

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
División de Estudios de Posgrado e Investigación.**

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA  
MANUEL VELASCO SUÁREZ**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE NIVELES SERICOS DE  
MARCADORES INFLAMATORIOS (IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-  
12) ENTRE PACIENTES CON GLIOMA DE ALTO GRADO SIN  
TRATAMIENTO ESPECIFICO Y EN SUJETOS SANOS.**

**PRESENTA:  
Dr. Vladimir Figueroa Angel**

**NEUROCIRUGIA**

**TUTOR: DR. SERGIO MORENO JNC**

**2010**



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.

Dr. Ricardo Colín Piana  
Director de Enseñanza

Dr. Sergio Gómez Llata  
Profesor Titular del Curso

Dr. Sergio Moreno Jiménez  
Tutor de Tesis

- A lo que permite que esto suceda....desde el movimiento de un electrón hasta la existencia del sol.
- Para ustedes Papa y Mama por el amor y apoyo incondicional, por sus ejemplos y enseñanzas, los amo.
- Para ti hermano que hemos compartido la dualidad de la vida, momentos de gloria y pena, pero que siempre has estado ahí, un ejemplo a seguir....hasta la victoria siempre.... Ta
- Familia, abuelos estarán en mi pensamiento y corazón por siempre, tíos y primos que hemos apostado por la familia.
- Princesa, gracias por el apoyo en todo momento y por aceptar ser testigo de mi vida. Ta
- A mis Maestros por su dedicación hacia mí, por creer que la transmisión de conocimiento engrandece a la humanidad.
- Amigos, por que los momentos más gratos, felices, emocionantes, alegres, tristes, penosos, vergonzosos no han sido únicamente míos o de ustedes, si no de nosotros.

## INDICE

- 1) RESUMEN
- 2) INTRODUCCION
- 3) ANTECEDENTES
- 4) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
- 5) HIPOTESIS
- 6) OBJETIVO
- 7) JUSTIFICACION
- 8) METODOLOGIA
- 9) CONSIDERACIONES ETICAS
- 10) RESULTADOS
- 11) DISCUSION
- 12) CONCLUSION

## 13) APENDICE: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

### 1) RESUMEN

Los tumores primarios más frecuentes del SNC son los gliomas de alto grado, su tratamiento convencional consiste en resección quirúrgica amplia, quimioterapia y radioterapia adyuvantes, sin embargo la recidiva es la regla. Existen marcadores inflamatorios séricos, como las citocinas, que apoyan la presencia de procesos inflamatorios en el SNC como un tumor. La medición de citocinas se ha realizado en LCR, líneas celulares, tejido tumoral, mediante inmunohistoquímica y PCR, para la medición sérica se ha realizado a través de ELISA. El objetivo de este estudio es comparar los niveles séricos de citocinas IL-1 beta, TNF-alfa, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 entre pacientes con gliomas de alto grado sin tratamiento y en sujetos sanos. Estudio piloto, comparativo entre 6 pacientes con diagnóstico de glioma de alto grado sin tratamiento específico y 7 sujetos sanos, los cuales son similares en edad, sexo e IMC. Se realizó toma de muestra sanguínea para comparar la expresión sérica de TNF alfa, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12. Resultados: Los grupos fueron similares en edad, sexo e IMC, el diagnóstico de los pacientes fue de GBM en 3 y de AA en 3, La expresión sérica de IL-6 fue menor en el grupo de pacientes que en el grupo de sujetos sanos,  $P = 0.31$ . La medición de las demás citocinas (TNF alfa, IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) fue mayor en el grupo de pacientes que en el grupo de sujetos sanos, con mayor

tendencia significativa para IL-10 P 0.20 e IL-12 P 0.27. Discusión: La mayor expresión de IL-10 (anti inflamatoria) en el grupo de pacientes apoya la teoría de que la expresión aumentada de citocinas anti inflamatorias lleva a evasión del sistema inmune con ello proliferación y migración tumoral. Otros autores además confirman aumento de citocinas pro inflamatorias que apoyan la presencia del proceso inflamatorio tumoral aunque sin un efecto anti tumor efectivo, en este estudio se encontraron elevadas la expresión de citocinas pro inflamatorias (TNF alfa, IL-1 beta, IL-8, IL-12) en el grupo de pacientes con respecto al grupo de sujetos sanos. Sin embargo se encontró que la expresión de IL-6 (pro inflamatoria) fue menor en el grupo de pacientes que en el grupo de sujetos sanos, esto junto con la expresión de citocinas anti inflamatorias (IL-10) y otras pro inflamatorias (TNF alfa, IL-1 beta, IL-8, IL-10, IL-12) podría corresponder a la desregulación de estas por el mismo proceso tumoral que resulta en aumento de los dos tipos de citocinas, anti inflamatoria que genera la proliferación tumoral, angiogénesis tumoral y cierta protección inmunitaria y por otro lado pro inflamatoria por presencia del mismo proceso tumoral aunque con función no efectiva anti tumoral ya sea por dominio del efecto anti inflamatorio o por disminución de algunas de ellas, como en este estudio que se encontró menor expresión de IL- 6. Conclusiones: La expresión sérica de citocinas TNF alfa, IL-1 beta, IL-8 y IL-12 (pro inflamatorias) e IL-10 (anti inflamatoria) fue mayor en el grupo de pacientes con glioma de alto grado que en el grupo de sujetos sanos, siendo IL-10 e IL-12 las de mayor significancia. La expresión sérica de IL-6 (pro inflamatoria) fue menor en el grupo de pacientes con glioma de alto grado que en el grupo de sujetos sanos.

## **2) INTRODUCCION**

Entre los tumores cerebrales primarios del sistema nervioso central, los gliomas de alto grado son los más frecuentes y con peor pronóstico. Su tratamiento convencional consiste en resección quirúrgica amplia, quimioterapia y radioterapia adyuvantes. No obstante la recurrencia tumoral es la regla. Existen marcadores séricos que apoyan la presencia de procesos inflamatorios activos en el cerebro, secundarios a la presencia de un tumor, tales como las interleucinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Otros estudios sobre citocinas se han enfocado a medir receptores y expresión génica en sangre, muestras de resecciones quirúrgicas, líneas celulares tumorales y directamente en líquido cefalorraquídeo, sin embargo no hay un estudio que compare niveles de citocinas séricas inflamatorias y antiinflamatorias de sujetos sanos y pacientes con gliomas de alto grado sin tratamiento específico basales.

El objetivo de este estudio es comparar los niveles de las citocinas IL-1 beta, TNF-alfa, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 entre sujetos sanos y pacientes con glioma de alto grado sin tratamiento previo ya sea quirúrgico, inmuno-modulador, radioterapia o quimioterapia.



### **3) ANTECEDENTES**

Los tumores cerebrales figuran entre las primeras causas de muerte en los adultos (Deorah, y col., 2006; Chakrabarti, y col., 2005; Mendoza, Cabalé y Fernández, 2004; Wrensch, y col., 2002) y son los tumores más frecuentes en adolescentes de 15 a 19 años (Cuevas, Villasís y Fajardo, 2003). El 80% de este tipo de tumores son oligodendrogliomas y astrocitomas, de grado variable de malignidad. El glioma más frecuente y maligno es el glioblastoma multiforme (GBM) o astrocitoma grado IV (Wrensch, y col., 2002; Ohgaki, y col., 2004; Wrensch, y col., 2005; Ohgaki y Kleihues, 2005; Schwartzbaum, y col., 2006), cuyo pronóstico a corto plazo sigue siendo malo a pesar de los avances tecnológicos utilizados para su diagnóstico y tratamiento (Wara, 1985; Kowalczyk, y col., 1997; Pérez Ortiz, y col., 2001; Muñoz Carmona, y col., 2005). No obstante, algunos factores asociados a supervivencia elevada en los pacientes con GBM son: edad menor a 40 años, índice de Karnofsky mayor a 70% y la combinación terapéutica de radio- y quimioterapia (Hou, y col., 2006).

Existen marcadores séricos que apoyan la presencia de procesos inflamatorios activos en el cerebro, secundarios a la presencia de un tumor, tales como las interleucinas proinflamatorias y antiinflamatorias (IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12).

Las citocinas son proteínas, en general producidas por linfocitos aunque otros tipos celulares pueden producirlas, modulan la actividad funcional de células y tejidos en condiciones fisiológicas y patológicas, estas moléculas sirven como señales de comunicación entre distintos tipos de leucocitos, (William E. Paul, immunology 1985, Carpenter inmunología y serología , 1895) numerándose correlativamente a medida que se descubrían (IL-1, etc.), algunas de ellas se detectaron inicialmente en ensayos funcionales *in vitro* y aún conservan su denominación original de acuerdo con la función biológica que permitió su identificación, como es el caso del TNF (factor de necrosis tumoral) y el TGF (factor transformador de tejidos). Dentro de las características de las citocinas, se encuentran que están estrictamente reguladas y para su función en necesaria activación celular.

Tienen Pleiotropismo: efectos biológicos diferentes al actuar sobre distintos tipos celulares y Redundancia, es decir, que varias citocinas pueden contribuir al desarrollo de la misma función en un determinado tipo celular por lo que pueden ser reemplazadas parcialmente. Dentro de sus funciones actúan en el sistema inmune, embriogénesis, sistemas neuroendocrinológicos, neuroinmunes, mitosis, diferenciación, migración, apoptosis y transformación, estas se pueden medir en sangre por medio de ELISA o RT-PCR. Su clasificación puede variar de acuerdo a su conformación de aminoácidos o de acuerdo a su papel en el sistema inmune, es decir en el balance final de los efectos en el sistema inmune por lo tanto encontramos Antiinflamatorias( tipo Th2 inmunosupresor ): IL-4, IL-9,IL-13 e IL-10, TGF-beta e interferones tipo I (alfa y beta) y proinflamatoria (tipo Th1 probable efecto antitumor): IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-12, IL-15, linfoxina (LT), TNF-alfa y

IFN-gamma. (Hunter et al 2005, Smith PL 2005, Aguzzi a 2005), Athanasios Zisakis et al. (Cytokine 2007)

**IL-1.** Es producida fundamentalmente por monocitos y macrófagos, pero también por células dendríticas, endoteliales, NK y otros tipos celulares como células astrocíticas tumorales (Brain Tumor Pathology, Sasaki et al 2001). Existen dos formas, IL-1alfa e IL-1beta que, aunque solamente tienen un 25 % de homología en su secuencia aminoacídica, comparten el mismo receptor y ejercen efectos biológicos similares. Parte de sus efectos proinflamatorios se debe a que induce la liberación de histamina en los mastocitos, generando vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular en el lugar de la inflamación. Es el principal pirógeno endógeno, induciendo fiebre a través de la producción de prostaglandinas. También promueve la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos y actúa sobre el SNC induciendo sueño y anorexia, típicamente asociados con los procesos infecciosos, además se ha observado que puede estimular la proliferación celular e inducir expresión de otras citocinas como IL-6 e IL-8.

**TNF.** Los factores de necrosis tumoral fueron descritos inicialmente por su capacidad de causar necrosis en algunos tumores en animales y humanos. Posteriormente, sin embargo, ganaron protagonismo por las numerosas funciones que ejercen sobre las respuestas inmunes. Se han descrito dos moléculas estrechamente relacionadas, el TNF-alfa y el TNF-beta, con elevada homología en su secuencia aminoacídica. El TNF-alfa (caquectina) con efecto pleiotropico, es producido fundamentalmente por monocitos y macrófagos en respuesta a antígenos bacterianos, tales como el LPS, siendo esta citocina el principal

responsable del shock séptico asociado a bacteriemias. También puede ser producido por linfocitos T y B, NK, fibroblastos y mastocitos, teniendo efecto en las células vasculares endoteliales, en la mitogénesis de fibroblastos, tejido hematopoyéticos, adipocitos, hepatocitos, reabsorción ósea y de cartílago, activación de linfocitos T y B, expresión de IL-1, IL-6, GM-CSF, EGF, c-myc, c-fos e IL-1. Junto con la IL-1 está implicado en los procesos inflamatorios derivados de los procesos infecciosos, elevando la temperatura corporal y produciendo caquexia y sueño al actuar sobre el SNC. Por otra parte, induce la expresión de moléculas de adhesión y estimula la producción de IL-8 por células del endotelio vascular, lo que contribuye a la extravasación de linfocitos, neutrófilos y monocitos, es uno de los principales mediadores en los desordenes neuronales en los recientes estudios, puede inducir la expresión de antígenos clase II en menor medida clase I en los astrocitos (Nitta et al Cytokine 1994), produce directamente sobre oligodendrocitos en la lisis de mielina El TNF-beta, o linfoxina, es producido exclusivamente por linfocitos T activados, aunque se une a los mismos receptores que el TNF-alfa e induce funciones similares.

**IL-6:** Es producida fundamentalmente por monocitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T y células del estroma de la médula ósea. Junto con la IL-1 es la principal inductora de la síntesis de proteínas de fase aguda, sobre todo de fibrinógeno. Además de su efecto en la inflamación, se ha observado que promueve la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas, induciendo la producción de inmunoglobulinas. También puede aumentar la producción de IL-2 y el desarrollo de los precursores hematopoyéticos dependientes de la IL-3 (Michele Quaranta et al, Tumori 2007)

**IL-8:** La más representativa de las quimocinas, inicialmente conocida como quimiotáctico de leucocitos, es ahora también conocida por tener propiedades angiogénicas y tumorigénicas, en gliomas humanos es expresada en alto nivel tanto *in vivo* como *in vitro* y se sugiere que es un factor crítico para la neovascularización y progresión de tumores gliales, se relaciona con la malignidad del tumor, mientras mayor expresión, mayor malignidad tumoral glial, su expresión estimula además la de IL-1, FNT alfa, IL-6 INF gamma, la hipoxia o anoxia así como las señales celulares para apoptosis pueden estimular su expresión, por otro lado la dexametasona, IL-4 e IL-10 pueden inhibir su expresión. (Daniel J Brat Neuro-oncology. 2005)

**IL-10:** Es producida por linfocitos del tipo Th2, así como también por monocitos/macrófagos, linfocitos B, queratinocitos y otros varios tipos celulares. Es la citocina inmunosupresora por excelencia, inhibiendo la síntesis de muchas otras citocinas, entre las que podemos citar IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2, IL-12, y la expresión de MHC-II y moléculas de adhesión en monocitos. También tiene efectos antiproliferativos sobre muchos tipos celulares. La IL-10 ejerce además múltiples actividades inmunomoduladoras. Se ha visto que es un cofactor para el crecimiento de líneas y colonias de células mastocíticas *in vitro*. Regula las funciones mediadas por linfocitos B induciendo la síntesis de IgG, y por linfocitos T, influyendo en el desarrollo de timocitos y células T. También ejerce efectos reguladores sobre la angiogénesis. El virus de Epstein Barr secreta una proteína que posee una gran homología estructural con la IL-10 humana (vIL-10), y que tras unirse con baja afinidad al propio receptor de la IL-10, ejecuta actividades biológicas similares. Relacionadas estructural y funcionalmente con la IL-10 se han descrito

recientemente nuevas moléculas tales como la IL-19, IL-20 e IL-22, cuyas funciones son todavía poco conocidas (Brain Tumor Pathology, Sasaki et al 2001).

**IL-12:** Es producida mayoritariamente por monocitos/macrófagos, aunque su producción puede ser también inducida en células dendríticas y linfocitos B. Inicialmente se describió como el factor estimulador de las células asesinas naturales (NK), pero la actual importancia de esta citocina deriva de su capacidad de dirigir la diferenciación de los linfocitos Th hacia células efectoras tipo Th1 de la hipersensibilidad retardada. La forma madura de esta molécula (p75) está compuesta de dos subunidades, p35 y p40. La síntesis de ambas subunidades está regulada diferencialmente, siendo ambas necesarias para la actividad funcional del heterodímero. Esta citocina incrementa la actividad citotóxica de las células NK e induce células LAK (linfocitos asesinos activados por linfocinas). por linfocitos T y células NK y activa Incrementa la producción de IFN- linfocitos T citotóxicos. Recientemente se ha descrito un factor proteico denominado p19, sin actividad biológica por sí mismo, que se combina con la subunidad p40 de la IL-12 para dar lugar a una nueva citocina biológicamente activa denominada IL-23. Esta citocina es producida por células dendríticas activadas, se une al receptor de la IL-12 y comparte algunas de las funciones biológicas con ella (Michele Quaranta et al, Tumori 2007)

Todas la citocinas que tienen efecto en el SNC pueden tener 2 orígenes: de algún órgano inmune periférico y que cruza la barrera hematoencefálica y las

producidas por células neuronales en SNC. Athanasios Zisakis et al. (Cytokine 2007)

Los niveles circulantes de citocinas son en su mayoría dados por células del sistema inmune, sin embargo otros tejidos como musculo liso, endotelio, fibroblastos, adipocitos pueden contribuir a los niveles (Hiscock et al., 2004; Keller et al., 2005; Kern et al., 2001) La medición de citocinas se ha realizado en LCR, líneas celulares, tejido tumoral, mediante inmunohistoquímica y PCR, para la medición sérica se ha realizado a través de ELISA con captura primaria de anticuerpos, anticuerpos secundarios y proteínas estándar recombinantes humanas para cada citocina (Maria Eugenia Hernandez et al., 2008)

Gran variedad de citocinas son expresadas por el SNC, particularmente en gliomas y se cree que pueden estar involucradas en la proliferación del tumor, angiogénesis y evasión del sistema inmune. A este respecto probablemente estén involucradas la expresión de citocinas antiinflamatorias como IL-10, IL-6 (coexpresada por IL-10 e involucrada en estimulación de crecimiento tumoral), TGF-beta y prostaglandina E2 que se ha asociado a supresión humoral y celular en pacientes con gliomas y con ello la evasión inmune por inhibición de la presentación de antígeno y de la proliferación de células T antígeno-específico así como inadecuada función de células T1 y con ello permitir la proliferación y migración tumoral. Michele Quaranta et al ( Tumori 2007).

Esto lo muestran en el trabajo de Claudia Huettner et al ( American Journal Pathology 1995) donde encontraron aumento de expresión RNA de IL-10 e IL-6

mediante PCR de muestras obtenidas de cirugía de gliomas de alto grado, cultivos de células tumorales no así en tejido cerebral aparentemente normal. Otro estudio de Claudia Huettner et al (Anticancer Research 1997) demuestra no solo el aumento de expresión de IL-10 sérico en pacientes con glioma de alto grado sino también en muestras de tumor humano, en cultivos de células tumorales en todos los gliomas y significativamente mayor en gliomas de alto grado, además el efecto in vitro que tiene IL-10 para producir aceleración en la proliferación y migración tumoral. Se ha observado que los Glioblastomas parecen expresar Th2 con efecto inmunosupresor como ya anteriormente se menciona por otros autores.

Algunos autores Athanasios Zisakis et al. (Cytokine 2007) proponen una desregulación entre citocinas pro y antiinflamatorias, por lo que se realiza una secreción simultánea de Th1 (proinflamatorio) y Th2 ((inmunosupresivo) Athanasios Zisakis et al ( Cytokine 2007) , como se observo el estudio de este autor donde analiza la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias, tanto de sangre para obtener células periféricas mononucleares y células tumorales originadas de resecciones o biopsias de pacientes con diagnostico de Glioma de alto grado, que se cultivaron in vitro, mediante ELI-SPOT, como resultados se obtuvo una disminución significativa de secreción de IFN gamma y TNF-alfa, en pacientes con gliomas de alto grado comparado con sanos, en las células mononucleares de sangre periférica y en cultivos celulares. Además se observo una secreción elevada significativa de IL-10 en las muestras de los pacientes con glioma de alto grado comparado con los sujetos sanos, IL-4 se comporto de igual manera que IL-10 lo que sugiere influencia de IL-4 sobre IL-10.



El campo de investigación no solo se ha enfocado a la medición de citocinas sino también a la medición de sus receptores encontrándose una expresión elevada en diferentes especímenes, tal como lo muestran el estudio de Michele Quaranta (Tumori 2007) en donde encuentran una expresión significativamente elevada de receptores de EGF-r en suero de pacientes con diagnóstico de glioma de alto grado en comparación con sujetos sanos y además lo correlacionan con la clínica y pronóstico de los pacientes, encontrando peor cuadro clínico y pronóstico cuanto mayor es la expresión de EGF-r. Otro estudio sobre medición de receptor es sobre IL-13 en el trabajo de Debinski (Clinical Reviews in oncogénesis 1998) donde encuentran expresión aumentada de receptor de IL-13 (y su coexpresión de IL-4) en especímenes quirúrgicos de gliomas de alto grado e incluso lo proponen como un blanco para pronóstico y para tratamiento inmunológico.

Otro tipo de medición es sobre la expresión del gen en piezas obtenidas por cirugía, cultivos celulares y en células de tumores trasplantados, como lo muestra el estudio de Sasaki et al (Brain Brain Tumor Pathology, 2001) donde observaron mayor expresión de IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, en los especímenes antes mencionados medidos mediante inmunohistoquímica, PCR y ELISA.

Dentro de los estudios de expresión de genes de citocinas en líneas celulares humanas de gliomas de alto grado está el de Ryuya Yamanaka et al (Journal of Neuro-Oncology 1994) donde se encontró la expresión mediante PCR de las siguientes citocinas IL-1beta, IL-6, IL-8, GM-CSF, TGF-B1, no así en especímenes de tumores de bajo grado que mostraron una expresión muy baja, además encontrándose una respuesta proliferativa tumoral con IL-1B.

Existe otro estudio de Nitta et al (Cytokine 1994), donde investigan la expresión de TNF-alfa y beta en líneas celulares neurogliales humanas en especímenes frescos obtenidos de biopsias , autopsias y en cultivos celulares, usando PCR, encontrando una expresión génica de TNF-alfa en las biopsias de tumores y en lesiones reactivas de la periferia, no así en tejido cerebral normal obtenida de autopsias.

Se han medido también otras citocinas como la proteína inflamatoria del Macrófago 1 (MIP-1) en relación a interleucinas en específico IL-1, IL-8, TNF-alfa, TGF-beta, MCP-1, en el estudio de Nobuaki Ishii et al. ( Journal Neuro-Oncology 1998) donde se observa la expresión de MIP-1 en tejido tumoral mediante PCR y en LCR mediante ELISA.

#### **4) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Cuál es la diferencia en los niveles séricos de las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias IL-1 beta, TNF-alfa, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 entre los pacientes con gliomas de alta grado sin tratamiento y en sujetos sanos.

#### **5) HÍPOTESIS**

Los niveles séricos de IL-1 beta, TNF-alfa, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 serán mayores en pacientes con glioma de alto grado sin tratamiento específicos que en sujetos sanos.

#### **6) OBJETIVOS**

Comparar los niveles séricos de citocinas IL-1 beta, TNF-alfa, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 entre pacientes con gliomas de alto grado sin tratamiento y en sujetos sanos.

## **7) JUSTIFICACIÓN**

Se ha destacado de manera importante el rol del sistema inmune en la fisiopatogenia de los tumores del SNC, mediante la expresión de citocinas, la utilidad que podría tener, terapéutico, pronóstico y diagnóstico en esta patología.

Por lo que en la actualidad existen estudios que han medido citocinas mediante su expresión génica y mediante receptores en muestras séricas, resecciones quirúrgicas, líneas celulares humanas de gliomas, células tumorales trasplantadas y células mononucleares periféricas en pacientes con glioma de alto grado, sin embargo no existe un estudio que compare la medición sérica basal simultánea tanto de las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias IL-1 beta, TNF-alfa, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 y la comparación con sujetos sanos.

Estos marcadores séricos pueden ser útiles para seguimiento, pronóstico y diagnósticos diferenciales en el paciente con otras patologías que no son de índole tumoral de una patología que invariablemente recidiva.

## **8) METODOLOGÍA**

### a) **DISEÑO:**

Estudio piloto, comparativo.

### b) **POBLACIÓN Y MUESTRA**

- 1.- Pacientes y familiares del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía:

Los 6 pacientes se obtuvieron en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía que acudieron ya sea por el servicio de urgencias o de consulta externa con diagnóstico presuntivo de Glioma de alto grado mediante historia clínica y estudios de imagen (TC o IRM) sin tratamiento específico (quirúrgico, radioterapia, quimioterapia e inmunomodulador), se tomó una muestra de sangre de cada uno de estos pacientes previo a tener tratamiento específico, el diagnóstico definitivo se realizó posterior a tratamiento quirúrgico mediante estudio histopatológico por medio del servicio de Patología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Los 7 sujetos sanos se obtuvieron de familiares de pacientes, los cuales se les realizó una historia clínica minuciosa para descartar cualquier enfermedad autoinmune, enfermedades infecciosas o inflamatorias recientes, alergias y sin algún tratamiento farmacológico además de buscar similitud en grupo de edad, sexo

e índice de masa corporal, se tomaron una muestra a cada sujeto sano.

2.- Toma de muestra sanguínea ambos grupos entre las 8:00 y 9:00 am las muestras fueron centrifugadas 272 x g por 15 minutos para obtener suero que fue almacenado a -70 grados C.

3.- Determinación de marcadores séricos de inflamación:

Se realizo la medición de citocinas IL-1 beta, TNF-alfa, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 en suero de ambos grupos.

a) IL-1 beta, TNF-alfa, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12: mediante kits específicos. El ELISA (del inglés “enzyme linked immunosorbent assay) se llevo a cabo mediante el uso de anticuerpos monoclonales que se revelaron con anticuerpos secundarios o acoplados a una enzima que a su vez se hicieron reaccionar con un substrato para evaluar el nivel de interleucinas mediante lectura de DO en el espectrofotómetro, el método se realizo de acuerdo a las instrucciones del fabricante de los kits, que utilizan como anticuerpo de captura un monoclonal específico para TNF alfa humano (61E71) y como segundo anticuerpo, un policlonal de conejo anti-TNF-alfa humano purificado por inmunoafinidad (Hy cult biothecnology b.v., Uden, Holanda). Placas de 96 pozos (Costar, USA) se recubren con el

anticuerpo 61E71 82.5 microg/ml) diluido (1:1000) en buffer fosfato (PBS), por incubación durante 18 h a 4°C en cámara húmeda. Luego se decanta el contenido de las placas y se adicionaron 125 microlitros/pozo de PBS con albúmina de suero bovino (ASB) al 1% y se incuba por 90 min a temperatura ambiente. Al término de esta incubación, se elimina el contenido de las placas y se adicionan las muestras a evaluar, así como la curva patrón de TNF-alfa humano (por ejemp) (10 ng a 25 pg/ml), obtenida por dilución seriada 1:2 en PBS con BSA al 0.1%. Las placas se incuban por 1 hora a temperatura ambiente, se decanta su contenido y se adiciona el anticuerpo policlonal de conejo anti-TNF (ejem) diluido (1:1000) en PBS con ASH al 0.1%. Luego se desecha el contenido de los pozos y se adicionan 100 microl de anticuerpo de carnero antiinmunoglobulina de conejo conjugado a peroxidasa (anticonejo peroxidasa), diluido 1:5000 en PBS con ASB al 0.1%. La placa se incuba por una hora a temperatura ambiente, se decanta su contenido y se lava 5 veces con Tween 20 al 1% en agua destilada y se mantuvo en reposo durante 1 minuto entre cada paso de lavado. La actividad de peroxidasa se determinó por adición de la solución sustrato [dihidrocloruro de 3,3', 3,5' -tetrametilbencidina (Sigma St. Louis, MO)] al 0.01%, peróxido de hidrógeno al 0.025, en solución tampón citrato-fosfato 0.05 M pH 5.5. Transcurridos 15 minutos a temperatura ambiente, deteniendo la reacción por adición de 100 microlitros/pozo de ácido sulfúrico 1 M. La absorción se determinó por espectrofotometría a 450 nm en un

lector de placas (sensident Scan, Merck, Alemania). El mínimo nivel de detección utilizado fue de 25 pg/ml. Los valores inferiores a esta concentración se consideraron indetectables.

c) **CRITERIOS DE SELECCIÓN DEL ESTUDIO:**

• **Criterios de inclusión:**

- Casos:

- a) Dx presuntivo de glioma alto grado.
- b) Sin tratamiento específico (quirúrgico, radioterapia, quimioterapia e inmunomodulador)
- c) Firmen carta de consentimiento informado.

- Controles:

- a) Sujetos sanos, que bajo historia clínica y exploración física no tenga evidencia enfermedades, sin algún tratamiento farmacológico, sin historia de alergias o reacciones alérgicas, tabaquismo menor a 7 cigarros por día, consumidores de café menor a 2 tazas por día y alcohol menos de 3 medidas por semana.
- b) Similitud con los casos en grupo de edad, sexo e índice de masa corporal.
- c) Firmen carta de consentimiento informado.



- **Criterios de exclusión:**

- Casos
  - a) Que no acepten participar en el estudio.
  - b) Que cursen con alguna enfermedad autoinmunitaria concomitante, infecciones recientes, alergias o en tratamiento con algún fármaco.
- Controles:
  - a) Que no acepten participar en el estudio.
  - b) Que cursen con alguna enfermedad autoinmunitaria, tratamiento con algún fármaco, infecciones recientes, historia de alergias o reacciones alérgicas tabaquismo mayor de 7 cigarros por día, consumo de más de 2 tazas de café por día o más de 3 medidas por semanas de alcohol.
  - c) Que no sean comparativos en sexo, grupo de edad e índice de masa corporal.

- **Criterios de eliminación:**

- Diagnostico histológico diferente a glioma alto grado.
- Hemolisis de muestra.

d) **ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Se realizara la comparación de citocinas entre pacientes y sujetos sanos.

## **9) CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Existen definitivamente los conceptos fundamentales de la ética médica en este protocolo de investigación, los sujetos de estudio reciben información completa y conocimiento sobre el estudio, los beneficios y riesgos, a partir de ello tienen y conservan la libertad de participar en el protocolo, siempre manteniendo el interés de los participantes por encima de la investigación y respetando toda garantía como ser humano, sin ninguna presión externa. El protocolo está planeado correctamente, tiene un carácter clínico y benéfico, con riesgo bajo de producir daño, invalidez o muerte, la proporcionalidad riesgo/beneficio favorece al segundo. Todos los investigadores en este protocolo están calificados para realizarlo. Los principios de autonomía, beneficencia y no maleficencia así como justicia se encuentran expresos en el estudio.

## 10) RESULTADOS

Los sujetos estudiados tuvieron una distribución de género de 61.5% femenino (8) y de 38.5% (5) masculino, en el grupo de pacientes fue 50% femenino (3) y 50% masculino (3) y el grupo de sujetos sanos fue de 71.5% femenino (5) y 28.5% (2) masculino, Tabla 1.

Tabla 1

	Sujetos de Estudio	Porcentaje	GBM o AA	Sanos
Femenino	8	61.5	3	5
Masculino	5	38.5	3	2
Total	13	100	6	7

La edad (años) mínima en todos los sujetos de estudio fue de 26, máxima de 65, media de 41.69, desviación estándar (DE) 12.95. Para los pacientes mínima fue de 26, máxima de 65, DE 14.04, media 44.1. Para el grupo de sanos, mínima de 28 y máxima de 62, DE de 12.64, media de 39.45. En cuanto al índice de masa corporal (IMC Kg/m<sup>2</sup>) en todos los sujetos estudiados fue mínima 21.20 y máxima 37.11, media de 26.80 y DE de 5.49, Para los pacientes fue mínima 22.65 y máxima de 37.1, DE 6.24, media de 27.99. Para los sanos IMC mínima 21.20 y máximo de 36.26, media 25.79 y DE 5.02. El diagnóstico de los pacientes fue de GBM en 3 y de AA en 3. Tabla 2

Tabla 2

	n	IMC			Edad		
		Menor	Mayor	Media	Menor	Mayor	Media
Pacientes	6	22.65	37.11	27.99	26	65	44.16
Sanos	7	21.20	36.26	25.79	29	62	39.56
Total	13	21.20	37.11	26.80	26	65	41.69

La expresión de TNF alfa en todos los sujetos de estudio fue de 3.50 a 13.30 (pg./ml), media de 6.35 y DE 2.50, fue mayor en el grupo de pacientes (rango de 3.5 a 13.3 (pg./ml) media de 6.93 y DE 3.46) que el grupo de sujetos sanos (rango de 4.6 a 8 (pg./ml), media de 5.85 y DE 1.40). Mediante prueba de T, se realizo la comparación entre grupos encontrando P: 0.465, intervalo de confianza IC -2.05 a 4.02. Tabla 3-5

Para IL-1 beta en todos los sujetos de estudio se expreso en un rango de 5.60 a 54.70 (pg/ml), media de 12.72 y DE 13.23, fue mayor en el grupo de pacientes (rango de 6.7 a 54.7 (pg/ml), media de 15.95 y DE de 19.09) que en el grupo de sujetos sanos (rango de 5.60 a 18.80 (pg/ml), medida 9.95 y DE 5.18). Mediante prueba de T, se realizo la comparación entre grupos encontrando P: 0.44 e IC -10.45 a 22.44. Tabla 3-5

IL-6 en todos los sujetos de estudio se encontró en un rango de 6.30 a 61.30 (pg/ml), media de 19.50 y DE 16.43, fue mayor para el grupo de sujetos sanos (rango de 6.30 a 61.30 (pg/ml), media de 23.90 y DE 19.74) que en el de pacientes (rango 8.20 a 36.50 (pg/ml), media de 14.38 y DE 11.02). Mediante prueba de T, se realizo la comparación entre grupos encontrando P: 0.318 e IC -29.5 a 10.52. Tabla 3-5

Para IL-8 en todos los sujetos de estudio se expreso en un rango de 6.60 a 276.30 (pg/ml), media 71.73 y DE 96.16, fue mayor en el grupo de pacientes (rango de 7.80 a 267.80 (pg/ml), media de 75.58 y DE 100.89) que en el grupo de sujetos sanos (rango de 6.60 a 276.30 (pg/ml), media de 68.44 y DE 99.93). Mediante prueba de T, se realizo la comparación entre grupos encontrando P: 0.901 e IC -11576 a 130.04. Tabla 3-5

Para IL-10 en todos los sujetos de estudio se encontró en un rango de 5.0 a 27.60 (pg/ml), media de 7.83 y DE 6.00, mayor en el grupo de pacientes (rango de 5.70 a 27.60 (pg/ml), media de 10.18 y DE 8.58) que en el de sujetos sanos (rango de 5.0 a 6.6 (pg/ml), media de 5.82y DE 0.67). Mediante prueba de T, se realizo la comparación entre grupos encontrando P: 0.205 e IC -2.75 a 11.46. Tabla 3-5

IL-12 en todos los sujetos de estudio se expreso en un rango de 4.0 a 38.0(pg/ml), media de 8.45 y DE 8.75, fue mayor para pacientes (rango fue 5.70 a 37.5(pg/ml), media 11.45 y DE 12,76) que en el grupo de sujetos sanos (rango de 4.30 a 6.60(pg/ml), media de 5.87 y DE .80).Mediante prueba de T, se realizo la comparación entre grupos encontrando P: 0.270 e IC -4.98 a 16.14. Tabla 3-5

Tabla 3

	N	Minimo	Máximo	Media	Desv Estándar
GBM o AA					
TNF alfa	6	3.50	13.30	6.93	3.46
IL-1 beta	6	6.70	54.70	15.95	19.09
IL-6	6	8.20	36.50	14.38	11.02
IL-8	6	7.80	267.80	75.58	100.89
IL-10	6	5.70	27.60	10.18	8.58
IL-12	6	5.70	37.50	11.45	12.76
Sanos					
TNF alfa	7	4.60	8	5.85	1.40
IL-1 beta	7	5.60	18.80	9.95	5.18
IL-6	7	6.30	61.30	23.90	19.74
IL-8	7	5.60	276.30	68.44	99.93
IL-10	7	5.00	6.60	5.82	.67
IL-12	7	4.30	6.60	5.87	.80
Total					
TNF alfa	13	3.50	13.30	6.35	2.50
IL-1 beta	13	5.60	54.70	12.72	13.23
IL-6	13	6.30	61.30	19.50	16.43
IL-8	13	6.60	276.30	71.73	96.16
IL-10	13	5.0	27.60	7.83	6.00
IL-12	13	4.00	38.00	8.45	8.75

Tabla 4

Diagnostico	N	Media	Desviación Estándar	Media de error Estándar
Tumor IL-12	6	11.45	12.76	5.21
Control	7	5.87	.806	.305
Tumor TNF-a	6	6.93	3.46	1.41
Control	7	5.85	1.40	.53
Tumor IL-10	6	10.18	8.58	3.50
Control	7	5.82	.67	.25
Tumor IL-6	6	14.38	11.02	4.49
Control	7	23.90	19.74	7.46
Tumor IL-1	6	15.95	19.09	7.79
Control	7	9.95	5.18	1.96
Tumor IL-8	6	75.58	100.89	41.18
Control	7	68.44	99.93	37.77

**Tabla 5**

	Prueba T						
	t	df	Sig	Dif Sig	Dif Err St	Intervalo de Confianza 95%	
						Baja	Alta
TNF a	.75	11	.46	1.07	1.42	-2.05	4.20
IL-1 b	.80	11	.44	5.99	7.47	-10.45	22.44
IL-6	-1.04	11	.31	-9.51	9.10	-29.55	10.52
IL-8	.12	11	.90	7.14	55.84	-115.76	130.04
IL-10	1.34	11	.20	4.35	3.23	-2.75	11.46
IL-12	1.16	11	.27	5.58	4.80	-4.98	16.14
IMC	.70	11	.49	2.20	3.12	-4.66	9.08
Edad	.62	11	.54	4.59	7.40	-11.69	20.88

## 11) DISCUSION

Los 2 grupos fueron homogéneos en edad, género e IMC. No se encontró ningún resultado estadísticamente significativo en la comparación de la expresión sérica de las citocinas IL-1 beta, TNF-alfa, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 entre pacientes con glioma de alto grado sin tratamiento específico y sujetos sanos. En el grupo de pacientes los diagnósticos fueron 3 Glioblastoma multiforme y 3 Astrocitoma anaplásico.

La medición de las citocinas (TNF a, IL-1 b, IL-8, IL-10, IL-12) fue mayor en el grupo de pacientes que en el grupo de sujetos sanos. La expresión de IL-6 fue menor en el grupo de pacientes que en el grupo de sujetos sanos.

Los valores más cercanos a la significancia estadística son los de IL-12 con P 0.27, IL-10 P 0.20. IL 12 corresponde a citocina con efecto pro inflamatorio en tanto que IL-10 es una citocina con efecto final inmunosupresor esta ultima tuvo el mayor valor de comparación entre grupos con base a este respecto tenemos que este resultado apoya las observaciones hechas en el estudio de Michele Quaranta et al ( Tumori 2007), en donde se propone que la expresión de receptores séricos de citocinas antiinflamatorias (entre ellas IL-10) están asociadas a supresión humoral y celular en pacientes con gliomas y con ello la evasión inmune por inhibición de la presentación de antígeno y de la proliferación de células T antígeno-específico así como inadecuada función de células T1 y con ello permitir la proliferación y migración tumoral. Otro trabajo relacionado con ello es el de Claudia Huettner et al ( American Journal Pathology 1995) donde encontraron aumento de expresión RNA de IL-10, utilizo PCR de muestras obtenidas de cirugía de gliomas de alto

grado, cultivos de células tumorales no así en tejido cerebral aparentemente normal. Otro estudio de Claudia Huettner et al (Anticancer Research 1997) demuestra no solo el aumento de expresión de IL-10 sérico en pacientes con glioma de alto grado sino también en muestras de tumor humano, en cultivos de células tumorales en todos los gliomas y significativamente mayor en gliomas de alto grado, además el efecto in vitro que tiene IL-10 para producir aceleración en la proliferación y migración tumoral.

En este estudio existe una expresión mayor de las citocinas IL-12 e IL-10 (con mayor tendencia a ser significativas) pro inflamatorias y anti inflamatorias respectivamente, en el grupo de pacientes que en el grupo de sanos, que podría corresponder a la desregulación de estas por el mismo proceso tumoral que resulta en aumento de los dos tipos de citocinas, antiinflamatoria que genera la proliferación tumoral, angiogénesis tumoral y cierta protección inmunitaria y por otro lado proinflamatoria por presencia del mismo proceso tumoral aunque con función no efectiva ya sea por dominio del efecto antiinflamatorio descrito anteriormente o por disminución de su expresión, como en este estudio que se encontró menor expresión de IL- 6 (p 0.31), que tiene efecto pro inflamatorio, en el grupo de pacientes con glioma alto grado con P 0.318, asociado a elevación de IL-10 que es antiinflamatoria, esto se apoya por las observaciones hechas por Athanasios Zisakis et al. (Cytokine 2007) donde analiza la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias, tanto de sangre para obtener células periféricas mononucleares y células tumorales originadas de resecciones o biopsias de pacientes con diagnostico de Glioma de alto grado, que se cultivaron in vitro, mediante ELI-SPOT, como resultados se obtuvo una disminución significativa de



secreción de IFN gamma y TNF-alfa, en pacientes con gliomas de alto grado comparado con sanos, en las células mononucleares de sangre periférica y en cultivos celulares. Además se observó una secreción elevada significativa de IL-10 en las muestras de los pacientes con glioma de alto grado comparado con los sujetos sanos, IL-4 se comportó de igual manera que IL-10 lo que sugiere influencia de IL-4 sobre IL-10.

## **12) CONCLUSION**

La expresión sérica de citocinas TNF alfa, IL-1 beta, IL-8 y IL-12 (pro inflamatoria) e IL-10 (anti inflamatoria) fue mayor en el grupo de pacientes con glioma de alto grado que en el grupo de sujetos sanos, siendo IL-10 e IL-12 las de mayor tendencia a ser significativas. La expresión sérica de IL-6 (pro inflamatoria) fue menor en el grupo de pacientes con glioma de alto grado que en el grupo de sujetos sanos.

Este comportamiento de expresión de citocinas séricas probablemente sea consecuencia de la desregulación de citocinas en los pacientes con gliomas de alto grado, lo cual podría resultar en dos aspectos: aumento de la actividad inmunosupresora dada por expresión aumentada de IL-10, que lleva a evasión del sistema inmune y con ello proliferación tumoral y por otra parte disminución de la actividad proinflamatoria y antitumoral del sistema inmune, dada por menor expresión de IL-6.

### 13) REFERENCIAS

1. Quaranta M, Divella R, Daniele A, Di Tardo S, Venneri MT, Lolli I, Troccoli G. Epidermal growth factor receptor serum levels and prognostic value in malignant gliomas. *Tumori*. 2007 May-Jun;93(3):275-80.
2. Sasaki A, Tamura M, Hasegawa M, Ishiuchi S, Hirato J, Nakazato Y. Expression of interleukin-1beta mRNA and protein in human gliomas assessed by RT-PCR and immunohistochemistry. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998 Jul;57(7):653-63.
3. Sasaki A, Ishiuchi S, Kanda T, Hasegawa M, Nakazato Y. Analysis of interleukin-6 gene expression in primary human gliomas, glioblastoma xenografts, and glioblastoma cell lines. *Brain Tumor Pathol*. 2001;18(1):13-21.
4. Huettner C, Paulus W, Roggendorf W. Messenger RNA expression of the immunosuppressive cytokine IL-10 in human gliomas. *Am J Pathol*. 1995 Feb;146(2):317-22.
5. Huettner C, Czub S, Kerkau S, Roggendorf W, Tonn JC. Interleukin 10 is expressed in human gliomas in vivo and increases glioma cell proliferation and motility in vitro. *Anticancer Res*. 1997 Sep-Oct;17(5A):3217-24.
6. Ishii N, Tada M, Sakuma S, Sawamura Y, Shinohe Y, Abe H. Human astrocytoma cells are capable of producing macrophage inflammatory protein-1beta. *J Neurooncol*. 1998 Mar;37(1):17-23.
7. Debinski W. An immune regulatory cytokine receptor and glioblastoma multiforme: an unexpected link. *Crit Rev Oncog*. 1998;9(3-4):255-68.
8. Yamanaka R, Tanaka R, Saitoh T, Okoshi S. Cytokine gene expression on glioma cell lines and specimens. *J Neurooncol*. 1994;21(3):243-7.
9. Nitta T, Steinman L, Sato K. Expression of cytokine genes within astrocytoma cell lines and brain specimens. *Shinkei*. 1991 Dec;43(12):1145-50.
10. Lee JH, Yoo SB, Kim NY, Cha MJ, Jahng JW. Interleukin-6 and the hypothalamic-pituitary-adrenal activation in a tumor bearing mouse. *Int J Neurosci*. 2008 Mar;118(3):355-64.
11. Haybaeck J, Obrist P, Schindler CU, Spizzo G, Doppler W. STAT-1 expression in human glioblastoma and peritumoral tissue. *Anticancer Res*. 2007 Nov-Dec;27(6B):3829-35.

12. Liang Y, Bollen AW, Aldape KD, Gupta N. Nuclear FABP7 immunoreactivity is preferentially expressed in infiltrative glioma and is associated with poor prognosis in EGFR-overexpressing glioblastoma. *BMC Cancer*. 2006 Apr 19;6:97.
13. Schaefer LK, Menter DG, Schaefer TS. Activation of stat3 and stat1 DNA binding and transcriptional activity in human brain tumour cell lines by gp130 cytokines. *Cell Signal*. 2000 Mar;12(3):143-51.
14. Heim MH. The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J Recept Signal Transduct Res*. 1999 Jan-Jul;19(1-4):75-120.
15. Kaloshi G, Mokhtari K, Carpentier C, Taillibert S, Lejeune J, Marie Y, Delattre JY, Godbout R, Sanson M. FABP7 expression in glioblastomas: relation to prognosis, invasion and EGFR status. *J Neurooncol*. 2007 Sep;84(3):245-8. Epub 2007 Apr 6.
16. Li M, Ransohoff RM. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: A migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol*. 2008 Feb;84(2):116-31. Epub 2007 Nov 26.
17. Athanasios Zisakis, Christina Piperi, Marios S. Themistocleous, Penelope Korkolopoulou, Efstathios I. Boviatsis, Damianos E. Sakas, Efstratios Patsouris, Robert W. Lea and Anastasios Kalofoutis. Comparative analysis of peripheral and localised cytokine secretion in glioblastoma patients. *Cytokine*, Volume 39, Issue 2, August 2007, Pages 99-105
18. Taizo Nitta, Michimasa Ebato, Kiyoshi Sato and Ko Okumura. Expression of tumour necrosis factor- $\alpha$ , - $\beta$  and interferon- $\gamma$  genes within human neuroglial tumour cells and brain specimens. *Cytokine* March 1994, Pages 171-180, Volume 6 issue 2.
19. Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K, Saya H, Hirano H, Kuratsu J, Oka K, Ishimaru Y, Ushio Y. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res*. 2003 Oct 15;63(20):6962-70.
20. Krzyszkowski T, Dziedzic T, Czepko R, Szczudlik A. Decreased levels of interleukin-10 and transforming growth factor-beta2 in cerebrospinal fluid of patients with high grade astrocytoma. *Neurol Res*. 2007 Sep 10 [Epub ahead of print]
21. Maria Eugenia Hernanadez, Daniel Mendieta, Daniel Martinez-Fong, Frida Loria, Julia Moreno, Iris Estrada, Rafael Bojalil, Lenin Pavon. Variations in circulating cytokine levels during 52 week course of treatment with SSRI for major depressive disorder. *European Neuropsychopharmacology*. 2008 Aug.

22. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol.* 2005, 5: 521-31.
23. Smith PL, Lombardi G, Foster GR. Type I interferons and the innate immune response--more than just antiviral cytokines. *Mol Immunol.* 2005, 42: 869-77.
24. Aguzzi A, Heikenwalder M. Prions, cytokines, and chemokines: a meeting in lymphoid organs. *Immunity.* 2005, 22: 145-54.
25. Moser B, Willimann K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum* 2004, 6 : 84-89.
26. Ohsuzu F. The roles of cytokines, inflammation and immunity in vascular diseases. *J Atheroscler Thromb.* 2004, 11: 313-21.
27. Gosain A, Gamelli RL. A primer in cytokines. *J Burn Care Rehabil.* 2005;26: 7-12.
28. Deorah S, Lynch CF, Sibenaller ZA y Ryken TC. Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001. *Neurosurg Focus* 20(4):E1, 2006.
29. Chakrabarti I, Cockburn M, Cozen W, Wang YP y Preston-Martin S. A Population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974-1999. *Cancer* 2005; 14(12):2798-2806.
30. Mendoza A, Cabaalé M y Fernández ME. Comportamiento Anatomopatológico de los Tumores Cerebrales en el Hospital General "Lucía Iñiguez". Año 2003. *Correo Científico Médico de Holguín* 2004; 8(3):1-6.
31. Wrensch M, Minn Y, Chef T, Bondy M y Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-oncol* 2002; 4(4):278-299.
32. Cuevas-Urióstegui ML, Villasís-Keever MA y Fajardo-Gutiérrez A. Epidemiología del cáncer en adolescentes. *Salud Publica Mex* 2003; 45(suppl 1):S115-S123.
33. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisan P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutolf UM y Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004; 64(19):6892-9.
34. Wrensch M, Fisher JL, Schwartzbaum JA, Bondy M, Berger M y Aldape KD. The molecular epidemiology of gliomas in adults. *Neurosurg Focus* 2005; 19(5):E5.

35. Ohgaki H y Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005; 109(1):93-108.
36. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD y Wrensch M. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2(9):494-503.
37. Wara WM. Radiation therapy for brain tumors. *Cancer* 1985; 55:2291-8.
38. Kowalczyk A, McDonald RL, Amidel CH, Dohrmann III G, Ericsson RK, Hekmatpanah J, y cols. Quantitative imaging study of extent of surgical resection and prognosis of malignant astrocytomas. *Neurosurgery* 1997; 41:1028-38.
39. Pérez Ortiz L, Rodríguez Ramos E, Figueredo Rodríguez R, Barroso García E. Astrocitoma anaplásico y glioblastoma multiforme. Factores que influyen en la supervivencia. *Rev Cubana Cir* 2001; 40(2):87-91.
40. Muñoz Carmona DM, Faga Cantamessa C, Márquez García-Salazar M, Gómez Millán J y Bayo E. Nuevas perspectivas en el tratamiento paliativo de glioblastoma multiforme y astrocitoma anaplásico recidivado con implantes de carmustina. *Oncología* 2005; 28(5):249-257.
41. Hou LC, Veeravagu A, Hsu AR y Tse VCK. Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options. *Neurosurg Focus* 2006; 20(4):E3.s
42. Daniel J Brat, Anita C Bellail and Erwin G Van. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncology*. 2005 April

### **13) APÉNDICE I: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Yo Sr (a) \_\_\_\_\_ he sido informado/a sobre los beneficios que podría suponer la extracción de un volumen de 10 ml de mi sangre para cubrir los objetivos del Protocolo de Investigación titulado “COMPARACION DE NIVELES SERICOS DE MARCADORES INFLAMATORIOS ( IL-1, IL-4, TNF-ALFA Y TNF-BETA) Y METABOLITOS DE ON (NITRATOS / NITRITOS) ENTRE PACIENTES CON GLIOMA DE ALTO GRADO SIN TRATAMIENTO Y EN SUJETOS SANOS”

- He tenido oportunidad de efectuar preguntas sobre el estudio.
- He recibido respuestas satisfactorias.
- He sido informado/a de los posibles perjuicios que la extracción de una muestra de 10 ml de sangre puede tener sobre mi bienestar y salud.
- He sido también informado/a de que mis datos personales serán protegidos
- He recibido suficiente información en relación con el estudio.
- He hablado con el Dr./Investigador:
- Entiendo que la participación es voluntaria.
- Entiendo que puedo abandonar el estudio:
  - ✓ Cuando lo desee.
  - ✓ Sin que tenga que dar explicaciones.
  - ✓ Sin que ello afecte a MIS cuidados médicos.

Declaro que he leído y conozco el contenido del presente documento, comprendo los compromisos que asumo y los acepto expresamente. Y, por ello, firmo este consentimiento informado de forma voluntaria para MANIFESTAR MI DESEO DE PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN SOBRE “COMPARACION DE NIVELES SERICOS DE MARCADORES INFLAMATORIOS ( IL-1, IL-4, TNF-ALFA Y TNF-BETA) Y METABOLITOS DE ON (NITRATOS / NITRITOS) ENTRE PACIENTES CON GLIOMA DE ALTO GRADO SIN

TRATAMIENTO Y EN SUJETOS SANOS”, hasta que decida lo contrario. Al firmar este consentimiento no renuncio a ninguno de mis derechos. Recibiré una copia de este consentimiento para guardarlo y poder consultarlo en el futuro.

Nombre del paciente o sujeto colaborador:

Firma:

Fecha:

Nombre del investigador:

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROCIRUGIA.

Firma:

Fecha: