



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

Unidad Médica de Alta Especialidad

Hospital de Pediatría

Centro Médico Nacional Siglo XXI

Análisis de la expresión de Bcl-2 por citometría de flujo en pacientes pediátricos con tumores de Sistema Nervioso Central que se diseminan a neuroeje.

Tesis para obtener el posgrado en:

PEDIATRIA MÉDICA.

Alumno:

Horacio Márquez González

México D.F





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

Dra. Ana Carolina Sepúlveda Vildósola.

Pediatría Médica.

Maestra en Medicina/ Maestría en Educación.

Jefa de Enseñanza del UMAE HP CMN SXXI

anasepulveda@imss.gob.mx

Alumno:

Horacio Márquez González

Residente de cuarto año de Pediatría Médica.

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:

Núm. de Registro

R-2012-3603-77

ATENTAMENTE

DR. HERMILO DE LA CRUZ YANEZ

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

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL





Comité evaluador

Presidente:

Dra. María Guadalupe Miranda Novales.

Secretario:

Dra. Julia Rocío Herrera Márquez

Vocal

Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré

Vocal

Dr. Diego Arenas Aranda

Vocal

Dr. Alonso Gómez Negrete





Tabla de contenido

Palabras Clave	6
Resumen Estructurado	7
Marco Teórico	8
Planteamiento del problema.....	24
Pregunta de investigación.	24
Justificación	25
Hipótesis.....	25
Objetivos.....	25
Métodos	26
Tabla de variables:.....	28
Tamaño de muestra.....	29
Plan de análisis estadístico	30
Consideraciones éticas	30
Resultados.....	31
Discusión	32
Conclusiones	34
Anexos	35
<i>Carta de consentimiento informado</i>	<i>39</i>
<i>Metodología para determinar número de células tumorales por Citometría de flujo ...</i>	<i>44</i>
Referencias bibliográficas.....	46





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. En México la incidencia es de 17 casos por millón cada año.

Las nuevas terapéuticas han mejorado la esperanza de vida de estos tumores a 5 años. Sin embargo existen múltiples factores que favorecen las recaídas y el fracaso en la terapéutica de estas neoplasias.

El comportamiento celular de los tumores favorece la prolongación de la vida celular mediante expresión y sobreexpresión de diversas proteínas.

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 el tumor de SNC que disemina a neuroeje que expresará con mayor frecuencia e intensidad el Bcl-2 medido por citometría de flujo en pacientes pediátricos.

Tipo de estudio: Transversal analítico

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 realizaron medidas de dispersión y de tendencia central, diferencia de medianas en la expresión de Bcl-2 por Kruskal Wallis

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 30 pacientes (52%) . Los tumores germinales expresaron Bcl.2 en 75% y los meduloblastomas con mayor intensidad a diferencia del resto, $p=0.05$

Conclusiones: El Bcl-2 se expresa más frecuentemente en tumores germinales y más intensamente en meduloblastomas.





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 años².

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%³.

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.⁴

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 quimioterapia⁵.

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 adulta⁶.

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^{7 8}.

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 cefalorraquídeo⁹.

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 tratamiento¹⁰.

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 metastásicos¹¹.

Los tumores con diseminación en neuroeje son los de las familias correspondientes a las células ependimales, la región pineal y embrionarios; específicamente: meduloblastomas, ependimomas, pinaloblastomas, 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.”¹²

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

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 ceguera⁸, ataxia, *nistagmus*. En niños mas jóvenes puede haber datos de hemorragia subaracnoidea secundaria a sangrado tumoral¹⁴.

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^{15, 16}. Se ha reportado menor sobrevida en los pacientes que expresan BCL-2 en los cortes tumorales que en aquellos que no lo hacen.¹⁷

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 pacientes¹⁸.

Es obligado que en los pacientes de reciente diagnóstico se realice estudio de neuroimagen y citología de LCR para determinar la extensión de la enfermedad¹⁹.





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 neuroeje²⁰.

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 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 sobrevivencia varía de 24 a 30 meses^{21, 22}.

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

La extensión de la enfermedad al momento del diagnóstico mediante detección vía LCR o RMN, determina la sobrevida del paciente. La extensión de la resección y la radioterapia determina el pronóstico²⁷. Siendo las metástasis a SNC y columna vertebral la principal causa de muerte²⁸. 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^{29, 30}.

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^{31, 32, 33}.

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^{34, 35, 36}.

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

Como otros tumores de células germinales extragonadales, las variantes de SNC afectan principalmente la línea media: 80% o más se desarrolla en estructuras cerca del tercer ventrículo, siendo la región de la glándula pineal el principal sitio de origen, seguido del compartimento supraselar³⁷. Otros sitios pueden ser la región intraventricular, periventricular difusa, ganglios basales, tálamo, intramedular e intraselar.

Los hallazgos de imagenología son inespecíficos^{38, 39}. 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 BCNU⁴⁰.

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^{41, 42}.

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 desoxirribonucleico), 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. Ver figura 1

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.

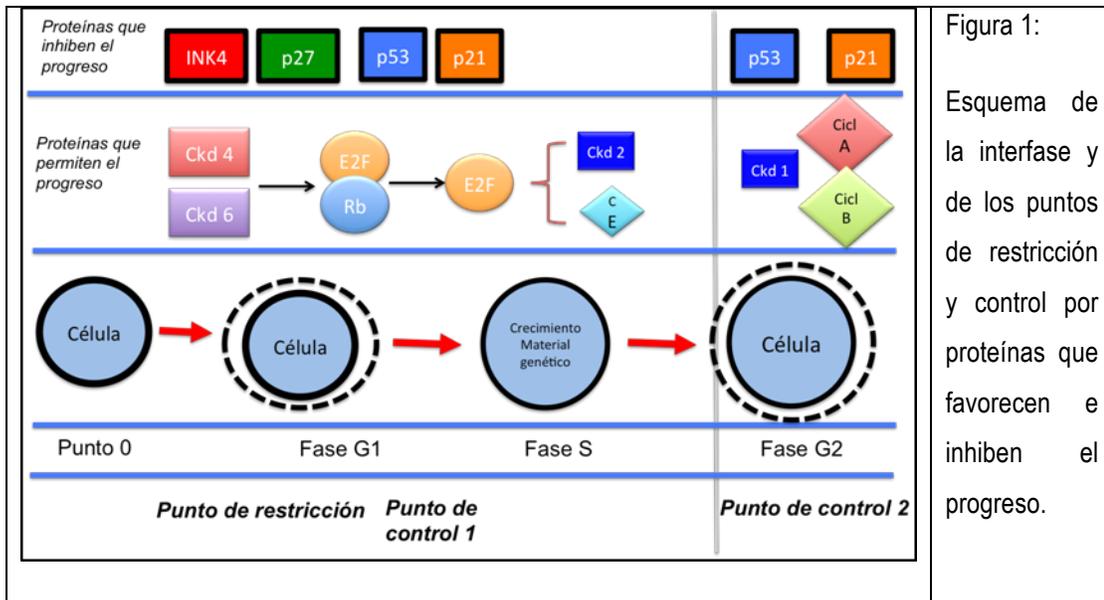


Figura 1:
Esquema de la interfase y de los puntos de restricción y control por proteínas que favorecen e inhiben el progreso.

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: apoptosis⁴³.

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 mitocondria⁴⁴. 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- α) 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 celulares⁴⁵.

- Señalización: Una vez que se han activado los receptores, inicia una activación secuencializada de segundos mensajeros que activan la cascada intracelular, entre los más descritos: p53, BCL-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/reducción⁴⁶.

¿Qué es el 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^{47,48}.

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. Ver *figura 2*

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 ciclo⁴⁹.

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 muchas 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 3⁵⁰.

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 activación⁵¹.

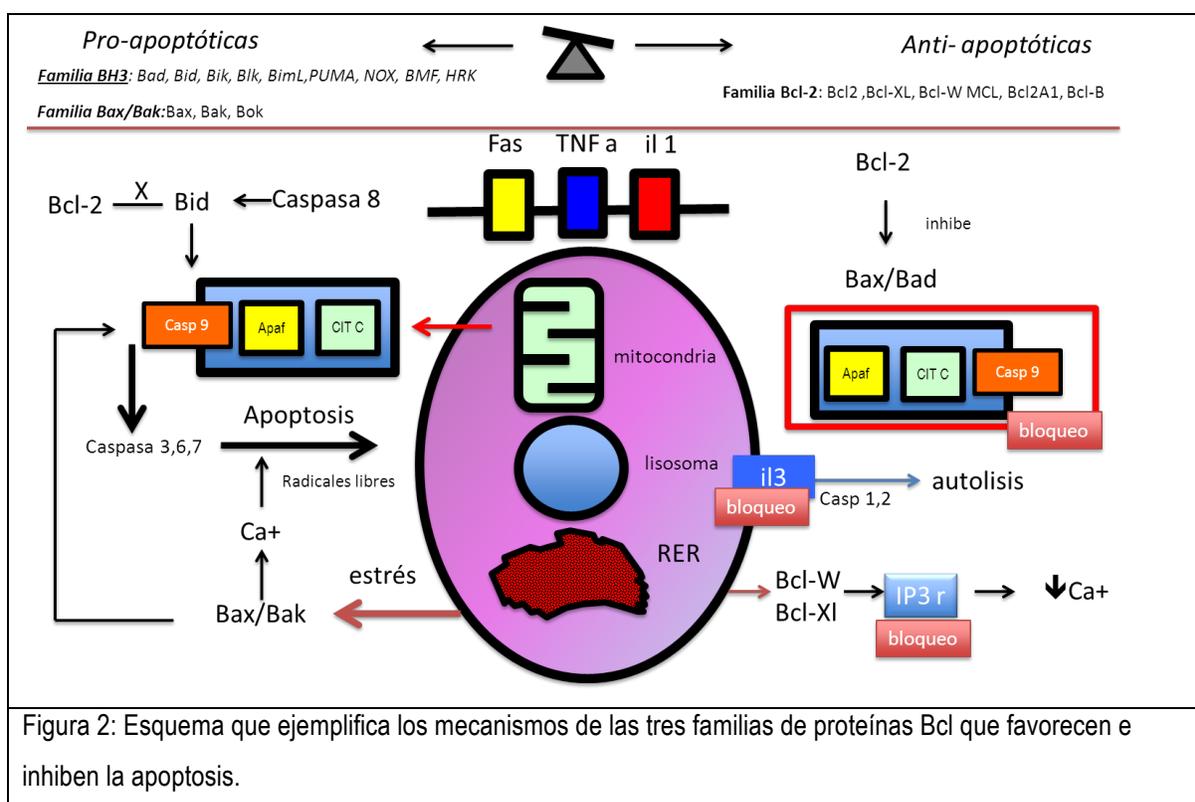


Figura 2: Esquema que ejemplifica los mecanismos de las tres familias de proteínas Bcl que favorecen e inhiben la apoptosis.

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.

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.

La familia de BH3⁵² (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 activación⁵⁶.





Proteína P-53⁵³

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.

Caspasas⁵⁴

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 sarcomas⁵⁵.

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 expresaron⁵⁶.

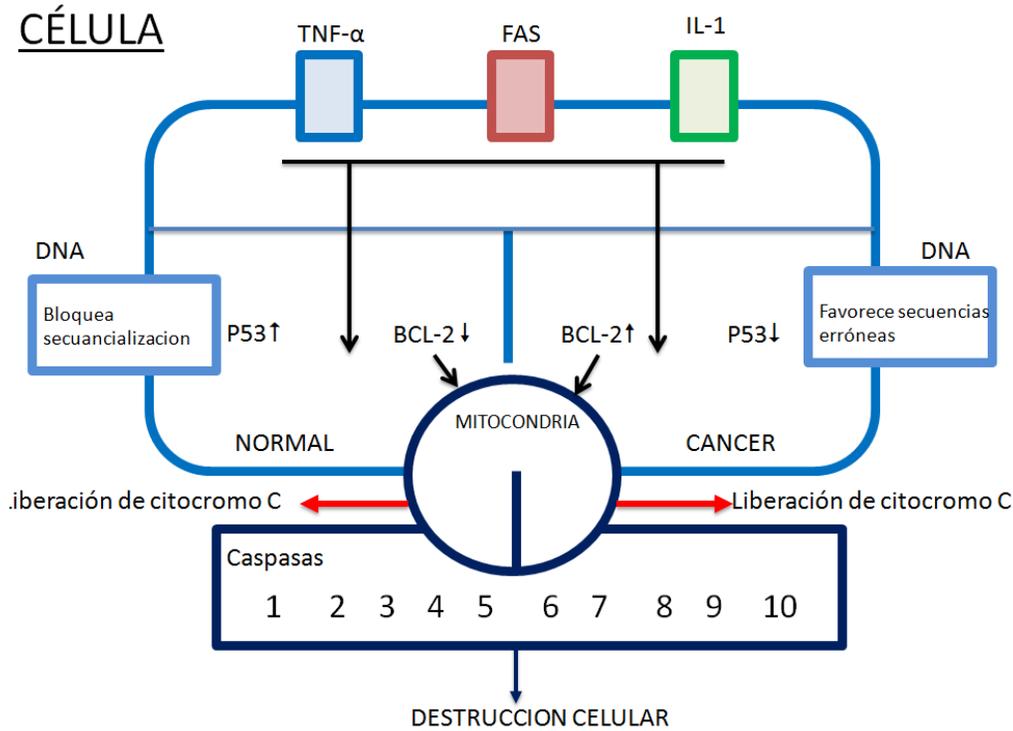


Figura 1

El p53 de igual manera se asocia a menor sobrevida en los pacientes con astrocitomas que lo expresan⁵⁷, 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 pronóstico⁵⁸.

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 viriones⁵⁹.

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 1×10^{-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 neoplasias⁶⁰.

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.





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.

Sin embargo, no se encuentra descrito en la literatura la frecuencia en que se expresa este marcador. Los tumores de SNC que se diseminan a neuroeje tiene ya de entrada un peor pronóstico por la diseminación de dichas células. De determinarse el comportamiento de estas células en la expresión de Bcl-2 podrán sugerirse nuevos estudios que evalúen el comportamiento que tienen con la evolución.

Pregunta de investigación.

¿Cuál será la frecuencia de expresión de Bcl-2 en un grupo de tumores de SNC que se diseminen a neuroeje (meduloblastomas, ependimomas, pinealoblastomas, germinales) en pacientes pediátricos?





Justificación

La citometría de flujo tiene la capacidad de detectar la expresión de proteínas 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 imagen⁶¹.

Es de importancia determinar en estos tumores que diseminan a neuroeje cuál y en que intensidad es la frecuencia en que se expresa el Bcl-2

Hipótesis

En pacientes pediátricos, los meduloblastomas que tienen celularidad positiva en LCR expresarán con mayor frecuencia y en mayor porcentaje la proteínas Bcl-2 medida por citometría de flujo comparado con los tumores germinales, pinaloblastomas y endimomas con metástasis a LCR.

Objetivos

Objetivo general:

Determinar el tumor de SNC que disemina a neuroeje que expresará con mayor frecuencia e intensidad el Bcl-2 medido por citometría de flujo en pacientes pediátricos.

Objetivo particular:

- Determinar las características demográficas y clínicas de cada uno de los tumores de SNC estudiados (meduloblastomas, germinales, pineablastomas y endimomas) 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: transversal analítico

Por seguimiento: transversal

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 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 y que sea positivo para células neoplásicas.

Criterios de exclusión

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





Crterios de eliminaci3n

- Pacientes con expediente incompleto.
- Muestra de lquido cefalorraqudeo insuficiente para realizaci3n de BCL-2.

M3todos

Se captaron a los pacientes de reciente ingreso con la sospecha de tumor de SNC con diseminaci3n a neuroeje y se incluyeron una vez que se haya corroborado el diagn3stico por clnica, imagen y reporte histopatol3gico.

El paciente posterior a ser sometido al procedimiento quir3rgico de extirpaci3n total, parcial o biopsia y de confirmaci3n histol3gica se tom3 una muestra de LCR posterior a un periodo de lavado de 2 semanas posquir3rgica y se determinar3 la celularidad (positiva o negativa), incluy3ndose a los primeros y determiando mediante cit3metro la presencia de Bcl-2.

Se tomaron del expediente clnico las siguientes variables: sexo, edad de diagn3stico, tipo de tratamiento quir3rgico, grado histol3gico y localizaci3n.

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



Tabla de variables:

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	MEDICION.
DEMOGRAFICAS				
Sexo	Características fenotípicas que califican al sujeto en femenino o masculino	Sexo Fenotípico	Cualitativa nominal	1: hombre 2: mujer
Edad	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 discreta	Número de meses
Localización del tumor	Localización intracraneal del tumor.	Sitio en el que se encuentra el tumor en el cráneo por reporte del cirujano o RMN	Cualitativa nominal	1: infratentorial 2: supratentorial 3: región pineal.
Clasificación del tumor	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 nominal	1: meduloblastoma 2: germinal 3: pinealoblastoma 4.ependimoma



Grado histológico	Los tumores de grado I son circunscriptos y tienen, por lo tanto, grado II. límites son imprecisos o la extensión es difusa . Grado III al tumor pre-existente (que era de grado I ó II). Grado IV indiferenciado	De acuerdo al reporte de patología	Independiente	Cualitativa nominal
Resección quirúrgica	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 2: parcial 3: total
BLC-2 en porcentaje	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.	Dependiente Cualitativa nominal	0: por debajo del porcentaje determinado como riesgo 1: por arriba del porcentaje determinado como riesgo.

Tamaño de muestra

De acuerdo al manual de clasificación de tumores de SNC de la OMS de 2007, los meduloblastomas presentan una frecuencia de expresión de Bcl-2 en inmunohistoquímica del 27%.

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





$$Z^2_a = 3.84$$

$$p = 0.73$$

$$q = 0.27$$

$$\delta^2 = 0.09$$

Por lo tanto el tamaño de muestra esperado es de : **9 pacientes en cada grupo de tumores analizados**

Total de pacientes: 36 sujetos

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.

Descriptivo	<ul style="list-style-type: none"> Estimación de medidas de tendencia central y dispersión para variables continuas y la estimación de proporciones para variables categóricas
Inferencial	<ul style="list-style-type: none"> 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.

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 mayor al 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 mediana de edad al inicio del diagnóstico de 120 meses (15-198). El tumor más frecuente correspondió al Meduloblastoma en 24 casos (42%) y la mediana del tiempo de evolución, hasta la fecha actual es de 12 meses (5-36).

La presentación del tumor fue en el 63% infratentoriales, y el 83% se clasificaron de alto riesgo.

En relación al manejo terapéutico, la resección quirúrgica mayor del 80% se llevó a cabo en 32 sujetos (55%). El Bcl-2 fue positivo en 30 pacientes (52%). El resto de las características de muestra en la **tabla 1**.

Los resultados por cada uno de los tumores fue el siguiente, ver tabla 2:

En los meduloblastomas, su presentación más frecuente fue en el sexo masculino en el 75%, la mediana de edad de presentación de 114 meses (38-198), con un manejo quirúrgico total del 62% y una expresión de Bcl-2 en el 54% de los sujetos.

Para los Ependimomas, el sexo femenino (60%) fue el más prevalente, con una mediana de edad de 99 meses (15-192), la excéresis total y parcial se llevaron a cabo en el 39% respectivamente y se expresó Bcl-2 en 45%.





Los Pinealoblastomas se presentaron más frecuentemente en mujeres (67%), con una mediana de edad de 132 meses (19-174) ; siendo la resección total el manejo en el 80% de los casos y expresando Bcl-2 el 50%.

Los germinales se presentaron totalmente en el sexo masculino, expresando BCL-2 en el 71% y la resección total y parcial se llevó a cabo en el 29% respectivamente

Existió diferencia en las medianas de expresión celular de Bcl-2 entre los tumores, con una diferencia estadísticamente a favor del meduloblastoma, valor de $p=0.05$. Ver gráfico 1.

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 pediátrica⁶². 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)⁴ , 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 cánceres⁶³. 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 exclusivamente tumores con diseminación al neuroeje, nosotros 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 OMS⁶.

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^{4,52}.

Allen propuso una escala de severidad en dos variedades pronosticas⁶⁴: riesgo promedio y alto. Nosotros encontramos que momento del diagnóstico el 83% se clasificaron como de alto grado, debido a que muchos de ellos son de fosa posterior, en niños menores





de 3 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 mencionada⁶.

El tratamiento quirúrgico es la piedra angular en estas neoplasias⁶⁵, se considera exitosa a la extirpación de más del 80%, nuestros pacientes recibieron este beneficio en apenas el 55% 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.

Tomando en cuenta que los 57 casos presentaron infiltración a SNC, la determinación del Bcl-2 mediante la citometría de flujo fue en el 52% de los casos.

Como previamente se ha mencionado, el Bcl-2 se ha encontrado en distintos tipos de neoplasias con un rol francamente determinado como en linfomas⁶⁶, cáncer de mama⁶⁷, próstata⁶⁸ y estómago donde se ha confirmado su asociación con menor sobrevivida.

En el caso de los tumores de SNC, Lopez-Aguilar JE⁴⁵ 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 tratamiento⁶. 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 interacciones⁶⁹.

Los niveles de expresión de Bcl-2 en los meduloblastoma son estadísticamente mayores ($p=0.05$), y una tendencia en los tumores germinales ($p=0.07$). Si bien no encontramos referencias bibliográficas que refirieran la expresión de Bcl-2 medido por citometría de flujo para comparar este comportamiento biológico del tumor, la asociación entre meduloblastomas ya había sido previamente descrita⁷⁰ y en tumores germinales que no se presentaban en SNC⁷¹.

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-2⁷².

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 proteína⁷³; 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.

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 apoptosis⁷⁴.

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 apoptosoma⁷⁵.

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

- 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.

Conclusiones





- El tumor más frecuentemente encontrado que presenta celularidad positiva es el meduloblastoma
- El Bcl-2 se expresó más frecuentemente en los tumores germinales de SNC
- El Bcl-2 se expresó con mayor intensidad en los meduloblastomas.
- La presentación etaria de los tumores es igual a la reportada en la literatura.

Anexos

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

Variable		Numero de pacientes (%) / mediana (min-max)
Sexo	Hombre	35 (61%)
	Mujer	22 (39%)
Edad al momento del diagnóstico (meses)		120 (15-198)
Tipo de tumor	Meduloblastoma	24 (42%)
	Ependimoma	20 (35%)
	Pinealoblastoma	6 (11%)
	Germinal	7 (12%)
Grado histológico	Bajo grado	10(17%)
	Alto grado	47(83%)
Tratamiento quirúrgico	Total	32(55%)
	Parcial	16(30%)
	Biopsia	9(15%)
Sitio de localización	Supratentoriales	15 (26%)
	Infratentoriales	36(63%)
	Región pineal	6(11%)
Resección total (sí)		23 (40%)
BCL-2 (positivo)		30 (52%)





Gráfica 1: expresión de Bcl-2 en LCR en citometria de flujo en cuatro tipo de tumores

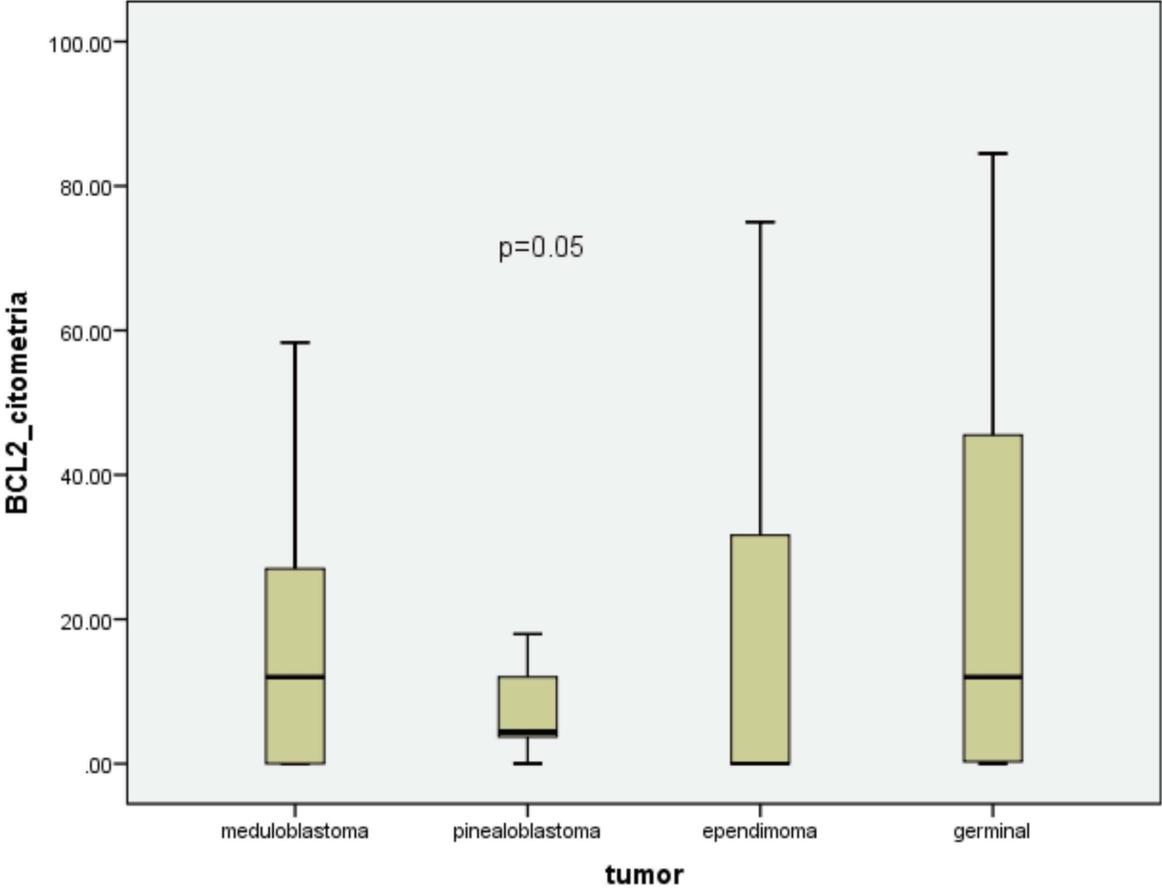


Tabla 2 : Presentación por tumor meduloblastomas , ependimomas, pineablastomas y germinales que se diseminan a neuroeje.

Variable	Número de pacientes (%)/ mediana (limites intercuartílicos)	
Meduloblastomas		
Sexo		
	Hombre	18 (75%)
	Mujer	6 (25%)
Edad		114(38-198)
Bcl-2 positivo		13(54%)
Bcl-2 (%)		12 (0-87)
Tratamiento quirúrgico		
	Total	15 (62%)
	Parcial	7 (30%)
	biopsia	1 (8%)
Ependimoma		
Sexo		
	Hombre	8 (40%)
	Mujer	12(60%)
Edad		99 (15-192)
Bcl-2 positivo		9(45%)
Bcl2 (%)		2(0-13)
Tratamiento quirúrgico*¥		
	Total	7 (39%)
	Parcial	2 (39%)
	biopsia	4 (22%)
Pinealoblastomas		
Sexo		
	Hombre	2 (33%)
	Mujer	4 (67%)





Edad		132(19-174)
Bcl-2 positivo		3(50%)
Bcl-2(%)		4.4(2-13)
Tratamiento quirúrgico*‡	Total	4(80%)
	Parcial biopsia	1 (20%)
Germinales		
Sexo	Hombre	7(100%)
	Mujer	
Edad		144(84-185)
Bcl-2 positivo		5(71%)
Bcl-2(%)		12(0-70)
Tratamiento quirúrgico*‡	Total	2(29%)
	Parcial biopsia	2(29%) 3(42%)





Carta de consentimiento informado

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE PEDIATRIA
SERVICIO DE ONCOLOGIA

Consentimiento informado para la realización de punción lumbar y aplicación de quimioterapia intratecal.

Nombre del paciente _____ Edad _____ -

No de afiliación _____

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

Yo _____ padre () madre () tutor () del menor AUTORIZO al personal médico del hospital de Pediatría para la realización del procedimiento como método diagnóstico y de seguimiento para su análisis citológico y para la realización de estudios por citometría de flujo, así como la para la aplicación de quimioterapia intratecal como parte del tratamiento.

RIESGOS: Estoy enterado (a) de que al realizar el procedimiento existen riesgos de sangrado y/o infección en el sitio de la realización y que puede extenderse a sistema nervioso. En caso necesario el paciente será sedado.

Estoy enterado (a) de la garantía y seguridad del procedimiento y que los riesgos potenciales son derivados del mismo y del tipo de la enfermedad de mi paciente.

CONSENTIMIENTO DEL PADRE O TUTOR: He leído y entendido este formato de consentimiento y comprendo que no debo de firmar si todos los párrafos y todas mis dudas han sido explicadas o contestadas a mi entera satisfacción o si no entiende la palabras contenidas en este documento.

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

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

Nombre y Firma del testigo

Nombre y firma del padre/madre o tutor

Nombre y firma del testigo

Fecha Hora

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





Nombre y firma del médico

Fecha

Hora





UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN TUMORES DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional Siglo XXI.

NOMBRE DEL ESTUDIO: *Asociación de la expresión de BCL-2 en Líquido Cefalorraquídeo mediante citometría de flujo como predictor de recaída en tumores de sistema nervioso central que se diseminan a neuroeje en pacientes pediátricos.*

NOMBRE DE LA PERSONA A CARGO DEL ESTUDIO DE INVESTIGACION (MEDICO DEL ESTUDIO O INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Enrique López Aguilar
NUMEROS TELEFONICOS 56276900 EXT 2252

Nombre del
Paciente: _____

Por medio de este documento se le invita a usted, que es padre, madre o tutor responsable de un paciente pediátrico con un tumor en sistema nervioso central, a participar en la realización de un protocolo de investigación.

El Objetivo principal es determinar la relación que existe entre el BCL-2 (una proteína que expresan todas las células del cuerpo y que se encuentra alterada en las células tumorales permitiendo que estas no se mueran y se reproduzcan descontroladamente) y la posibilidad de que existan recaídas de los tumores a pesar del tratamiento.

¿Cuál será su intervención?

Como parte del tratamiento su hijo requiere aplicación de quimioterapia en el espacio intratecal, que es una cavidad que se forma por las membranas que cubren el cerebro, en este lugar se produce y corre el líquido cefalorraquídeo. Existen tumores del sistema nervioso central que liberan células cancerígenas a este líquido, razón por la cual se aplican medicamentos en este sitio.

La punción lumbar se realiza en la parte baja de la espalda, se aplica previamente anestésico y se limpia la zona. **Si usted acepta**, durante el procedimiento se toma una muestra de este líquido, aproximadamente 2 o 3 centímetros y se envía al laboratorio de tumores de sistema nervioso central de este Hospital con el fin de determinar la presencia del BCL-2.

Las posibles complicaciones: dolor o sangrado en el sitio de la punción,





ocasionalmente dolor de cabeza.

Beneficios: se trata de un procedimiento que se realiza como parte del tratamiento de la enfermedad de su hijo, la diferencia es que usted contribuye con una muestra del líquido cefalorraquídeo con fines de investigación.

¿Qué sucederá con la información?

Desde el momento en que usted acepte la entrada de su hijo como participante de la Investigación, se salvaguardará la confidencialidad de los datos, esto es, se conocerán los resultados y el desenlace pero no se sabrá de quién. La identidad de su paciente se manejará con un número y únicamente conocerá de quién se trata el investigador principal y el cuerpo de investigadores asociados, los cuales laboran en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI y colaboran en el tratamiento de su hijo.

Si usted así lo desea, tiene total derecho de solicitar los resultados que conciernen en a su hijo y pedir que se le explique en relación a ellos.

La aportación de la muestra y la de otros pacientes, ayudará para que el cuerpo de investigadores pueda determinar el objetivo antes explicado. Esto podrá beneficiar a otros pacientes, incluso a su hijo en momentos posteriores. De tratarse de una información relevante, el departamento de Oncología realizará público este hallazgo en órganos médicos, conocidos como revistas médicas

que proveen información actualizada a todos los médicos del mundo. La identidad de su hijo SIEMPRE será guardada.

¿Qué sucederá si no acepto?

El tratamiento de su hijo continuará tal cual está planeado y no se tomará la muestra solicitada con fines de investigación. No se interrumpirá el tratamiento y los estudios agregados que puedan solicitarse. Y de ninguna manera se le discriminará o se le negará información o tratamiento.

PAGO POR SU PARTICIPACION EN EL ESTUDIO

- Usted **NO** recibirá pago alguno por participar en este estudio.

De estar de acuerdo con la información recibida, y de no existir NINGUNA duda respecto a la investigación a la cual se le invita, usted firmará acepta:

- Utilización del líquido cefalorraquídeo obtenido por punción lumbar para fines de investigación.
- Utilización de datos relacionados con el padecimiento de su paciente de forma anónima para enriquecimiento del protocolo.
- Utilización de los resultados con el fin de publicación en revistas médicas.

Una vez que haya tenido todas sus preguntas contestadas y que se sienta seguro con su participación en este estudio, firme por favor aquí abajo.

Nombre del padre, madre o tutor.





Firma del paciente en caso de ser mayor de 7 años fecha y hora

Doy fe de que el/ la participante y/o su representante legal autorizado (nombrado arriba) tuvo suficiente tiempo para considerar esta información, tuvo una oportunidad para hacer preguntas, y voluntariamente convino en participar en este estudio.

Dr. Enrique López Aguilar Investigador Principal

Firma del médico que explica el consentimiento fecha y hora





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 lisis 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 FACSSlow (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 citoplasma⁷⁶.



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.
- ³CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of United States). 2010. Statical 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-Aranguré 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 medulloblastomas 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, Pozuoli R, Gambacorta M, Rossi G, Burger PC .** “Desmoplastic” versus “classic” medulloblastoma: comparison of DNA content, histopathology and differentiation. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 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 Clin Oncol.* 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, Iwate 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. *SurvOphthalmol.* 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 NeuropatholExpNeurol.*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.*PerspectPediatrPathol* .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 tumores germinales y otros de la región pineal.*Neurocirugía* 2003;14:127-139.
- ⁴¹**Lomanto-Díaz L, Ortiz-Cala OL, Bretón-Pinto CO, Gómez-Lizcano AI, Mesa-Cornejo VM.** El ciclo celular. *MedUNAB.*2003;16(6):21-29.
- ⁴¹**Alberts, Bruce;** Johnson Alexander; Lewis;Raff, Martin, Roberts, Keith. *Molecular Biology of the Cell.* 4 edición. Garland Science, 2002.





- ⁴³ **Deigner HP, Kinscherf R.** Modulating apoptosis: current applications and prospects for future drug development. *Curr Med Chem* 1999;6:399-414.
- ⁴⁴ **Thompson CB.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment diseases. *Science*.1995 267:456-462
- ⁴⁵ **Jordan J.** Apoptosis, muerte celular programada. *OFFARM*.2003: 22(6):100-105.
- ⁴⁶ **Reed JC.** Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:111-21.
- ⁴⁷ **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.
- ⁴⁸ **Ikegaki N, Katsumata M, Minna J, Tsujimoto Y.** Expression of BCL-2 in small lung carcinoma cells. *Cancer res*.1994;54:6-8.
- ⁴⁹ **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.
- ⁵⁰ **Hardwick, JM and Soane, L.** Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a008722
- ⁵¹ **Shamas-Din A, Brahmabhatt H, Leber B, Andrews DW.** BH3-only proteins: orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2011; 1813: 508–520.
- ⁵² **Basanez G, Hardwick JM.** Unravelling the bcl-2 apoptosis code with a simple model system. *PLoS Biol*.2008; 6: e154.
- ⁵³ **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
- ⁵⁴ **Elinos-Báez CM, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J.** Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac Méd Méx*.2003;139 (5):493-499.
- ⁵⁵ **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.
- ⁵⁶ **López – Aguilar E, Rioscovian-Soto AP, Sepúlveda-Vildósola AC, Siordia G, Figueroa-Rosas L, Cruz-Yañez H.** Sobreexpresión BCL-2 como factor pronóstico en niños con astrocitomas. *GAMO*.2011;10(1):15-20.
- ⁵⁷ **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.
- ⁵⁸ **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
- ⁵⁹ **Kerr JF.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239
- ⁶⁰ **Prophet E, Mills B, Arrington J.** Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerza Armadas de EUA, 1994: 31-32.
- ⁶¹ **López-Aguilar E, Sepúlveda-Vildósola A.C, Galvan-Luna S.** Detección de enfermedad residual minina en tumores de sistema nervioso central mediante citometria de flujo. 2011, 15-20
- ⁶² **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.
- ⁶³ **Fajardo-Gutierrez A, Rendón-Macías ME, Mejía-Aranguré JM.** Epidemiología del cáncer en niños mexicanos. Resultados Globales. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*.2011;49(supl 1):S43-70
- ⁶⁴ **Rivera-Luna R, Niembro-Zuñiga AM, Zarco A, Marhx-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.





- ⁶⁵ **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 childrens cancer group 921 randomized phase II study. *J Clin Oncol.* 1999;17:832-45
- ⁶⁶ **Battifora H.** Immunohistochemistry in tumour prognosis. In immunohistochemistry long course, nice, 1998:18-23.
- ⁶⁷ **Moore T.** Expression of CD34 and Bcl-2 in phyllodes tumours, fibroadenomas and spindle cell lesion of breast. *Histopathology.* 2001;38:62-7
- ⁶⁸ **Kume T, Oshima K, Shinohara T, Takeo H, Yamishita T, Kikuchi M.** Low rate of apoptosis and overexpression of Bcl-2 in Epstein Barr virus associated gastric carcinoma. *Histopathology.* 1999;34:502-9
- ⁶⁹ **Konstantinidou AE, Korkolopoulou P, Pastouris E.** Apoptotic markers for primary brain tumor prognosis. *J Neurooncol.* 2005;72(2):151-6
- ⁷⁰ **Schuller U, Schiber F, Kretzschmar HA, Herms J.** Bcl-2 expression inversely correlates with tumor cell differentiation in medulloblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2004;30(5):513-21.
- ⁷¹ **Liu, Y.-J., Mason, D. Y., Johnson, G. D., Abbot, S., Gregory, C. D., Hardie, D. L., Gordon, J. MacLennan, I. C. M.** Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 1991; 21: 1905-10.
- ⁷² **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
- ⁷³ **Wang F, Bhat K, Doucette M, Zhou S, Gu Y, Law B, et al.** Docosahexaenoic acid (DHA) sensitizes brain tumor cells to etoposide-induced apoptosis. *Curr Mol Med.* 2011;11(6):503-11.
- ⁷⁴ **Dai Y, Grant S.** Targeting multiple arms of the apoptotic regulatory machinery. *Cancer Res.* 2007;67:2908-15
- ⁷⁵ **Kaelin JR.** The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2006;5:686-79.
- ⁷⁶ Prophet E, Mills B, Arrington J. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de España, 1994: 31-32.

