
- 54) **Hardwick, JM and Soane, L.** Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a008722
- 55) **Shamas-Din A, Brahmhatt H, Leber B, Andrews DW.** BH3-only proteins: orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2011; 1813: 508–520.
- 56) **López-Aguilar E, Sepúlveda-Vildósola AC, Rioscovian-Soto AP, Mendoza-Galván L, García-Vázquez F, Ignacio F, et al.** Sobreexpresión de p53 como factor pronóstico en niños con astrocitomas. *GAMO*.2011;10(1):19-27
- 57) **Elinos-Báez CM, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J.** Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac Méd Méx*.2003;139 (5):493-499.
- 58) **López-Aguilar E, Gascón-Lastiri G, Sepúlveda-Vildósola AC, Barrientos C, Ramírez G, De la Cruz-Yáñez H.** Correlación de la expresión de la apoptosis, con la respuesta a tratamiento y sobrevida en niños con astrocitoma. *GAMO*.2011;10(1):32-39.
- 59) **López – Aguilar E, Rioscovian-Soto AP, Sepúlveda-Vildósola AC. Siordia G, Figueroa-Rosas L, Cruz-Yañez H.** Sobreexpresión BLC-2 como factor pronóstico en niños con astrocitomas. *GAMO*.2011;10(1)15-20.
- 60) **López – Aguilar E, Rioscovian-Soto AP, Sepúlveda-Vildósola AC, Mendoza-Galván L, García-Vázquez Francisco, de la Cruz-Yañez H.** Sobreexpresión de p53 como factor pronóstico en niños con astrocitomas. *GAMO*.2011;10(1):19-24.





- 
- 61 )**Charles G Eberhart, Aneeka Chaudhry, Richard W Daniel, Leila Khaki, Keerti V Shah , Patti E Gravitt.** Increased p53 immunopositivity in anaplastic medulloblastoma and supratentorial PNET is not caused by JC virus. *BMC Cancer* 2005, 5:19
- 62) **Steinbok P, Heirschel S, Cochran DD, Kestle JR.** Value of postoperative surveillance imaging in the management of children with some common brain tumors. *J. Neurosurg.*1996;84:726-32
- 63) **Cervera Deval.** RECIST y el radiólogo. *Radiología.*2012.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rx.2012.03.2010>
- 64 ) **Lefkowitz Lb, Packer RJ, Siegel KR.** Results of treatment of children with recurrent medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumors with lomustine, cisplatin, and vincristine. *Cancer.*1990;65(3):412-7
- 65 )**Kerr JF.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239
- 66 )**Prophet E, Mills B, Arrington J.** Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de EUA, 1994: 31-32.
- 67) **López-Aguilar E, Sepúlveda-Vildosola A.C, Galvan-Luna S.** Detección de enfermedad residual mínima en tumores de sistema nervioso central mediante citometría de flujo. 2011, 15-20
- 68 )**Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamra T, Young JL, Bunin GR (eds).***Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*, National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub.No.99-4649. Bethesda,MD,1999.
- 69 )**Fajardo-Gutierrez A, Rendón-Macias ME, Mejía-Aranguré JM.** Epidemiología del cáncer en niños mexicanos. Resultados Globales. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.*2011;49(supl 1):S43-70
- 70 )**Rivera-Luna R, Niembro-Zuñiga AM, Zarco A, Marín-Bracho a, Cardenas-Cardos R, Olaya-Vargas A.** Medulloblastoma en pediatría.Pronóstico y tratamiento en la actualidad. *Gac Med Méx.*2007;143(5):415-20.
- 71 )**Zelter PM, Boyett JM, Finlay JI, Albright AL, Roke LB, Milstein JM, et al.** Metastasis stage, adjuvant treatment and residual tumor are factors for medulloblastoma in children. Conclusions from children's cancer group 921 randomized phase II study. *J Clin Oncol.* 1999;17:832-45
- 72 )**Bloom JHG, Glees J, Bell J.** The treatment and long-term prognosis of children with intracranial tumors: a study of 610 cases, 1950-1980. *Int j radiat Oncol Biol Phys.* 1990;18:773-745
- 73 )**Villarejo F, Martínez-Lage JF.** Tumores cerebrales en niños. *Pediatría Integral.*2008;7(6):577-83.
- 74 )**Battifora H.** Immunohistochemistry in tumor prognosis. In immunohistochemistry long course, nice, 1998:18.23.
- 75) **Moore T.** Expression of CD34 and Bcl-2 in phylloides tumours, fibroadenomas and spindle cell lesion of breast. *Histopathology.*2001;38:62-7



- 
- 76 ) **Kume T, Oshima K, Shinohora t, Takeo H, Yamishita t, Kikuchi M.**low of rate of apoptosis and overexpression of Bcl-2 in Epstein Barr virus associated gastric carcinoma. *Histopathology.*1999;34:502-9
- 77 )**Konstaninrindou AE, Korkolopoulou P, Pastouris E.** Apoptotic markers for primary brain tumor prognosis. *J neurooncol.*2005;72(2):151-6
- 78) **Eberhart, C.G., Cohen, K.J., Tihan, T., Goldthwaite, P., Burger,.** Medulloblastoma with systemic metastases: evaluatin of tumor histopathology and clinical behavior un 23 patients. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25: 198-203.
- 79) **Chen X, He S, Feng Y.**Radiation-induced apoptosis and p53, bcl2 gene expression products in QGY-7703 cell line in vitro. *Zhonghua Gan Zang Za Chi.*2000;8(2):110-1
- 80 ) **Wang F, Bhat K, Doucette M, Zhou S, Gu Y, Law B, et al.** Docosahesaenoic acid (DHA) sensitizes brain tumor cellll to etoposide-induced apoptosis. *Curr Mol Med.*2011;11(6):503-11.
- 81 ) **Sharma SV.** Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer.*2007;7:434-40.
- 82 **Dai Y, Grant S.** Targeting multiple arms of the apoptotic regulatory machinery. *Cancer res.*2007;67:2908-15
- 83 ) **Kaelin JR.** The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer.*2006;5:686-79.



---



---

<sup>84</sup>Prophet E, Mills B, Arrington J. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerza Armadas de EUA, 1994: 31-32.

