



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS -174 IL-6 (G>C) Y EL NIVEL DE
IL-6 EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON DIAGNÓSTICO DE
NEUROBLASTOMA EN EL
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA

P R E S E N T A

DRA. SILVIA DAFNE DELGADILLO CANO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. GABRIELA HERNANDEZ PLIEGO

ASESORES EN BIOLOGÍA MOLECULAR

M. EN C. ARTURO RAMÍREZ PACHECO.

M. EN C. SILVIA SELENE MORENO GUERRERO



Ciudad de México, Febrero 2018



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.

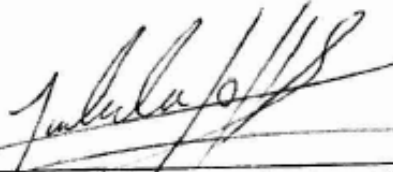
HOJA DE FIRMAS

Dra. Rebeca Gomez Chico Velasco
Directora de Enseñanza y Desarrollo Académico

Tutores:



Dr. Luis Juárez Villegas
Jefe del Departamento de Hemato-Oncología Pediátrica
Hospital Infantil de México Federico Gómez



Dra. Gabriela Hernández Pliego.
Médico Adscrito al departamento de Oncología
Hospital Infantil de México Federico Gómez



M. en C. Arturo Ramírez Pacheco.



M. en C. Silvia Selene Moreno Guerrero.

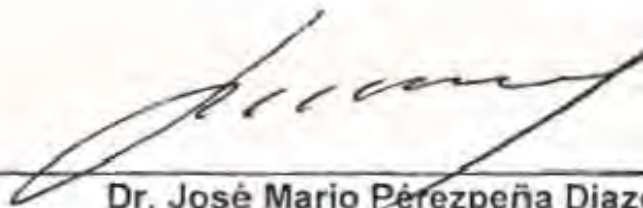
Asesores:



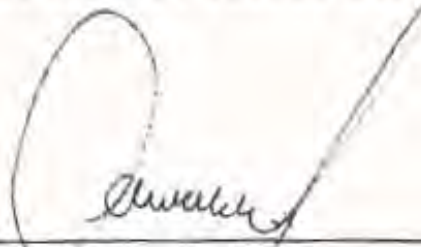
Dr. Juan José Luis Sierra Monge
Subdirector de pediatría ambulatoria
Hospital Infantil de México Federico Gómez



Dra en C. Luz María Rocha Ramírez.



Dr. José Mario Pérezpeña Díazconti
Jefe del Departamento de Patología clínica y experimental
Hospital Infantil de México Federico Gómez



Dr. Alfonso Reyes López
División de Investigación
Hospital Infantil de México Federico Gómez

INDICE

- 1. RESUMEN**
- 2. INTRODUCCION**
- 3. ANTECEDENTES**
 - 3.1. Cáncer en pediatría, México y el mundo**
 - 3.2. Neuroblastoma**
 - 3.3. Epidemiología**
 - 3.4. Genética**
 - 3.5. Patogénesis molecular**
 - 3.6. Patología**
 - 3.7. Presentación clínica**
 - 3.8. Diagnóstico y estadificación**
 - 3.9. Consideraciones pronósticas**
 - 3.10. Tratamiento**
- 4. MARCO TEORICO**
 - 4.1 El papel de la inflamación en enfermedades neoplásicas**
 - 4.2 Interleucina 6**
 - 4.3 Interleucina-6 y neuroblastoma**
 - 4.4 Polimorfismo -174 (G>C) del gen de IL-6**
- 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**
- 6. PREGUNTA DE INVESTIGACION**
- 7. JUSTIFICACION**
- 8. OBJETIVOS**
 - 8.1 Objetivo general**
 - 8.2 Objetivos específicos**
- 9. HIPOTESIS**
 - 9.1 Hipótesis verdadera**
 - 9.2 Hipótesis nula**
- 10. METODOS**
 - 10.1 Tipo de estudio**
 - 10.2 Diseño y metodología**
 - 10.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación**
- 11. CONSIDERACIONES ETICAS**
- 12. PLAN DE ANALISIS ESTADISTICO**
- 13. DESCRIPCION DE LAS VARIABLES**
- 14. RESULTADOS**
- 15. DISCUSIÓN**
- 16. CONCLUSION**
- 17. LIMITACION DEL ESTUDIO**
- 18. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES**
- 19. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**
- 20. ANEXOS**

A los niños, pacientes de oncología y a sus familias. Por ser un ejemplo de fuerza y amor a la vida, por ser mis más grandes maestros, gracias.

Dr. Miguel Palomo, Dr. Carlo Cicero, Dr. Félix Gaytán, Dr. Iván Castorena, Dr. Marco Murillo, Dr. Antonio Perales, Dra. Aurora Medina, Dra. Gabriela Hernández y Dr. Luis Juárez por que lo que aprendí de cada uno fue inmesurable, mucho más de lo que creen que me enseñaron, infinitas gracias.

A Vero, Manu y Fred, mis amigos, mis compañeros, mi equipo y mi familia. Un placer, son grandes.

A Fernando Ortega, por ser mi ángel de la guarda y mi hermano, por estar ahí para no dejarme dudar ni de mi camino, de mi decisión ni de mi. Por caminar juntos estos 6 años en el HIM y reirse conmigo durante todo el camino.

A todos los que me acompañaron, a mis enfermeros imposible mencionar a cada uno, a los trabajadores sociales, a psicología, al personal del laboratorio de oncología, el laboratorio central, patología. A todos gracias su dedicación, por sus enseñanzas, por su paciencia y por su amistad.

A la Dra. Gabriela Hernández, a Selene y Arturo por abrirme un nuevo panorama a la investigación, por compartirme su pasión, por las enseñanzas, la paciencia y por la confianza depositada en mi, gracias. Sin ustedes este trabajo habría sido imposible.

A mis padres, por su apoyo incondicional, constante, permanente e infinito.

A Fernando sin ti esto hubiera sido imposible. No tengo palabras...

Ni la ausencia ni el tiempo son nada cuando se ama. –Alfred de Musset

A Mila, por tu sacrificio, tu amor incondicional, por ser mi mayor motor, fuera, alegría e inspiración. Gracias por elegirme como tu mamá.

1. RESUMEN

Asociación de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y el nivel de IL-6 en pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma en el Hospital Infantil de México Federico Gómez

Antecedentes: El cáncer pediátrico es considerada una enfermedad infrecuente, sin embargo ha presentado aumento en su incidencia durante los últimos años. El neuroblastoma el tumor extracraneal sólido mas frecuente en la infancia, derivado de células de la cresta neural representando el 7% del total del cáncer pediátrico en México. Es modelo de estudio por sus características moleculares, citogenéticas y biológicas, las cuales le confieren una presentación clínica diversa, relacionada directamente con su biología. Las consideraciones pronósticas en el NB son: la histología, edad al diagnóstico, estadio de la enfermedad, amplificación del N-myc e índice de DNA. Además de las anomalías citogenéticas y moleculares ampliamente estudiadas en el NB, se ha descubierto un papel importante de la inflamación crónica en la presentación del NB. Dentro del grupo de citocinas pro-inflamatorias, enfocaremos la atención de este trabajo en la IL-6, ya que esta se ha visto involucrada en múltiples procesos biológicos como enfermedades del sistema inmune y en diversos tipos de cáncer. La IL-6 se ha relacionado con los efectos entre inmunidad innata y adquirida en los procesos inflamatorios, se ha asociado a carcinogénesis por ser uno de los principales reguladores de la inflamación crónica. Se han encontrado niveles elevados de IL-6 en diversos tumores como NB ya que promueve el desarrollo y la viabilidad de los neuroblastos por medio de señalización de las vías STAT-3, Erk, por lo que ha sido relacionado con factor de mal pronóstico y severidad de la enfermedad. Los SNP se definen como variaciones en la secuenciación del genoma que afectan a una sola base nitrogenada, se han identificado SNP implicados e diversos tipos de cáncer. Se han descrito previamente la existencia de algunos polimorfismos del gen de la IL-6. Dentro de dichas variantes genéticas, el polimorfismo SNP -174 G>C dentro de la región promotora del gen se ha relacionado con alteración en la respuesta a las citocinas y con la presentación clínica de algunos tumores, especialmente neuroblastoma. En población pediátrica se realizó una evaluación de dicho polimorfismo en población japonesa, documentando que la variante con Citosina presenta un incremento significativo en la actividad transcripcional del gen. El estudio del polimorfismo -174(G>C) del gen IL-6 no ha sido estudiado en población mexicana con diagnóstico de neuroblastoma, por lo que el análisis de la población, la presencia de polimorfismos y su relación con el grupo de riesgo de estos pacientes toma relevancia al ver que en otras poblaciones latinas se encontró como un factor de riesgo significativo.

Justificación: Los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) regulan la expresión de IL-6 los cuales pueden estar asociados al resultado clínico en pacientes con NB. Sin embargo estudios previos han tenido resultados contradictorios en cuanto al genotipo asociado; no se cuenta con frecuencias reportadas de dichos SNP's en población mexicana. En el HIMFG tres cuartas partes de los pacientes con NB presentan metástasis y los factores pronósticos se basan hasta el momento en características clínicas siendo importante analizar biomarcadores que puedan servir como actores pronósticos y de estadificación de riesgo.

Objetivo: Evaluar el polimorfismo -174 IL-6 (G>C) y los niveles de IL-6 en pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma en el Hospital Infantil de México

Hipótesis: Los alelos variantes de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) impactarán negativamente el pronóstico de los pacientes con Neuroblastoma, entonces se presentarán niveles altos de IL-6 en la circulación asociándose con falla al tratamiento y recaída.

Material y métodos: Se obtuvieron muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de Neuroblastoma, se realizará la extracción de ADN por método de columna y se analizará los SNP's -174 (G>C) de IL-6 por medio de RFLP y los niveles séricos de IL-6 por técnica de ELISA.

Plan de analisis: Se realizará un análisis descriptivo mediante la determinación de frecuencias.

Resultados: Se identificó el genotipo homocigoto silvestre (GG) en 12 pacientes (66.7%) con Neuroblastoma y en 4 pacientes sanos (22.2%). El genotipo heterocigoto (GC) se encontró en 6 pacientes con Neuroblastoma (33.3%) y en 6 de los pacientes sanos (33.3%). El genotipo homocigoto variante (CC) no se encontró en pacientes enfermos y se observó en 8 individuos sanos (44.5%). Las frecuencias alélicas en pacientes con Neuroblastoma para el alelo G fue de 83.3% y 16.7% para el alelo C. En los pacientes sanos las frecuencias alélicas fueron del 38.9% para el alelo G y 61.1% para el alelo C. Para el análisis de IL-6 en suero se eliminaron 4 muestras por considerarse muestra insuficiente. Se analizaron un total de 14 muestras de sangre periférica de niños sanos utilizados como controles, los niveles séricos de IL-6 en este grupo control fueron indetectables. En los 14 pacientes con Neuroblastoma analizados los niveles de IL-6 fueron de indetectables a 3,410 pg/mL.

Conclusiones: El alelo G del SNP -174 IL-6 (G>C) se presentó con mayor frecuencia en pacientes con Neuroblastoma que en individuos sanos. Probablemente el alelo G del SNP 174 IL-6 (G>C) y los niveles séricos de IL-6 pueden tener un rol importante en el desarrollo y progresión del Neuroblastoma, como posibles biomarcadores de mal pronóstico. Es necesario incluir un mayor cantidad de pacientes para determinar el impacto pronóstico de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y niveles de IL-6.

Abreviaturas: NB.- Neuroblastoma, SNP.- Polimorfismo de un solo nucleótido, PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa, RFLP.- Restriction Fragment Length Polymorphism

2. INTRODUCCION

El cáncer pediátrico es considerada una enfermedad infrecuente, sin embargo ha presentado aumento en su incidencia durante los últimos años. Actualmente el cáncer representa la segunda causa de mortalidad en la población de 5 a 14 años de edad a pesar del incremento en la supervivencia global de estas enfermedades. Al día de hoy se diagnostican aproximadamente 5,000 casos nuevos de cáncer infantil en México cada año.

De acuerdo a los datos epidemiológicos reportados, las neoplasias hematológicas representan el tipo de cáncer infantil más frecuente en nuestro medio. Dentro de las neoplasias sólidas los tumores del sistema nervioso central ocupan el primer lugar de presentación, siendo el neuroblastoma el tumor extracraneal sólido mas frecuente en la infancia.

El neuroblastoma (NB) es un tumor derivado de células de la cresta neural representando el 7% del total del cáncer pediátrico en México. Este tumor, se ha convertido en un modelo de estudio relevante por sus características moleculares, citogenéticas y biológicas, las cuales le confieren una presentación clínica diversa, relacionada directamente con su biología. Lo anterior, ha permitido hacer del neuroblastoma un modelo de estudio donde las características moleculares y genéticas del tumor toman relevancia clínica y pronóstica.

Las principales alteraciones citogenéticas y de genética molecular en NB son la ploidia, amplificación del gen N-myc, ganancia del brazo largo del cromosoma 17, deleción o pérdida alélica de brazo corto del cromosoma 1, pérdida del brazo largo del cromosoma 11 y del cromosoma 2 y las alteraciones en la expresión génica de receptores de neurotrofina.

Todas estas alteraciones participan de forma directa en el comportamiento de la enfermedad, su pronóstico y sus características clínicas.

Además de las anomalías citogenéticas y moleculares ampliamente estudiadas en el NB, se ha descubierto un papel importante de la inflamación crónica en la presentación de este y otros cánceres. El desarrollo y persistencia de la inflamación crónica se ve relacionada directamente con el equilibrio entre las citocinas pro y anti-inflamatorias.

Se ha descrito en la literatura que las variantes en la secuencia genética de algunos genes de interleucinas, llamados polimorfismos, se pueden relacionar a cambios en la actividad o expresión de las citocinas. Así mismo, estas alteraciones en la expresión de proteínas y de las citocinas pueden provocar cambios en el microambiente celular asociados a inflamación crónica que favorezcan la carcinogénesis y las condiciones de invasividad, metástasis y respuesta al tratamiento de algunos cánceres como el neuroblastoma. El estudio de estas variantes genéticas, asociado a otros factores clínicos y de riesgo permitirá hacer uso de dichos polimorfismos como factores pronósticos, que permitan en un futuro dar tratamiento personalizado y dirigido, con una estratificación de riesgo de acuerdo a las características biológicas de cada tumor.

3. ANTECEDENTES

3.1 CÁNCER EN PEDIATRÍA, MÉXICO Y EL MUNDO

El cáncer se considera una enfermedad poco frecuente en la población infantil, en la literatura se reportan, 16,400 casos nuevos de cáncer anualmente en Estados Unidos ⁽¹⁾.

En México se estima aproximadamente que se diagnostican de forma anual entre 5 y 6 mil casos nuevos ⁽²⁾.

Aunque existe una variabilidad importante entre los diagnósticos, se estima una supervivencia global en México del 56%. La incidencia nacional, es de 9 casos por cada 100 mil menores de 18 años para la población que no cuenta seguridad social ⁽³⁾.

Las enfermedades oncológicas son actualmente la principal causa de muerte por enfermedad en la población de entre 5 y 14 años de edad.

La mortalidad reportada actualmente en México alcanza por arriba de 2000 muertes por cáncer en niños de acuerdo a lo documentado en los últimos 10 años ⁽⁴⁾.

Dentro de las enfermedades oncológicas más frecuentes, el neuroblastoma representa el tumor extracraneal más común de la infancia en la población de 0 a 14 años de edad, representando el 7% del total. Solo siendo superado por la leucemia aguda linfoblástica (25.4%) y los tumores del sistema nervioso central (20.6%) ⁽⁵⁾.

Actualmente la supervivencia global en los niños quienes padecen cáncer entre los 0 y 14 años de edad, ha incrementado de forma exponencial desde los años 60's de un 28 a un 80% documentado en el año 2000 ⁽⁷⁾.

El entendimiento de la genética, los cambios genómicos y la biología molecular que se ha logrado durante los últimos años, nos permite conocer y entender los factores que predisponen al neuroblastoma.

Estudios de asociación génica han descubierto genes que contribuyen a la susceptibilidad para el desarrollo de NB. La secuenciación genética completa

del DNA del tumor al momento del diagnóstico ha revelado mutaciones recurrentes en un número bajo de genes. Haciendo énfasis en la regulación epigenética.

Esto hace del NB una enfermedad que ofrece un amplio campo para la investigación de dianas moleculares y genéticas que puedan relacionarse a la evolución clínica y pronóstica de los pacientes.

Por lo anterior, actualmente se han logrado identificar dianas específicas para intervenciones terapéuticas dirigidas, existiendo un gran potencial para un futuro abordaje personalizado en el manejo de la enfermedad⁽⁶⁾.

3.2 NEUROBLASTOMA

El neuroblastoma (NB) se considera el tumor sólido más común y letal de la infancia. Tiene dentro de sus características una gran gama de presentaciones clínicas y biológicas distintas⁽⁶⁾.

El NB es un tumor que se origina en las células primordiales de la cresta neural (neuroblastos). Los neuroblastos son precursores de neuronas postganglionares localizados en ganglios paravertebrales, sistema simpático paraganglionar y glándula suprarrenal⁽⁶⁾.

Las células primitivas de la cresta neural migran durante el desarrollo fetal, lo cual explica los múltiples sitios anatómicos donde se presenta este tumor, variando su localización y presentación clínica⁽⁹⁾.

Los patrones de expresión génica permiten clasificar al NB en subgrupos con diferente comportamiento clínico. Algunos marcadores genéticos representan en el NB predictores de respuesta al tratamiento.

El NB es el modelo en el que el análisis génico y biológico da información que ha generado un manejo individualizado de la enfermedad, logrando reducir la toxicidad a largo plazo y buscar terapias dirigidas para cada paciente⁽⁶⁾.

3.3 EPIDEMIOLOGÍA

El NB representa el tumor sólido extracraneal más común en pediatría, representando del 7-8% de las neoplasias infantiles⁽⁶⁾.

La prevalencia es de 1 caso por cada 7000 nacidos vivos; con una incidencia total de 800 casos por año en EUA. Su incidencia es de 9.7 casos por millón/año en la raza blanca y de 6.8 casos por millón/año en la raza negra en menores de 15 años. La relación hombre mujer 1.1:1 ^(7,8,9,10).

La edad media de presentación es a los 9 meses; y un 89% de los casos se diagnostican antes de los 5 años de edad. La incidencia mundial es similar especialmente en países industrializados ^(6, 9,10).

En México el Neuroblastoma representa el 2.4% de todos los cánceres registrados en población pediátrica en el país de acuerdo a lo registrado en la base de datos del Seguro Popular ⁽¹¹⁾.

En el Hospital Infantil de México Federico Gómez, se realizó una revisión sobre la supervivencia y características clínicas de los pacientes con neuroblastoma del 2002 al 2011, encontrando 64 casos, de los cuales el 75% se presentó como enfermedad metastásica al diagnóstico ⁽¹²⁾.

3.4 GENÉTICA

La causa de NB es desconocida. No existe evidencia de factores de exposición ambientales ni alguna asociación estudiada y demostrada de forma directa con otro tipo de exposiciones pre o post-natales con drogas, químicos, virus o radiación. Tampoco se conocen factores protectores, han sido estudiados uso de vitaminas maternas, infecciones en la infancia temprana y alergias entre otros⁽⁶⁾.

Se ha observado el riesgo incrementado de NB asociado a alteraciones congénitas cardíacas y en especial las urogenitales. Se ha observado casos familiares hasta en un 1-2% ⁽¹⁴⁾.

3.5 PATOGÉNESIS MOLECULAR

Las mutaciones germinales de ALK o PHOX2B predisponen al desarrollo de NB con alta penetrancia. Por lo que se consideran genes conductores para el desarrollo de NB.

En otros pacientes la herencia de variantes de DNA comunes se asocian a riesgo incrementado para NB. La gran mayoría de los niños no presentan un predisposición genética fuerte o historia familiar de NB⁽⁶⁾.

El inicio del tumor en estos casos es por cambios genómicos adquiridos somáticamente. Se ha visto en estudios recientes que existe ausencia relativa de recurrencia en los genes mutados por lo tanto se considera que existe un importante rol en la regulación epigenética de la expresión génica en el inicio y progresión del NB^(6, 13).

3.5.1 PATRONES DE CAMBIOS GENÓMICOS SOMATICOS

Estudios de cariotipo han demostrado que la mayoría de los NB son aneuploides y que presentan alteraciones que incluyen amplificaciones genómicas. Muchos de los sitios ya identificados que presentan estas alteraciones, confieren un valor pronóstico y se utilizan en muchos grupos de estudio dentro de sus clasificaciones de riesgo y para la planeación del tratamiento^(6, 13).

Toda la información que se ha acumulado de la genómica y biología del NB ha generado un modelo evolucionario que propone que todos los NB vienen de un precursor común⁽⁶⁾.

Pero que diferentes tipos de inestabilidad genómica llevan a diferentes patrones y diferentes alteraciones y por lo tanto, a comportamientos clínicos diferentes.

El modelo, predice que hay 2 subtipos principales de NB que son biológicamente diferentes ^(15,16,17,18).

Tabla 1. Subtipos de modelos biológicos de NB.

TIPO 1	TIPO 2	
<ul style="list-style-type: none"> • Ganancia y pérdida de cromosomas completos. • Pocas o ninguna alteración cromosómica. • Segregación mitótica defectuosa, sus mecanismos se desconocen. • Expresan altos niveles de TrkA (receptor de tirosin-cinasa). • Propensos a la apoptosis dependiente de factor de crecimiento neural (NGF). • Características biológicas y clínicas favorables, con excelente pronóstico. • Estadio bajo al diagnóstico. • Edad promedio al diagnóstico <18 meses. • Se caracterizan por ser hiperdiploides. La presencia de hiperdiploidía en 	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones cromosómicas segmentarias, por deleciones desbalanceadas o translocaciones. • Pueden tener o no cambios en cromosomas completos. • Se suelen encontrar de forma recurrente en el 1p, 1q, 3p,11q,14q,17q. • Cariotipo casi diploide o tetraploide 	
	2 A	2 B
	<ul style="list-style-type: none"> • Con deleciones en el 3p, 11q • No presenten amplificación del N-MYC ni deleciones en el 1p. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se considera el subtipo más agresivo. • Presenta amplificación del oncogén N-MYC. • Se acompaña de deleción 1p y alteraciones segmentarias, no perdida del 11q o 3p. • Frecuentemente presenta ganancia desbalanceada para 17q. • Expresar receptor TRkB + ligando factor neurotrófico cerebral (BDNF), que activa la vía autocrina de supervivencia del tumor, por lo que le da una ventaja biológica selectiva.

<p>menores de 18 meses sigue siendo un biomarcador de buen pronóstico, siendo altamente predictivo de buen pronóstico.</p> <ul style="list-style-type: none"> • No tienen amplificación del gen N-MYC o ningún otro específico. 		
--	--	--

La identificación de alteraciones cromosómicas al diagnóstico son pronósticas y podrían integrarse junto con factores clínicos para refinar la clasificación de riesgo de NB.

Existen algunas condiciones moleculares y genéticas específicas que deben considerarse:

3.5.2 ONCOGENES PROMOTORES EN NEUROBLASTOMA

Los NB tienen cariotipos diploides y son más frecuentes en niños mayores y con características de mal pronóstico. Los tumores localizados con cariotipos triploides o hiperdiploides se asocian a factores de buen pronóstico (13,19,20). La amplificación del N-MYC se asocia a estadios avanzados de la enfermedad y mal pronóstico⁽²¹⁾.

a) N-MYC

El oncogén N-MYC es de la familia de proto-oncogenes MYC, que codifica para factores de transcripción que regulan la expresión de aproximadamente el 15% de los genes humanos, por lo que su sobreexpresión impacta de forma importante el comportamiento celular.

Los cariotipos de NB revelan marcas citogenéticas de amplificaciones a las que se han nombrados cromosomas doble minuto o regiones de marcaje homogéneo^(6,19).

Scwhab y colaboradores fueron los primeros en descubrir que el oncogén MYCN es el producto de la amplificación del gen MYC ^(22,23).

Brodeur y Seeger demostraron que la amplificación del MYC-N se observa en estadios avanzados de la enfermedad, considerándose actualmente un factor de mal pronóstico y alto riesgo. Se asocia de forma independiente con mal pronóstico incluso en pacientes que por lo demás se considerarían de buen pronóstico o con características favorables ⁽²⁴⁾.

Actualmente el estado del gen N-MYC se determina de forma rutinaria al diagnóstico y ayuda a planear el tratamiento. La hibridación in situ con fluorescencia de interfase (FISH) es la técnica ideal para la verificación de la señal de N-MYC y permite evaluar amplificaciones de bajo grado y heterogeneidad intratumoral ^(19,20,21).

El número de copias con la amplificación para determinar el grado es arbitrario, pero la mayoría de los grupos lo definen como >4 el número de copias con N-MYC comparadas con un control diploide, generalmente este número es muy sobrepasado observándose de forma habitual 50 a 400 copias/célula ⁽²⁵⁾.

La prevalencia global de la amplificación N-MYC es del 20 al 22%, con concordancia entre la amplificación del gen al diagnóstico y las recaídas, por lo que se considera se trata de una mutación existente inherente en las células más que una mutación adquirida ⁽⁶⁾.

b) ALK

El gen ALK codifica para un receptor de membrana de tirosin quinasa. Se expresa de forma importante sólo en el desarrollo del sistema nervioso. Las mutaciones en la línea germinal del ALK son la principal causa del NB hereditario. La amplificación del gen ALK acompaña la amplificación del N-MYC en el 2 al 4%. Por lo tanto en total 10 al 14% de los NB tendrán una alteración del ALK ^(26,27).

c) Alteraciones cromosómicas segmentarias recurrentes (Tabla 2).

Ayudan a definir a un subgrupo de pacientes que presentan alto riesgo y mal pronóstico y que no presentan amplificación del MYC.

Tabla 2. Alteraciones cromosómicas segmentarias recurrentes.

Ganancia desbalanceada del Cromosoma 17 ⁽²⁸⁾	- 50% de los NB - Producto de t(1:17) con ganancia de la región 17q22 - NB más agresivos
Delección del brazo corto del Cromosoma 1p ^(6,29)	- 35% de los NB - Enfermedad avanzada, amplificación del N-MYC
Pérdida alélica del 1p36 ⁽⁶⁾	- Mayor riesgo de recaída en pacientes con tumores localizados o en aquellos Sin amplificación N-MYC.
Pérdida del alelo 11q ^(29,47)	- 25% de los NB primarios. - Pobre asociación con N-MYC - Se considera de mal pronóstico por su asociación con estadio avanzado, mayor edad al diagnóstico y patología desfavorable.

d) Expresión de receptores de neurotrofinas (Tabla 3)

Los receptores de neurotrofinas (NTRKQ1,2,3 que codifican TrkA,B,C) y sus ligandos (NGF, BDNF y neurotrofina-3) son importantes reguladores de la supervivencia, crecimiento y diferenciación de las células neurales.

Su expresión espacial juega un papel crítico en el desarrollo normal del sistema nervioso simpático. Se correlacionan con un fenotipo de NB ^(44,45,46).

Tabla 3. Receptores de neurotrofinas y correlación fenotípica con NB.

TrkA	TrkB	TrkC
<ul style="list-style-type: none"> - Menor edad al diagnóstico. - Estadio bajo al diagnóstico - Buen pronóstico y factores biológicos favorables. - Su expresión produce en el microambiente del tumor diferenciación hacia células ganglionares maduras (44,45,46). 	<ul style="list-style-type: none"> - Se asocia a tumores agresivos. - Se asocia a factores biológicos desfavorables (amplificación del MYCN). - Pueden expresar BDNF. - La activación permanente de esta vía contribuye a la quimiorresistencia y formación de metástasis. - Esta vía un excelente objetivo para desarrollar terapia dirigida para su inhibición (44,45,46). 	<ul style="list-style-type: none"> - Su objetivo aun esta por definirse. - Su expresión se da en tumores que también expresan el tipo A^(44,45,46).

3.6 PATOLOGÍA

El NB pertenece al grupo de tumores de células pequeñas redondas azules, separado por septos fibrovasculares con áreas de necrosis, calcificaciones, presencia de neuropilo en la forma más inmadura y en algunos casos la presencia de rosetas de Homer-Wright.

La inmunohistoquímica es positiva para: Sinaptofisina, gangliósido GD2, enolasa neuronal específica, moléculas de adhesión de la célula neuronal, Tirosin cinasa (TrK), cromogranina A y PAS negativo^(6,30).

Con base a las características anatomopatológicas, se presentan los tipos histopatológicos de tumores neuroblásticos⁽³⁰⁾ (Tabla 4).

Tabla 4: Tumores Neuroblásticos

Tumores Neuroblásticos	Características Histológicas	Subtipos
Neuroblastoma (NB):	Predomina Neuroblastoma y neurofilamentos (< 50%). Pocos tienen focos ganglioneuromatosos (periféricos o dentro de los septos). Los Subtipos dependen del porcentaje de estroma que presenten.	Indiferenciado 0%
		Pobrementemente diferenciado <5%
		Diferenciado > 5 %
Ganglioneuroblastoma:	Predomina el componente ganglioneuromatoso; componente neuroblástico >50%. Subtipos en base al componente neuroblastico:	Nodular
		Entremezclado
		Limítrofe
Tumor neuroblástico transicional:	Componente ganglioneuromatoso y neuroblastomatoso en proporción equitativa.	
Ganglioneuroma:	Exclusivamente presenta células ganglionares maduras, células de Schwann y tejido fibroso.	

En 1999 se adoptó la clasificación histológica internacional del neuroblastoma (INPC) siguiendo el método de Shimada, basado en el proceso biológico de maduración asociada a la edad, (Tabla 5) ⁽³⁰⁾

Tabla 5: Clasificación de la INPC de acuerdo con el método de Shimada.

EDAD	HISTOLOGÍA FAVORABLE	HISTOLOGÍA DESFAVORABLE
Cualquiera	Ganglioneuroma	
	Ganglioneuroblastoma	Ganglioneuroblastoma nodular Neuroblastoma indiferenciado
< 1.5 años	NB con MKI bajo o intermedio	NB pobrementemente con MKI alto

1.5 - 5 años	NB con diferenciación y MKI bajo	NB pobremente con cualquier MKI
> 5 años		NB con diferenciación con MKI alto
		Neuroblastoma con cualquier MKI

El Grupo Internacional de Patología Pediátrica incluyendo Shimada modificaron esto en la clasificación patológica internacional neuroblastoma (INPC) y fueron incorporados al sistema de clasificación internacional de grupos de riesgo de neuroblastoma (INRG)⁽⁶⁾ que será comentado más adelante.

3.7 PRESENTACIÓN CLÍNICA

El neuroblastoma puede surgir de la glándula adrenal o cualquier otro sitio a lo largo de la cadena simpática. Las manifestaciones clínicas de NB dependen de las siguientes características: tamaño, localización del tumor, presencia de enfermedad metastásica, síndromes paraneoplásicos. Hasta un 25% de los pacientes pueden estar asintomáticos. La afección del sistema simpático hace que la presentación clínica sea variable y cambie con respecto a la edad (Tabla 6)⁽³²⁾.

Tabla 6: Porcentajes de acuerdo a la localización por edad.

< 13 meses	Localización	> 13 Meses
5%	Cabeza y cuello	2-3%
20%	Tórax	10 -15%
55%	Abdomen	70 -75%
2%	Genitales	5%
10-20%	Otros	5-10%

La enfermedad metastásica está presente al diagnóstico en un 43% de los casos; es resultado de la diseminación linfática y hematogena. (Tabla 7)^(6,32).

Tabla 7: Signos y síntomas de NB de acuerdo a su localización.

Localización	Signos y síntomas
Abdominal	Masa abdominal (puede ser asintomática y detectarse de manera incidental) , aumento de perímetro abdominal, alteración en el patrón de evacuaciones, si el tumor es primario del órgano de Zuckerkandl; vejiga los síntomas producidos son por compresión del intestino.
Tórax	Dificultad respiratoria, tos, disnea. Síndrome de vena cava superior, síndrome de mediastino superior, en algunos casos incidental descubierta en una radiografía de tórax.
Paraespinal	Datos clínicos de compresión medular (dolor, parestesias) y dependerá de la región afectada (torácica, abdominal, pélvica)
Hepática	Hepatomegalia, la cual puede presentarse en forma masiva con compromiso ventilatorio por restricción torácica; así como edema de extremidades por compresión de venas y daño linfáticos. Esta forma es frecuente en lactantes con estadios 4S.
Otros	Proptosis, lesiones en piel, y las relacionadas a la enfermedad metastásica a medula ósea (palidez, sangrados, fiebre, adinamia, astenia), a hueso (dolor óseo), hígado (hepatomegalia, hepatalgia, ictericia, hemorragias) pulmón (dificultad respiratoria, cianosis) sistema nervioso central (Deterioro neurológico, crisis convulsivas)

En el 3-4% de los pacientes con NB se presentan Síndromes Paraneoplásicos (Tabla 8)⁽⁶⁾.

Tabla 8: Síndromes Paraneoplásicos del Neuroblastoma.

<i>Síndrome de Pepper:</i>	Hepatomegalia masiva por infiltración de NB; acompañada de dificultad respiratoria y/o insuficiencia respiratoria secundaria a restricción torácica. Característico del recién
----------------------------	--

	nacido y lactante menor ⁽⁶⁾
<i>Síndrome de Horner:</i>	Infiltración por NB del ganglio estrellado, se caracteriza por la presencia clínica de ptosis, miosis, anhidrosis. Característico en tumores primarios de cuello y apicales de tórax ⁽⁶⁾ .
<i>Síndrome de Blueberry muffin:</i>	Infiltración metastásica subcutánea de NB, presencia de lesiones violáceas oscuras de 5 a 10 mm, al ser presionadas presentan liberación de catecolaminas, ocasionando taquicardia, rubor facial, hipertensión arterial. Característico de NB Congénito ⁽⁶⁾ .
<i>Síndrome de Kerner-Morrison:</i>	Se encuentra en 7-9% de los casos, resultado de una secreción anormal de péptido intestinal vasoactivo. Se caracteriza por la presencia de diarrea acuosa, hipokalemia, hipocalcemia. Y se asocia a tumores neuroblásticos con células maduras (ganglioneuroma y ganglioneuroblastoma) ^(39,40,41) .
<i>Síndrome de Hutchinson:</i>	Afección medular que ocasiona dolor óseo que puede presentarse durante la deambulación, o en los lactantes puede presentarse como irritabilidad sin causa aparente ⁽⁶⁾ .
<i>Opsoclonos-Mioclonos (Síndrome de Kinsbourne)</i>	Presente en 2-4 % de casos con NB, su origen es autoinmune se cree que se forman anticuerpos contra el tumor que reaccionan alrededor de las células neurales del cerebro o cerebelo ocasionando la sintomatología que caracteriza a este síndrome (movimientos atáxicos, mioclonias). Un 70-80% de pacientes presenta déficit neurológico a largo plazo principalmente representado por déficit cognitivo, motor, del lenguaje y comportamiento. El tratamiento es controversial, dado que existe recurrencia a pesar de la resección del tumor. Un 50% de los pacientes que tienen únicamente como manifestación este síndrome se descubre un NB asociado ^(42,43) .
<i>Ojos de mapache:</i>	Proptosis, equimosis periorbitaria y retrobulbar. Característico de lactantes y preescolares ⁽⁶⁾ .

3.8 DIAGNÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN

Se debe realizar una historia clínica detallada y exploración física completa con el objetivo de identificar urgencias oncológicas que ponga en peligro la vida del paciente^(31,32); en todo paciente con sospecha de NB no debe retrasarse su referencia a un centro especializado en el tratamiento oncológico.

Exámenes de laboratorio Indispensables: Realizar biometría hemática completa, química sanguínea que incluya potasio, ácido úrico, fosforo, calcio y deshidrogenasa láctica para descartar una urgencia Oncológica (Síndrome de lisis tumoral). Otras Pruebas como las de función hepática, perfil de coagulación, pruebas de función renal, estudio audiológico basal, fracción de eyección del ventrículo izquierdo deben realizarse previo al inicio del tratamiento con quimioterapia.

Exámenes de laboratorio específicas para Diagnóstico de NB: Determinación de Catecolaminas séricas en orina de 24 horas Ácidos Homovanílico (HVA) y Vanililmandélico (VMA). Ferritina plasmática, enolasa neuronal específica (ENE), determinación del N-myc, Biopsia bilateral de médula ósea.

El análisis de catecolaminas séricas o en orina como representación del metabolismo de catecolaminas representa uno de los estudios con mayor sensibilidad para el diagnóstico de NB. HVA y VMA son metabolitos que muestran la mayor sensibilidad y especificidad en la detección del tumor.

Exámenes de gabinete:

Radiografía simple (RX): se puede observar masa paravertebral y mediastinales, infiltración ósea y masas abdominal calcificada.

Ultrasonido abdominal: ante cualquier masa abdominal palpable, masas retroperitoneales o paravertebral. Es la técnica de elección para el seguimiento de los tumores abdominales o pélvicos con bajo riesgo de afectación epidural.

Tomografía computarizada (TC): Establece los márgenes del tumor primario y detecta ganglios linfáticos contiguos o distantes afectados. La calcificación de

los tejidos blandos es característica de los tumores neuroblásticos al diagnóstico, de los tumores locorregionales en la fase regresiva y después de tratamiento citotóxico.

Resonancia Magnética (RM): Visualiza detalles anatómicos del tumor primario, extensión epidural o la enfermedad leptomenígea y puede diferenciar las lesiones intrahepáticas de anomalías benignas. Detecta la invasión vecina y a distancia; permite la diferenciación de la invasión ósea cortical, evalúa la extensión de la destrucción ósea. Su limitación es la mala definición de ganglios linfáticos menores de 13 mm. Es la mejor técnica para el seguimiento de tumores de la línea media o paravertebral.

Estudios gammagráficos. Tecnecio-99 visualiza mejor las lesiones corticales óseas. El I-131 o Meta Iodo Bencil de guanidina (I-123MIBG) es un radiofármaco análogo a los precursores de catecolaminas, es más sensible y específico para la detección de lesiones óseas corticales, la médula ósea y las lesiones de los ganglios linfáticos.

La tomografía por emisión de positrones (PET): Con empleo de F-fluorodeoxiglucosa (F-18 FDG) eficaz en la identificación de los tejidos blandos y lesiones óseas^(32,33).

Los criterios diagnósticos basados en consenso internacional:

- a) Diagnóstico patológico inequívoco: realizado por microscopía electrónica en tejido tumoral con o sin inmunohistología.
- b) Aspirado de médula ósea o biopsia de médula ósea con células tumorales inequívocas (ej: sincitios o inmunocitológicamente grumos positivos de células) más incremento de catecolaminas urinarias⁽³⁴⁾.

El Sistema de Estadificación Internacional del Neuroblastoma (INSS) está basado en la accesibilidad para la resección quirúrgica, la evaluación histológica de los ganglios linfáticos locorregionales, y el tamaño del tumor, se correlaciona con el pronóstico (Tabla 9)⁽³⁴⁾.

Tabla 9: Estadificación de acuerdo con los criterios del INSS (1993) ^(34,35)

E1	Tumor localizado con resección macroscópica completa, con enfermedad residual microscópica o sin esta; ganglios linfáticos ipsilaterales representativos, microscópicamente negativos para el tumor (como los nódulos adheridos al tumor primario y extirpado junto con éste, pueden ser positivos).
E2	Tumor localizado con escisión macroscópica incompleta; ganglios linfáticos ipsilaterales representativos, negativos para el tumor microscópicamente.
E2B	Tumor localizado con escisión macroscópica completa o sin esta; ganglios linfáticos ipsilaterales no adherentes, positivos para el tumor. Los ganglios linfáticos contralaterales agrandados deben ser negativos microscópicamente.
E3	Tumor irreseccable unilateral, infiltrante más allá de la línea media, con afectación de los ganglios linfáticos regionales o sin esta; o tumor unilateral localizado con compromiso de los ganglios linfáticos regionales contralaterales; o tumor en la línea media con extensión bilateral por infiltración (irreseccable) o por afectación del ganglio linfático. La línea media está determinada por la columna vertebral. Los tumores que se originan en un lado y cruzan la línea media deben infiltrarse sobre esta o hacia el lado opuesto de la columna vertebral.
E4	Todo tumor primario con diseminación a ganglios linfáticos distantes, huesos, la médula ósea, hígado, piel u otros órganos, con excepción de lo definido para el estadio 4S.
E4S	Tumor primario localizado, como se define para el estadio 1, 2A o 2B, con diseminación limitada a la piel, el hígado o la médula ósea (circunscrito a lactantes menores de un año de edad). La afectación medular debe ser mínima (o sea, <10% de células nucleadas totales identificadas como malignas por biopsia de hueso o por aspirado de médula ósea). Una afectación más extensa de la médula ósea se consideraría como enfermedad en estadio IV. Los resultados de la exploración con MBIG en caso de que se efectúe, deben ser negativos para la enfermedad en la médula ósea.

El Grupo de Riesgo Internacional para Neuroblastoma (INRG) desarrolló la estratificación del riesgo pre-tratamiento (Tabla 10) ⁽³⁵⁾.

Tabla 10: Clasificación del Grupo de Riesgo Internacional para Neuroblastoma (INRG) ^(35,36)

Etapa	Descripción
L1	Tumor localizado que no implique estructuras vitales tal como se define por la lista de IDRFs (tumores primarios multifocales, derrame pleural con o sin células malignas, ascitis con o sin células malignas) y se limita a un solo compartimento del cuerpo.
L2	Tumor locorregional con presencia de uno o más IDRFs
M	Enfermedad metastásica a distancia (excepto estadio MS)
MS	La enfermedad metastásica en niños menores de 18 meses con metástasis limitadas a la piel, el hígado, y / o de médula ósea
Los pacientes con tumores primarios multifocales debe de etapas de acuerdo a la mayor extensión de la enfermedad tal como se define en la tabla	

L2: puede implicar más de un compartimento en la contiguidad en el mismo lado del cuerpo. Hace énfasis que si el tumor es pequeño, no cruza la línea media pero envuelve estructuras vitales es designado como L2.

M: son aquellos con diseminación del tumor a los ganglios linfáticos distantes, médula ósea, hueso cortical, hígado, piel y/o otros órganos a menos que cumplan criterios para MS. Las colecciones (derrame pleural o ascitis) no son necesariamente metastásicas a menos que se detecten en un compartimento del cuerpo separadas al tumor primario.

El nuevo Sistema de Clasificación INRG se basa en criterios clínicos y de imagen, (Tabla 11), comprende dieciséis grupos pre-tratamiento (A a la R), los pacientes se agruparon categorías de riesgo, que son de muy bajo riesgo (A, B, C), de bajo riesgo (D, E, F), de riesgo intermedio (G, H, I, J), o alto riesgo (K, N, O, P, Q, R) ⁽³⁶⁾.

Tabla 11: Clasificación del INRG, etapas y grupos pre-tratamiento⁽³⁶⁾

Etapa INRG	Edad	Categoría Histológica	Grado de diferenciación tumoral	N-myc	Aberración 11q	Ploidía		Grupo de riesgo Pre-tratamiento	
L1/ L2		GN maduro; GNB entremezclado					A	Muy bajo	
L1		Cualquiera, excepto GN maduro o GNB entremezclado		NA			B	Muy bajo	
				Amp			K	Alto	
L2	<18	Cualquiera, excepto GN maduro o GNB entremezclado	S	NA	No		D	Bajo	
					Sí		G	Intermedio	
	≥ 18	GNB nodular, NBT	Diferenciando	Pobrememente diferenciado o no diferenciado	NA	No		E	Bajo
						Sí		H	Intermedio
						Amp		N	Alto
M	<18			NA		Hiperdiploide	F	Bajo	
	<12			NA		Diploide	Y	Intermedio	
	12 a <18			NA		Diploide	J	Intermedio	
	<18			Amp			O	Alto	
	≥ 18				P	Alto			
MS	<18			NA	No		C	Muy bajo	
					Sí		Q	Alto	
				Amp			R	Alto	

Actualmente la respuesta al tratamiento es valorable de forma objetiva, se han propuesto criterios para determinar la evaluación pudiendo hacer el seguimiento de los pacientes con neuroblastoma (Tabla 12)⁽⁶⁾.

Tabla. 12 Criterios Internacionales de respuesta al tratamiento ^(6, 34)

Respuesta	Primario	Metástasis	Marcadores
Respuesta completa	Sin tumor	Sin tumor (tórax, abdomen, hígado, hueso, médula ósea, ganglios)	AHV y AVM normal
Buena respuesta	Reducción >90%	Sin tumor en sitios mencionados, excepto hueso. Sin nuevas lesiones óseas. Lesiones preexistentes con mejoría.	AHV y AVM con disminución >90%
Respuesta parcial	Reducción del 50-90%	Sin nuevas lesiones. Reducción del 50-90% en sitios medibles. 0-1 médula ósea con tumor. Lesiones óseas igual que en Buena respuesta.	AHV y AVM con disminución del 50-90%
Respuesta mixta	Sin nuevas lesiones, reducción del 50-90% en sitios medibles. 0-1 médula ósea infiltrada. Lesiones óseas igual que en Buena respuesta.		
Sin respuesta	Sin nuevas lesiones; <50% de reducción, <25% incremento en cualquier lesión		
Enfermedad progresiva	Presencia de cualquier lesión nueva; incremento >25% en cualquier medición. Infiltración a médula ósea previamente negativa.		

3.9 CONSIDERACIONES PRONÓSTICAS

Las consideraciones pronósticas en los tumores neuroblásticos son la histología, edad y la extensión de la enfermedad; de forma específica en el NB (23) (24) son: la histología, edad al diagnóstico, estadio de la enfermedad, amplificación del N-myc, índice de DNA (Tabla 13).

Tabla 13: Factores Pronósticos de Neuroblastoma

Factores Pronósticos	
Histología:	Grado de diferenciación neuroblástica Grado de proliferación celular (MKI, índice mitosis-cardiorrexis), Grado de componente estromal Grado de calcificación
Edad al Diagnóstico:	Menores de 18 meses sin amplificación N-myc o INSS4 tienen mejor evolución. Adolescentes y niños mayores de 6 años los NB metastásicos tienen una evolución más indolente en comparación con los niños entre 1 a 5 años de edad.
Estadio de enfermedad:	INSS 1 tratados sólo con cirugía, la supervivencia del 100% INSS2 a y b Sin distinción pronóstica definida y la biopsia es suficiente. INSS2 y 3 el tratamiento depende de otros factores (características biológicas). INSS4 requiere tratamiento multimodal de moderado a intenso. Mayores de 1 año con E 4, SG < del 40%.
Amplificación del N-myc	Más de 10 copias Presente en un 25% Se asocia a estadios avanzados en un 30-40% Rápida progresión y pobre pronóstico En estadios bajos y E4S se presenta en el 5-10%.

Índice de DNA	Es muy importante en menores de 2 años de edad al diagnóstico con enfermedad diseminada, especialmente en Estadio 4S.
Regiones específicas de pérdida o ganancia alélica	Las deleciones del cromosoma 1p y 11q son los únicos integrados a los algoritmos de estratificación de riesgo en EU y Europa. La ganancia desbalanceada del 17q es el cambio genético mucho más común en neuroblastomas es asociado con pobres resultados. Sin embargo se correlaciona con la pérdida del 1p, amplificación del MYCN y otras características pronosticas adversas por lo que su pronóstico independiente no es claro.

Un gran número de marcadores biológicos se han asociado con un mal pronóstico en tumores neuroblásticos^(6,46,47). (Tabla 14).

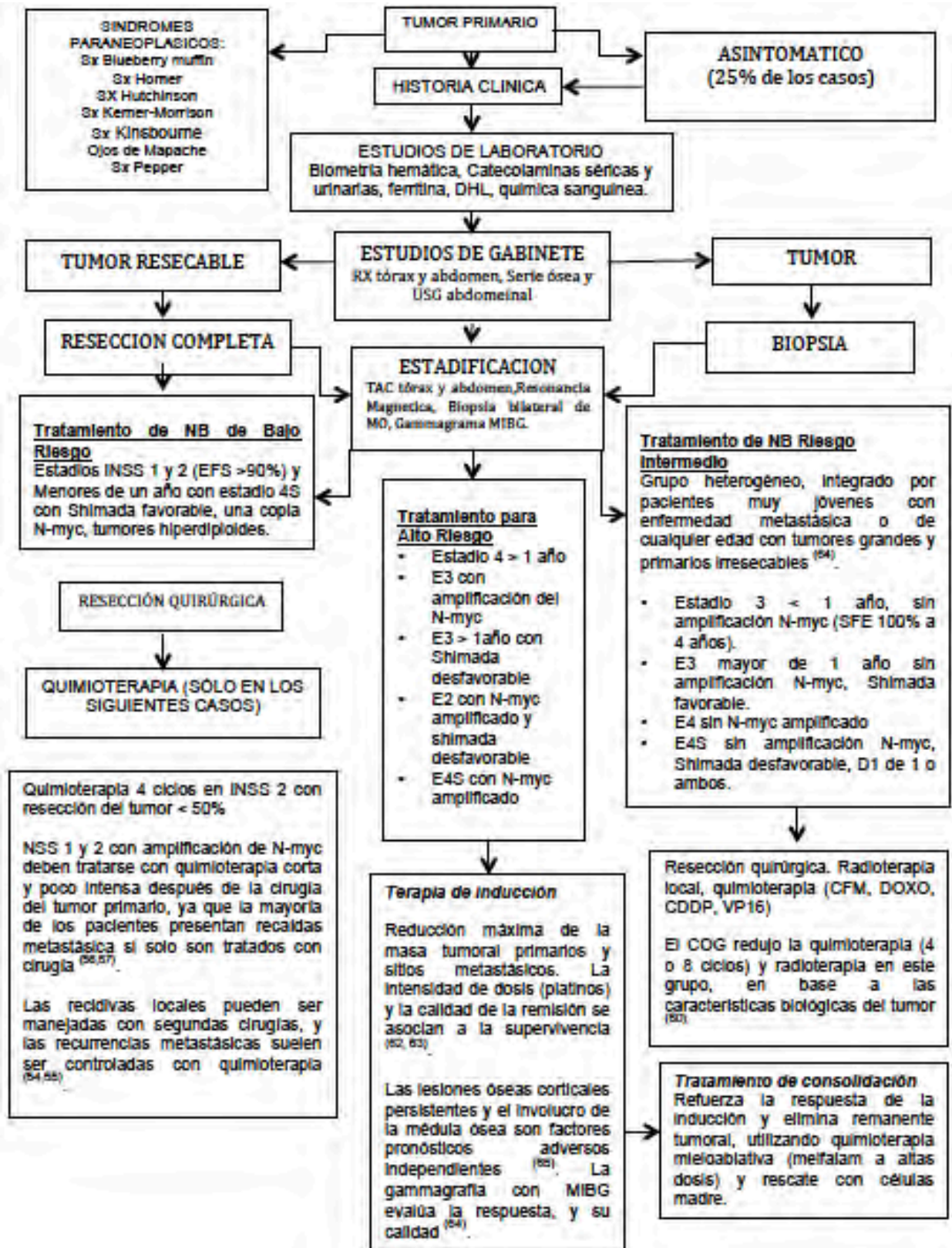
Tabla 14: Parámetros Biológicos y Marcadores Bioquímicos adversos en Neuroblastoma

Parámetro Biológico	Importancia pronóstica adversa
Alteraciones celulares tumorales:	
MYCN proto-oncogén	amplificación > 10 copias
17q cromosómicas región	Ganar
Cromosómicas 1p36 región	Pérdida alélica
Cromosómicas 11q23 región	Pérdida alélica
Cromosómicas 19q13 región	EMP3 gen hipermetilación
Contenido de ADN (ploidía)	diploidía o tetraploidía
La expresión de Trk A, B o C	Baja expresión A y C, la alta expresión B .

La telomerasa	Sobre expresión Gen de la enzima y el aumento de su actividad
CD44	Baja expresión de la proteína de membrana
Los Marcadores Bioquímicos:	
LDH sérica	> 1500 UI / L
Enolasa específica neuronal serica	> 100 ng / ml
Ferritina sérica	> 142 ng / ml
índice de VMA / HVA en orina 24h	<1

3.10 TRATAMIENTO

Figura 1. Diagnóstico y tratamiento de Neuroblastoma



Tratamiento de la enfermedad de no alto riesgo

-Neuroblastoma perinatal: 80% de los sometidos a observación se salvaron de intervención quirúrgica con un sobrevida global del 100% por lo que se considera la observación cuidadosa en los niños hasta los 6 meses de edad. Un estudio de seguimiento evaluará la aplicación de estrategias en los niños hasta los 12 meses de edad

-Enfermedad locorregional resecable: piedra angular en los diagnosticados fuera del periodo neonatal es la resección quirúrgica del tumor primario, los completamente resecados tiene SLE >90%. La recurrencia local puede tratarse con 2da cirugía exitosamente e incluso los de recurrencia metastásicas. En la cooperativa Europea estudio LNESG1, la tasa de sobrevida global a 5 años en 288 pacientes con tumores completamente resecados sin MYCN amplificado fue del 99%.

Los pacientes con resección incompleta +/- afectación ganglionar regional ipsilateral (INSS etapa 2) les fue bien con solo cirugía con SLE 83% según LNESG1 y 88% según COG P 9641. El último estudio revelo que los pacientes INSS 2B (enfermedad localizada con resección incompleta con adenopatía ipsilateral) cuyo tumor tenía histología *desfavorable* y diploidía no les fue tan bien como lo que *no tenían características desfavorables* con SLE y SG a los 5 años 72 y 86% vs 90 y 99%, respectivamente. Para aquellos con tumores diploides SLE fue 75% y sobrevida global 84%.

En el grupo LNESG 1, la ploidía no fue un factor pronóstico significativo, pero la histología desfavorable si con un SLE 61% y SG 76%. Dando lugar a las nuevas pruebas de incrementar la terapia a pacientes con tumores INRGSS L2 incompletamente resecados con histología desfavorable y características genómicas.

Los pacientes con MYCN amplificado la SLE 53% y SG 72% comparado con los no amplificados con SLE 90% y SG 98%. En la sociedad internacional de oncología pediátrica europea de Neuroblastoma (SIOPEN) los pacientes con L1 con MYCN amplificado reciben terapia sistémica, mientras que la práctica

habitual del COG es la observación si se logra una resección total y tratamiento agresivo si hay una recurrencia.

-Enfermedad locorregional reseca:

-L2 INRGSS reseca o INSS etapa 3: susceptibles a biopsia diagnóstica y dependiendo de histología y biología. MYCN amplificado es de mal pronóstico: tratarse con terapia de alto riesgo. En ausencia de MYCN amplificado con histología favorable y sin características biológicas desfavorable según el CCG 3881 se documentó resultados excelentes después de quimioterapia a dosis intensivas moderadas (CFM, Doxorubicina, CDDP y VP16) así como radiación local para cualquier enfermedad macroscópica después de la cirugía retardada. En el COG A 3961, la radiación para control local fue eliminada. Los tumores L2 resecales con MYCN no amplificado son ahora elegibles para terapia de riesgo intermedio en estudios de líneas europeas.

Etapa M en niños con neuroblastoma

Si tienen MYCN amplificado: tratados como alto riesgo

Tumor sin MYCN amplificado: responden a quimioterapia de intensidad moderada. Estudio CCG observó un SLE a los 3 años del 93% en estos casos; SIOPEX 99.3% con resultados excelentes en lactantes con estadio 4 en ausencia de MYCN amplificado. La diploidía se asoció a resultados inferiores; SLE en recién nacidos con etapa 4 con MYCN no amplificado y tumores diploides del 71%, siendo no candidatos a reducción del tratamiento posterior.

Etapa MS del neuroblastoma:

SLE en 4S que carecen de MYCN amplificado fue del 82% con supervivencia global del 91%.

Los menores de 3 meses presentan complicaciones secundarias a la hepatomegalia e infecciones por lo que se recomienda una estrecha observación hospitalizados con evaluación frecuente del estado respiratorio y evitar procedimientos quirúrgicos invasivos que lleven al paciente a estrés fisiológico. Se debe iniciar el tratamiento inmediato y la biopsia abierta del tumor debe retrasarse hasta que el tamaño del hígado disminuya y el paciente se encuentre estable. Regímenes de quimioterapia intensa utilizando

normalmente de riesgo intermedio. La radioterapia se reserva para pacientes con complicaciones potencialmente mortales cuya enfermedad progresa a pesar de la quimioterapia (dosis muy bajas 450-600cGy) para detener la progresión e inducir la regresión.

Los bebés con 4S y MYCN amplificado tratados según SIOPEL 99, tuvieron una supervivencia a los 2 años del 59% a pesar de la terapia multimodal por lo que se destaca la importancia de identificación y tratamiento agresivo una vez que la realización de la biopsia del tumor es segura.

Análisis de la INRG sugieren que la supresión del 11q está asociada a mala respuesta, sin embargo un cambio en el enfoque terapéutico en estos casos no se ha dado por la rareza de esta aberración en los MS.

Tratamiento de neuroblastoma paraespinal

Pueden causar compresión de la médula espinal convirtiéndolo en una verdadera emergencia. En general, estudios no muestran supervivencia o ventajas neurológicas de la descompresión neuroquirúrgica o radioterapia de haz externo. Además, Hoover documenta deformidades de la columna de leves a severas en los tratados inicialmente con laminectomía.

La cirugía y la quimioterapia tuvieron una eficacia similar en aliviar los síntomas, pero las secuelas tardías fueron más frecuentes después de la laminectomía. Por lo que la quimioterapia parece ser una modalidad inicial segura y efectiva en la invasión del canal espinal con menos morbilidad a largo plazo.

Tratamiento de la enfermedad de alto riesgo

Antes de la terapia integral multimodal la supervivencia a largo plazo en este grupo era <15%. Los regímenes terapéuticos actuales tienen 3 fases:

1. Terapia de inducción: objetivo es inducir la máxima reducción de la masa tumoral tanto del primario como metástasis. El neuroblastoma es normalmente sensible a la quimioterapia inicial, incluso los casos con MYCN amplificado. La duración de esta terapia no se conoce, la eficacia se evaluó por la tasa de respuesta (completa o parcial) y un segundo procedimiento quirúrgico. La calidad de remisión al final de esta terapia se asocia a una probabilidad de

supervivencia a largo plazo. MIBG es un componente importante para evaluar la respuesta. Regímenes de quimioterapia de inducción varían pero todos se basan en compuestos de platino de dosis intensivas y agentes alquilantes.

El ensayo de COG más recientemente publicado para el neuroblastoma de alto riesgo (A3973) utiliza una versión ligeramente modificada del régimen de quimioterapia de inducción diseñado por Kushner y colegas. Por la alternancia de dosis intensiva de vincristina, doxorubicina y ciclofosfamida (ciclos 1, 2, 4, y 6) con cisplatino y etopósido (ciclos 3 y 5), Kreissman y sus colegas demostraron una tasa de respuesta de inducción global de 79%. Sin embargo, sólo 22% de todos los pacientes alcanzaron una CR y 12,5% de los pacientes mostraron progresión de su enfermedad durante la inducción. El COG ha pilotado la incorporación de topotecan y CFM en la quimioterapia de inducción, sin embargo parece difícil lograr nuevas mejoras en la tasa de respuesta de inducción.

2. Terapia de consolidación: para eliminación de clones tumorales resistentes que sobreviven a la terapia de inducción con dosis supraletales de quimioterapia con el apoyo de la médula ósea autóloga o células madre de sangre periférica (CMSP).

El Grupo Cooperativo alemán comparó una irradiación corporal no-total (no TBI) que contienen carboplatino, etopósido y melfalán (CEM) régimen de quimioterapia mieloablativa a la quimioterapia oral de mantenimiento con dosis bajas de ciclofosfamida. Hubo mejora significativa SLE a 3 años para el grupo de trasplante, pero sólo una tendencia hacia la mejora de la SG. Un cuarto ensayo aleatorio controlado con regímenes de consolidación mieloablativos es una comparación continua de CEM con busulfán + melfalán por el grupo SIOPEN.

Esto se basa en una extensa experiencia en Europa que sugiere que el régimen de busulfán + melfalán conduce a la mejora de las tasas de curación en comparación con los demás.

Por último, el COG completado recientemente un ensayo que compara tándem consolidación mieloablativa con un tiotepa y ciclofosfamida régimen seguido por un régimen CEM ligeramente atenuado en comparación con un solo

régimen CEM convencional, sobre la base de una amplia experiencia piloto que sugiere que el trasplante en tándem puede mejorar la SLE.

Terapia posterior al trasplante es eficaz en la erradicación de EMR. Existe controversia continua sobre el momento óptimo de recolección y si es o no "selección positiva" con CD34 purificación juega ningún papel en la optimización del producto de células madre. No obstante, deben ser almacenados ya sea en tándem para apoyar consolidaciones mieloablativos, o que esté disponible para una variedad de terapias que puede utilizarse en el contexto de enfermedad recurrente o refractaria.

Trasplante alogénico se ha reducido en gran medida, porque no hay estudios que demuestren resultados superiores sobre rescate de células madre autólogas (ASCR). Sin embargo el interés se mantiene por el enfoque de que puede potencialmente inducir un efecto de injerto contra tumor.

3. Terapia de mantenimiento destinado a la enfermedad mínima residual (EMR): objetivo erradicar las células tumorales residuales utilizando agentes teóricamente activos contra EMR quimiorresistente. Los retinoides son una clase de compuestos que inducen la diferenciación celular y disminuyen la proliferación de células de neuroblastoma in vitro. Un total de 130 pacientes fueron aleatorizados para recibir 6 ciclos de 13-CRA o sin terapia adicional. La cohorte de pacientes asignados a recibir terapia postrasplante con 13-CRA había una mejora significativa SLE (46% frente a 29%; $p = 0,027$). El impacto del 13-CRA en SSC y la SG no fue tan significativo en un estudio de seguimiento posterior de los mismos pacientes, pero todavía es un componente estándar del tratamiento postconsolidation de EMR.

Con estas 3 fases se ha alcanzado una SLE y SG entre 40-60%.

La inmunoterapia focalización marcadores de superficie-neuroblastoma específica durante la fase de EMR de la terapia es una estrategia alternativa que ha demostrado recientemente eficacia.

Los anticuerpos monoclonales murinos 3F8, GD2a y lo humano-ratón quimérico ch14.18 anticuerpo monoclonal se han probado más ampliamente en los ensayos clínicos. Anticuerpos anti-GD2 como agente único con respuesta medible se ha observado en pacientes con neuroblastoma refractario. El

dolor neuropático durante y después de la administración es casi universal, siendo esta toxicidad limitada a la dosis. Investigadores concluyeron toxicidades agudas sustanciales pero manejables aunque no hubo impacto claro en los resultados al comparar pacientes sin esta terapia o los que recibieron 12 meses de quimioterapia de mantenimiento.

El COG ha completado recientemente un ensayo clínico aleatorizado diseñado para probar la eficacia de ch14.18 con interleucina-2 (IL-2), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), y 13-CRA (n = 113) en comparación con 13- cis retinoico solo (n = 113) después de la quimioterapia mieloablative. Las toxicidades de este régimen de inmunoterapia fueron significativas, con el grado ≥ 3 o mayor dolor en 52% de los sujetos (debido a la presencia de GD2 en los nervios periféricos) y síndromes vasculares significativos de fugas y / o reacciones alérgicas en 23% y 25% de los sujetos, respectivamente. Sin embargo, hubo una mejora significativa en la supervivencia para el brazo que contiene la inmunoterapia en comparación con el tratamiento estándar (retinoide solamente), con 2 años estimaciones de EFS de $66\% \pm 5\%$ versus $46\% \pm 5\%$ ($p = 0,012$) y 2- estimaciones OS año de $86\% \pm 4\%$ frente a $75\% \pm 5\%$ ($p = 0,022$) (Fig. 30.12). Este estudio apoya firmemente la inclusión de la inmunoterapia como modalidad fundamental en el tratamiento del neuroblastoma de alto riesgo.

A pesar de los avances, las probabilidades de supervivencia a largo plazo sigue siendo $<50\%$ y la terapia es altamente tóxica y los supervivientes muestran efectos tardíos significativos.

4. MARCO TEORICO

4.1 El papel de la inflamación en enfermedades neoplásicas

La relación que existe entre una activación persistente de la inflamación y el cáncer se ha propuesto como uno de los mecanismos para la promoción de diversos tumores ^(79,80).

Como ha sido plenamente estudiado, la activación de la respuesta inflamatoria involucra reacciones a nivel vascular, lo anterior conduce de manera progresiva a acumulación de fluido y células inflamatorias como los leucocitos al tejido extravascular tras un proceso de extravasación.

La vía inflamatoria normal se encuentra integrada por cuatro componentes entre los que se encuentran los inductores, diversos tipos de sensores, la síntesis de mediadores inflamatorios y proinflamatorios y finalmente como producto de lo anterior, las acciones que llevan a cabo múltiples moléculas efectores sobre órganos específicos ^(81,82).

Existen múltiples mediadores inflamatorios, entre los cuales las citocinas participan a diversos niveles, en la activación, regulación y homeostasis entre el proceso inflamatorio y el hospedero ⁽⁸²⁾. Existen múltiples citocinas con acción contraria en la regulación y finalización de los procesos inflamatorios, existiendo citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. En adecuado control de la inflamación surge del equilibrio entre estos dos grupos de citocinas.

4.2 Interleucina 6

Dentro del grupo de citocinas pro-inflamatorias, enfocaremos la atención de este trabajo en la IL-6, ya que esta se ha visto involucrada en múltiples procesos biológicos como enfermedades del sistema inmune y en diversos tipos de cáncer ⁽⁷²⁾. Dicha citocina inicialmente se describió como parte de la respuesta inmune humoral. Participa como un factor para la activación de los linfocitos T ⁽⁷⁶⁾, en la diferenciación de los linfocitos B, regula la producción de

proteínas de fase aguda ⁽⁸³⁾ y se ha descrito como factor de crecimiento de hepatocitos.

Se han demostrado también que la IL-6 presenta actividad hormonal de tipo paracrino involucrándola en afecciones vasculares, la regulación del metabolismo de lípidos, en patologías metabólicas como la resistencia a insulina, el metabolismo mitocondrial y con interacción a nivel neural ⁽⁸⁴⁾.

A pesar de su función primordialmente pro-inflamatoria, también se han descubierto propiedades anti-inflamatorias, teniendo una función predominante al unirse al receptor gp-130. Existen múltiples células con la capacidad de producir IL-6 entre las que se encuentran macrófagos activados, monocitos, fibroblastos y células endoteliales vasculares.

Su principal mecanismo de señalización es a través de la activación del factor de transcripción STAT ^(85,86). Así como la regulación de la transcripción de su gen regulador a través de proteínas denominadas SOCS3, que determinan una señal supresora de citocinas, teniendo entre sus efectos la inhibición de la señal de la IL-6, entre otras citocinas ⁽⁸⁷⁾.

4.3 Interleucina-6 y neuroblastoma

Se ha descrito ampliamente en la literatura que una respuesta inflamatoria activada de forma prolongada constituye un factor de riesgo para la conversión hacia la malignidad y la carcinogénesis así como para las características de invasividad, metástasis y farmaco-resistencia ⁽⁸⁸⁾. Ya que la IL-6 se ha relacionado con los efectos entre inmunidad innata y adquirida en los procesos inflamatorios, se ha asociado a carcinogénesis por ser uno de los principales reguladores de la inflamación crónica. Ésta, condiciona un microambiente favorable para el desarrollo de las células cancerígenas. Se ha estudiado previamente la concentración de esta citocina en diversos tipos de neoplasias, encontrando niveles elevados de IL-6 en tumores pulmonares, de mama, colon y neuroblastoma ^(88,89).

En población adulta, se considera anormal una concentración de IL-6 mayor de 10 pg/ml. Particularmente, en relación al neuroblastoma se han identificado

niveles de esta citocina anormalmente elevados en casos de enfermedad recurrente o enfermedad metastásica.

De acuerdo a la literatura, la IL-6 promueve el desarrollo y la viabilidad de los neuroblastos por medio de señalización de las vías STAT-3, Erk ⁽⁹⁰⁾, por lo que ha sido relacionado con factores de mal pronóstico y severidad de la enfermedad ⁽⁹¹⁾. Se han demostrado correlaciones entre los niveles elevados de IL-6 en células mononucleares y características clínicas de alto riesgo ⁽⁹²⁾, por lo que su análisis a futuro permitirá hacer de esta citocina un factor pronóstico para los pacientes con neuroblastoma.

4.4 Polimorfismo -174 (G>C) del gen de IL-6

Un polimorfismo se define como una población de múltiples alelos de un mismo gen, es decir se trata de una variación en la secuencia de un gen usualmente específico en una población. Los polimorfismos de un solo nucleótido (*SNP single nucleotide polymorphism*) se definen como variaciones en la secuenciación del genoma que afectan a una sola base nitrogenada. Actualmente, se han identificado polimorfismos de un solo nucleótido implicados e diversos tipos de cáncer.

La IL-6, se encuentra codificada en el brazo corto del cromosoma 7. Se encuentra formado por 4 intrones y 5 exones, con una región promotora y tres sitios identificados para la iniciación de la transcripción ⁽⁹³⁾.

Se han descrito previamente la existencia de algunos polimorfismos del gen de la IL-6. Dentro de dichas variantes genéticas, el polimorfismo SNP -174 G>C dentro de la región promotora del gen de la IL-6 se ha relacionado con alteración en la respuesta a las citocinas y con la presentación clínica de algunos tumores, especialmente neuroblastoma ⁽⁸⁷⁾.

Esta variación genética se desarrolla por el cambio de una sola base nitrogenada Guanina por Citosina, alterando la capacidad de transcripción del gen, estando directamente relacionada con los niveles plasmáticos de IL-6 ⁽⁹²⁾.

Se ha descrito previamente en la literatura la correlación directa del SNP -174(G>C) y el pronóstico y resultado clínico de pacientes con cáncer de mama. En donde mujeres homocigotas (GG) para dicho polimorfismo

mostraron menor supervivencia libre de enfermedad y global ⁽⁹⁴⁾, otros autores describieron que los pacientes con uno o más alelos C presentaban mayores tasas de supervivencia en contraste con los que presentaban homocigoto para guanina ⁽⁸⁷⁾.

En población pediátrica se realizó una evaluación de dicho polimorfismo en población japonesa que padecieran neuroblastoma, documentando que la variante con Citosina presenta un incremento significativo en la actividad transcripcional del gen comparado con los pacientes con variedad Guanina. Por otro lado, se identificó que la presencia de niveles séricos incrementados de IL-6 se relacionada de forma significativa con peores resultados clínicos a largo plazo en los pacientes con diagnóstico de neuroblastoma, sugiriendo el uso de dichos niveles y SNP, como marcadores pronósticos para neuroblastoma ⁽⁹⁵⁾.

El estudio del polimorfismo -174(G>C) del gen IL-6 no ha sido estudiado en población mexicana con diagnóstico de neuroblastoma, por lo que el análisis de la población, la presencia de polimorfismos y su relación con el grupo de riesgo de estos pacientes toma relevancia al ver que en otras poblaciones latinas se encontró como un factor de riesgo significativo.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El neuroblastoma es actualmente el tumor extracraneal más frecuente en la edad pediátrica, lo anterior ha llevado a la realización de profundos estudios moleculares y citogenéticos que permitan comprender la biología del tumor. Estas características biológicas le confieren al NB una amplia variedad de presentaciones clínicas, histológicas y de comportamiento que van desde una enfermedad autolimitada y con regresión espontánea hasta enfermedades sistémicas, invasivas y mortales.

A pesar de los avances en el conocimiento del cáncer en pediatría, el incremento en la supervivencia de los pacientes con neuroblastoma no ha sido exponencial como en otras neoplasias como es el caso de la leucemia aguda, lo anterior a pesar del amplio conocimiento que se tiene actualmente sobre su comportamiento.

Independientemente de la mejoría en los esquemas quimioterapéuticos, mayor disponibilidad de terapia de sostén, el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas, como el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas, anticuerpos monoclonales y terapia biológica dirigida, el NB continua teniendo una alta tasa de mortalidad, siendo considerado aún el tumor extracraneal más letal en la infancia.

Se ha documentado ampliamente en la literatura que las alteraciones genéticas juegan un papel importante en la carcinogénesis del neuroblastoma, teniendo una repercusión en la presentación clínica, la respuesta al tratamiento y el pronóstico de la enfermedad.

Actualmente el uso de herramientas de análisis genético y molecular permiten conocer las características biológicas del NB, pudiendo considerar estos biomarcadores como factores pronósticos auxiliares, que en un futuro pudieran ser considerados parte de las pruebas diagnósticas y de estadificación, siendo incluso candidatos para el desarrollo de nuevas terapias blanco.

Existe evidencia de la existencia de una estrecha relación entre la inflamación crónica y el desarrollo del cáncer, al jugar un papel importante en el

microambiente tumoral, la proliferación celular y al generar cambios a nivel vascular.

La IL-6, una citocina ampliamente estudiada por su papel en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación, se ha visto relacionada con diversos tipos de cáncer al encontrarse en niveles elevados en sangre incluyendo el neuroblastoma, asociándose a mayor progresión e invasividad del tumor. Por lo anterior, se ha considerado como un marcador de mal pronóstico. La expresividad de dicha citocina se encuentra regulada a nivel genético, por lo que la presencia de polimorfismos puede tener una repercusión directa en la presentación del neuroblastoma y el resultado clínico de la enfermedad. El polimorfismo -174 (G>C) ha sido estudiado anteriormente para conocer su asociación con el pronóstico de pacientes con neuroblastoma. Sin embargo, se han descrito resultados contradictorios entre diferentes poblaciones y los genotipos asociados a mal pronóstico. Se ha reportado en población anglosajona el homocigoto GG como un marcador de mal pronóstico, mientras que en población italiana se documentó un resultado clínico desfavorable en los pacientes homocigotos CC, contradiciendo los resultados anteriores. Estas diferencias en los resultados, se pueden relacionar a diferencias genéticas entre diversas poblaciones. Por lo anterior, es de suma importancia conocer en la población mexicana el comportamiento de la IL-6 y sus polimorfismos, así como el papel que juegan en el resultado clínico del NB.

Hasta la fecha, no existen estudios que evalúen la presencia del polimorfismo -147 (G>C) del gen de la IL-6 en población pediátrica mexicana, su relación con los niveles séricos de IL-6 y la repercusión clínica y pronóstica que estos juegan en el neuroblastoma en México.

La determinación de las características genéticas de los pacientes con neuroblastoma permitirá a corto plazo poder realizar una estratificación de la enfermedad de acuerdo al riesgo no sólo conferido por características clínicas e histológicas, si no por las características biológicas de cada paciente. Lo anterior permitirá ofrecer un tratamiento personalizado acorde al riesgo disminuyendo la sobreestadificación, la toxicidad innecesaria y las comorbilidades secundarias al tratamiento.

6. PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Existirá una asociación entre el polimorfismo -174 IL-6 (G>C) y los niveles de IL-6 en pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma en el Hospital Infantil de México?

7. JUSTIFICACION

Existe evidencia que niveles altos en circulación de IL-6 son un marcador de mal pronóstico en varios tipos de cáncer incluyendo el NB, también se ha descrito el papel de la IL-6 en el microambiente del NB promoviendo la progresión y metástasis del tumor.

Los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) regulan la expresión de IL-6 los cuales pueden estar asociados al resultado clínico en pacientes con NB. Sin embargo estudios previos han tenido resultados contradictorios en cuanto al genotipo asociado; se ha reportado el genotipo GG como un marcador de mal pronóstico clínico y otros describen al genotipo CC asociado a un mal resultado clínico. Estas divergencias pueden ser debidas a las diferencias genéticas de las poblaciones estudiadas.

En la actualidad no se cuenta con frecuencias reportadas de dichos SNP's en población mexicana. Sin embargo, datos previos señalan que en el HIMFG tres cuartas partes de los pacientes con NB presentan metástasis y los factores pronósticos se basan hasta el momento en características clínicas siendo importante analizar si los niveles de IL-6 acompañado a los resultados clínicos pueden deberse a los polimorfismos genéticos -174 IL-6 (G>C) en pacientes mexicanos con Neuroblastoma.

Este análisis de factores genéticos nos permitirá caracterizar de la mejor manera a los pacientes, para en un futuro lograr una mejor opción de tratamiento.

8. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el polimorfismo -174 IL-6 (G>C) y los niveles de IL-6 en pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma en el Hospital Infantil de México.

Objetivos específicos

- 1) Determinar las frecuencias de los -174 IL-6 (G>C) en población pediátrica mexicana con Neuroblastoma del HIMFG.
- 2) Analizar la asociación entre -174 IL-6 (G>C) y los niveles de IL-6 en pacientes con Neuroblastoma.
- 3) Identificar si existe asociación entre los niveles séricos de IL-6 con los grupos de riesgo en pacientes con Neuroblastoma.
- 4) Determinar la asociación entre los niveles séricos y el polimorfismo de IL-6 con la tasa de remisión, recaídas tempranas y sobrevida global de los pacientes con Neuroblastoma.

9. HIPOTESIS

Hipótesis verdadera

Los alelos variantes de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) impactarán negativamente el pronóstico de los pacientes con Neuroblastoma, entonces se presentarán niveles altos de IL-6 en la circulación asociándose con falla al tratamiento y recaída.

Hipótesis nula

Los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) no se asociarán a niveles altos de IL-6 ni se asociarán con la falla al tratamiento ni a recaídas o factores de mal pronóstico en pacientes con Neuroblastoma.

10. METODOS

10.1 TIPO DE ESTUDIO

Se propone un estudio de cohorte que incluirá pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma. Descriptivo y ambispectivo.

10.2 DISEÑO Y METODOLOGÍA

UNIVERSO DE ESTUDIO:

Se incluirán todos los pacientes pediátricos de 0 a 18 años de edad, de ambos sexos, con diagnóstico de Neuroblastoma, que durante dos años se diagnostiquen y sean tratados con los esquemas de quimioterapia adaptados al riesgo, empleados en el tratamiento de los pacientes en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Utilizando los datos reportados del SNP -174 IL-6 (G>C) del genotipo GG asociado significativamente a pacientes con Neuroblastoma de alto riesgo y mal pronóstico ⁽⁸⁷⁾, se obtuvo un tamaño de muestra mínimo con base en la fórmula para el cálculo de tamaño de muestra para la estimación de un riesgo relativo, la cual es la siguiente:

$$n = z_{1-\alpha/2}^2 \frac{(1-P_1)/P_1 + (1-P_2)/P_2}{(\ln(1-\epsilon))^2}$$

$$n = \frac{1.96 (1-0.57)/0.57 + (1-0.43)/0.43}{(\ln(1-0.5))^2} = 28.60 \approx 29$$

Donde:

$$Z_{1-\alpha/2} = 1.96$$

P_1 = proporción de expuestos al factor de estudio que presentaron el evento de interés. = 0.57

P_2 = La proporción de no expuestos que presentaron ese mismo evento. = 0.43

Nivel de confianza o seguridad = 0.99

Precisión relativa = 0.5

De acuerdo al cálculo del tamaño de muestra en el presente estudio se analizarán 29 pacientes pediátricos con Neuroblastoma.

METODOLOGIA

Procedimientos:

Diagnóstico Neuroblastoma.- El diagnóstico de Neuroblastoma está basado en los hallazgos histopatológicos en biopsias de tumor y morfológicos en médula ósea. Esta parte se hará de acuerdo con los procedimientos establecidos en el Instituto.

Obtención de las muestras

- a) Sangre Periférica. Las muestras de sangre periférica empleadas para la genotipificación de los polimorfismos genéticos, serán obtenidas por punción venosa 1ml (previo consentimiento y/o asentimiento informado), como parte de las pruebas requeridas para el diagnóstico de los pacientes, teniendo la precaución de hacerlo antes de que el paciente haya sido transfundido o de que hayan pasado al menos 3 meses desde la última transfusión. No se realizará una punción exclusivamente para el protocolo. Se realizará una única toma de muestra al diagnóstico.

- b) Suero: Las muestras de suero empleadas para la determinación de los niveles de citocinas serán colectadas por punción venosa 1ml (previo consentimiento y/o asentimiento informado), de las muestras sobrantes que se obtienen al momento del diagnóstico como parte de las pruebas requeridas. No se realizará una punción exclusivamente para el protocolo. Se realizará una única toma de muestra al diagnóstico.

Seguimiento: Se realizará el seguimiento clínico de los pacientes tratados, por un mínimo de 12 meses después de concluido el tratamiento para evaluación de la respuesta al tratamiento, supervivencia libre de evento y supervivencia global a 3 años, mediante la recopilación de datos clínicos (respuesta a tratamiento, estadio de la enfermedad, recaída, metástasis, estado actual etc.) los cuales serán obtenidos del expediente clínico de cada paciente.

Metodología Experimental

Análisis de los polimorfismos genéticos -174 IL-6 (G>C)

Extracción de ADN:

El ADN se obtendrá por el método de columna de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial (Qiagen, QIAamp DNA blood, midi kit), el DNA obtenido es almacenado a -20°C hasta ser utilizado para la genotipificación.

Genotipificación:

La identificación de estos polimorfismos se realizará mediante metodologías de PCR-RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Estos análisis utilizan pares de iniciadores que incluyen secuencias intrónicas y exónicas para asegurar la amplificación de cada uno de los genes a estudiar y no de un pseudogen. Se estandarizarán las condiciones óptimas de cada PCR realizando curvas de concentración de MgCl₂, dNTP's y temperatura de alineación.

El DNA genómico se amplificará con los oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes, dNTP's, regulador 1X (20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄) y Taq ADN polimerasa. El producto de PCR será visualizado en un gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio. Después de la amplificación se realizara una restricción enzimática del producto de PCR mediante una endonucleasa de restricción específica para cada polimorfismo a estudiar. Durante la estandarización de las técnicas de PCR se identificaran muestras positivas para cada uno de los polimorfismos y estos serán utilizados como controles en la genotipificación. En cada uno de estos controles se confirmara la presencia del polimorfismo mediante secuenciación automática.

Análisis de la citocina *IL-6* por el método de ELISA.

La producción de las citocinas se realizará en muestras de suero de los pacientes aplicando el método de ELISA tipo sandwich utilizando anticuerpos de captura y de detección (kits comerciales (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), para cada citocina). El protocolo para cada ensayo de ELISA se realizará de acuerdo a las indicaciones de la manufactura; brevemente las placas de ELISA (Costar) serán tratadas con 100µl de anticuerpo de captura en dilución 1:250 de cada citocina (en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.2) y se incubaran toda la noche a 4°C. Posteriormente se removerá el anticuerpo de captura, por lavados programados en un lavador automatizado de ELISA. Después serán adicionados a cada pozo 100µl de solución de bloqueo (SFB al 10% en PBS) y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. Al final de la incubación, las placas serán lavadas 3 veces con 300µl de la solución de lavado (PBS/ tween al 0.05%). Posteriormente, los estándares de citocinas y muestras serán adicionados a cada pozo correspondiente y nuevamente incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Después de una serie de cinco lavados, se adicionará anticuerpo de detección; así como conjugado de streptoavidina-horseradish peroxidasa (dilución 1:250 respectivamente) y se incubaran por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, después de 7 lavados se adicionará la solución sustrato TMB (Substrate Reagent Set BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) y se incubaron por 30 minutos protegidos de la luz. Al final se agregaron 50µl de solución de paro (H₂SO₄ 2N). La absorbancia será leída en lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm y la concentración de citocinas será calculada usando la curva estándar expresada como pg/ml. A la par se evaluaron sueros de testigos no relacionados con pacientes de Neuroblastoma.

10.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN

Criterios de Inclusión

- Pacientes pediátricos de 0 a 18 años de edad, de ambos sexos, con diagnóstico de Neuroblastoma.
- Pacientes sin ningún tratamiento previo.
- Que acepten participar en el estudio previa firma de consentimiento informado y/o asentimiento.

Criterios de exclusión

- Inmunodeficiencias adquiridas.

Criterios de eliminación

- Muestra insuficiente (cuando la cantidad de DNA y suero no permita la realización de todas las pruebas necesarias para el estudio) y no sea posible obtener nueva muestra.
- Falta de datos del expediente clínico.
- Abandono temprano de tratamiento.

11. CONSIDERACIONES ETICAS

Este estudio será realizado de conformidad con los principios que establece la 18ª Asamblea Médica Mundial (Helsinki, 1964) y todas las modificaciones aplicables establecidas por las Asambleas Médicas Mundiales y los lineamientos ICH para la Buena Práctica Clínica (GCP), así como al reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud.

Es un estudio con riesgo mínimo debido a que en una sola ocasión se tomarán 2 ml de sangre periférica de pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma. Esta toma no altera el tratamiento. Además dichas muestras serán obtenidas de los sobrantes de las muestras utilizadas para las pruebas rutinarias como parte del diagnóstico y seguimiento de la enfermedad del paciente, es decir no se realizara una toma de muestra exclusivamente para el desarrollo del protocolo.

La participación en este protocolo es voluntaria, por lo que se entregará a los padres la carta de consentimiento informado en donde estarán contenidos de manera explícita y en lenguaje sencillo el objetivo del estudio, la metodología de la investigación y la confidencialidad de los resultados. Cada uno de los pacientes que se incluyan en el estudio deberán contar con la carta de consentimiento informado anexa, firmado previamente por padre o tutor, y además la carta de asentimiento en aquellos pacientes mayores de 8 años.

Derechos y Respeto de los Participantes:

Todo tipo de personas es elegible para participar en estudios de investigación. Los voluntarios pueden ser adultos, niños, individuos saludables o enfermos. Cada estudio posee una serie de criterios específicos que determinan quién es elegible para participar. Las personas que deciden participar en un estudio de investigación pueden hacerlo con la esperanza de mejorar su propia salud, o para ayudar a los investigadores a obtener nuevos conocimientos científicos

referentes a la causa, tratamiento o prevención de enfermedades. Algunas personas podrán beneficiarse directamente al participar en un estudio, por ejemplo en el caso de que una droga utilizada que pruebe ser efectiva. Otras personas pueden no obtener ningún beneficio directo, pero su participación podrá ser un aporte para aumentar el conocimiento necesario para ayudar a otros en el futuro. Como participante de un estudio de investigación le están garantizados ciertos derechos, para asegurarle que será tratado de forma ética y respetuosa. Algunos de estos derechos básicos, están incluidos en la carta de consentimiento informado; y se le explicará en lenguaje ciudadano que el participante de esta investigación tiene el derecho a:

- Ser tratado con respeto.
- Conocer los riesgos envueltos en el estudio.
- Conocer las alternativas disponibles.
- Retirarse del estudio sin sufrir ninguna penalidad.
- Tomar su decisión sin sentir ninguna presión por parte de los investigadores.
- Conocer el nombre, las referencias y las informaciones para contacto del Investigador

Principal.

- Conocer el propósito del estudio.
- Saber quién tendrá acceso a su información.
- Saber qué procedimientos podrán ser realizados y qué drogas serán usadas.
- Buscar ayuda o clarificaciones adicionales durante el proceso de consentimiento informado, o en cualquier etapa del estudio.

En el presente proyecto, se citaron en la carta de consentimiento informado y asentimiento informado, algunos de los puntos anteriores referentes al derecho y respecto de los participantes.

CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD:

Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (RPBI)

Se manejarán muestras de sangre y suero, que serán procesadas en el Laboratorio de Oncología. Este tipo de muestra se clasifica como agente biológico-infeccioso. Los desechos originados, se manejarán y tratarán con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

Los restos de sangre y suero se desechan en contenedores rígidos de polipropileno color rojo, los desechos sólidos como tubos, torundas, gasas y guantes empapados con cualquier fluido biológico infeccioso serán colocadas en bolsa roja y el material desechable utilizado para su manejo (jeringas, agujas, etc.) será colocado en contenedores punzocortantes. Todo este material permanecerá en el laboratorio de oncología, hasta ser recolectado por el personal de control de medio ambiente destinado para el transporte del RPBI en cada semana o cada tres días, en caso de que los contenedores estuvieran llenos a 2/3 partes de su capacidad dependiendo de la cantidad generada..

Las muestras tomadas en el HIMFG se harán por personal capacitado en la sala de Hemato-Oncología. El procesamiento de las muestras se realizará en el laboratorio de Oncología por personal capacitado, con el uso de equipo de protección como guantes, cubrebocas y utilizando campana de flujo laminar.

Residuos Especiales.

El material utilizado que no corresponda a material biológico infeccioso o no este empapado de algún fluido infeccioso como hisopos, guantes, cubrebocas y gasas se desechará en los botes de basura para residuos especiales dentro de bolsas de plástico transparente. El Departamento de Control del Medio Ambiente recolectará las bolsas de plástico y las llevará a un almacén provisional, en donde permanecerán hasta que sean recogidos por la compañía contratada por nuestro hospital, misma que se encarga de su disposición final.

Residuos Químico Peligrosos con clasificación CRET I

Los desechos químicos peligrosos generados se manejarán con base en las normas, NOM-052-SEMARNAT-2005, NOM-053-SEMARNAT-1993, NOM-118-STPS-2000.

En el proyecto se utilizarán materiales como Etanol (Inflamable), residuos productos de extracción de ADN por medio del QIAamp DNA blood, midi kit de

Qiagen y Bromuro de Etidio (Tóxico). Estos se desechan de acuerdo al manual, de procedimientos del laboratorio, por separado en un contenedor rígido sin color específico resistente a la sustancia que contendrá, hasta ser llenado a un 75% de su capacidad, estos son recolectados cada 15 días o cada semana por el personal especial del departamento de control de medio ambiente encargado de recolectar residuos CRETÍ, para su inactivación y disposición final. El contenedor debe ser rotulado con el nombre y tipo de desecho, características del desecho, nombre del área generadora, fecha de inicio y término de almacenamiento, nombre de la persona que entrega al almacén temporal y nombre de la persona responsable de la recepción al almacén temporal.

Las puntas, pipetas y/o jeringas impregnadas de sustancias con clasificación CRETÍ se desechan como material punzante o punzocortante según sea el caso, en un contenedor rígido y rotulado como material contaminado con sustancias CRETÍ, especificando el nombre y tipo de desecho, características del desecho, nombre del área generadora, fecha de inicio y término de almacenamiento, nombre de la persona que entrega al almacén temporal y nombre de la persona responsable de la recepción al almacén temporal.

Los residuos sólidos químicos peligrosos (geles de agarosa, guantes y gasas con Bromuro de Etidio) se colocan en contenedores o bolsas rotuladas como material contaminado con Bromuro de Etidio, especificando el nombre y tipo de desecho, características del desecho, precauciones de manejo, nombre del área generadora, fecha de inicio y término de almacenamiento, nombre de la persona que entrega al almacén temporal y nombre de la persona responsable de la recepción al almacén temporal.

12. PLAN DE ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó un análisis de estadística descriptiva realizando cálculo de frecuencias de los genotipos y por cada alelo así como de las características clínicas de la población de estudio.

13. DESCRIPCION DE LAS VARIABLES

Dependiente: Neuroblastoma

Independientes:

Genotipo de los SNP analizados (-174 IL-6 (G>C)

Niveles séricos de IL-6

Variables de Control (confusoras):

Edad del paciente

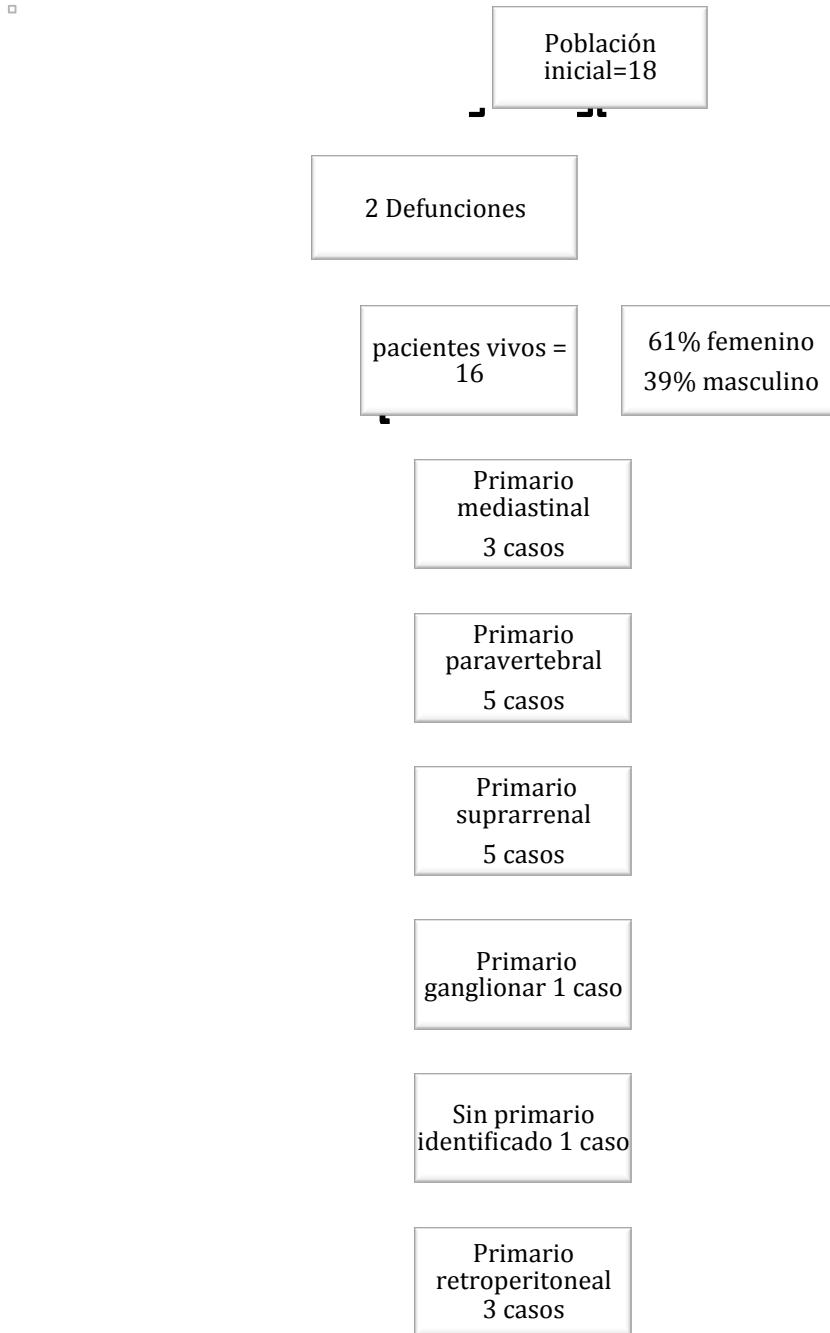
Sexo

Tabla 15. Descripción de variables.

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de Medición
Neuroblastoma	Cualitativa nominal policotómica:	Es un tumor maligno extracraneal derivado de las células primordiales de la cresta neural.	El diagnostico será determinado por características clínicas e histopatológicas.	Categórica policotómica: 1)NB de alto riesgo 2)NB de riesgo intermedio 3) NB de Bajo riesgo.
Genotipo	Cualitativa nominal policotómica	Información de características genéticas que tenemos los seres humanos. Formado para cada gen por dos alelos (silvestre y variante).	Dato obtenido por medio de un análisis de laboratorio El genotipo será determinado mediante una prueba de laboratorio (técnica de PCR-RFLP).	Categórica : Homocigoto silvestre, Heterocigoto Homocigoto variante
Niveles de Citocinas	Cuantitativa numérica continúa	Moléculas efectoras de la respuesta inmune inducidas a un estímulo específico.	Datos obtenidos a través de una prueba de inmunoensayo	Numérica (de razón)
Edad	Cuantitativa discreta.	Termino que se utiliza para hacer mención al tiempo que ha vivido un ser vivo desde su nacimiento.	Número de años cumplidos	Numérica
Sexo	Cualitativa dicotómica	Características fenotípicas de los	Identificación en el expediente clínico	Nominal dicotómica: 1) Mujer, 2) Hombre

		individuos que los agrupan en hombre o mujer.	del dato de género registrado.	
--	--	---	--------------------------------	--

14. RESULTADOS



Se revisaron 18 casos de pacientes pediátricos con diagnóstico de neuroblastoma tratados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez durante el periodo comprendido de enero de 2016 y mayo de 2017.

Se reclutó una población con una distribución del 61.1% femenino y 38.8% masculino (11 y 7 casos respectivamente). Con una relación hombre: mujer de 1:1.5.

Con respecto a las características de la población (Tabla 16) se documentó una distribución por grupo etario con predominio en los lactantes y preescolares representando el 72% de la muestra, con 11.1% de casos en el periodo neonatal y 11.1% en población escolar.

Por otro lado, podemos agruparlos de acuerdo a la edad de riesgo, encontrando 10 casos menores de 18 meses (55.5%) y 8 casos mayores de 18 meses (44.4%), con un rango de edad desde el periodo neonatal hasta los 9 años de edad.

Clinicamente, con respecto a la presentación el 44% presentaron algún síndrome paraneoplásico, siendo el más frecuente el síndrome de Horner con 3 casos, Síndrome de Kinsbourne con 2 casos, 1 síndrome de Pepper y uno de Huntignton.

Al diagnóstico se presentaron 3 casos como masa mediastinal (16.6%), 5 casos con tumor primario paraespinal (27.7%), 3 tumores retroperitoneales (16.6%), 5 tumores suprarrenales (27.7%) y finalmente 2 casos sin primario conocido uno metastásico a hueso y uno ganglionar.

Diez de los pacientes se presentaron con enfermedad metastásica al momento del diagnóstico representando un 55.5% de la población.

Dentro del abordaje diagnóstico, únicamente el 55% de los pacientes cuentan con catecolaminas en orina. El diagnóstico por imagen se realizó por medio de resonancia magnética en 4 casos (22%), tomografía axial computada en 15 de los casos (83.3%).

La realización de gammagrama con MIBG como parte del abordaje diagnóstico se llevo a cabo en 13 casos (72.2%), encontrándose positivo en todos estos casos.

El gammagrama con Tc99 para identificación de lesiones óseas se realizó en 15 casos (83.3%), con resultado positivo en 10 de estos.

Únicamente se cuenta con determinación de N-MYC en 1 caso, con resultado negativo.

Los diagnósticos incluyeron principalmente casos de enfermedad avanzada en un 72.1% con estadios 3 o 4 de la INSS y únicamente 27.7% en etapa 1 y 2.

Ningún caso cumplió criterios para estadio 4S.

En la distribución de acuerdo a la estadificación del INRG se encontró menor discrepancia entre los grupos, con un 22.2% de los casos en estadio L1, y 33.3% en estadio L2 y 44.4 en estadio M, sin reportar ningún caso MS, coincidiendo con mayor incidencia de los estadios avanzados.

Tabla 16. Descripción de la población

Factor	N	%
Edad al diagnóstico		
Neonatal	2	11.1
Lactantes	7	38.8
Preescolares	6	33.3
Escolares	2	11.1
Edad como factor de riesgo		
<18 meses	10	55.5
> 18 meses	8	44.4
Genero		
Masculino	7	38.8
Femenino	11	61.1
Estadio INSS		
1	3	16.6
2	2	11.1
3	5	27.7
4	8	44.4
4S	0	0
Estadio INRG		

L1	4	22.2
L2	6	33.3
M	8	44.4
MS	0	0
Histología		
Indiferenciado	1	5.5
Poco diferenciado	7	38.8
Bien diferenciado	5	27.7
En diferenciación	3	16.6
No especificado	2	11.1
Estratificación de riesgo		
Bajo	4	22.2
Intermedio	5	27.7
Alto	9	50
Síndromes paraneoplásicos		
Si	8	44.4
No	10	55.5
Estado actual de la enfermedad		
En vigilancia	10	55.5
2º neoplasia	1	5.5
Neoadyuvancia	2	11.1
Adyuvancia	0	0
Post TCPH	3	16.6
Defunción con respuesta completa	1	5.5
Defunción por enfermedad	1	5.5

La estratificación de acuerdo al riesgo se llevó a cabo con base en los datos anteriores, se estratificó a un 50% dentro del grupo de alto riesgo, 27.7% dentro del grupo de riesgo intermedio y 22.2% dentro del grupo de bajo riesgo.

En el Hospital Infantil de México Federico Gómez se utiliza un esquema de tratamiento basado en los esquemas del POG 8104 y 8441, para etapas 1-2 y 3-4 respectivamente, con base en el riesgo.

PACIENTES DE ALTO RIESGO

Los pacientes que recibieron protocolo de alto riesgo representaron el 50% de la población (9 casos) de los cuales 7 pacientes recibieron quimioterapia neoadyuvante, representando el 77% de este grupo, recibiendo de 1 a 6 ciclos. Recibieron quimioterapia adyuvante 5 de los casos (55%) desde 1 hasta 10 ciclos de quimioterapia. Uno de los pacientes ameritó inicio de una segunda línea de tratamiento, dos continúan en manejo neoadyuvante y tres pacientes recibieron consolidación con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas de tipo autólogo, recibiendo terapia de mantenimiento, de los cuales una paciente continúa en manejo con ácido 13-cis-retinoico.

Dentro de este grupo 7 de los 9 casos se presentaron como enfermedad metastásica al diagnóstico, 5 se presentaron con histología desfavorable y en dos casos no se definió el grado de diferenciación histológico.

Actualmente, 5 pacientes que corresponde al 55% de este grupo se encuentran en vigilancia incluyendo a los 3 pacientes post-trasplante. Un solo caso continúa en tratamiento neoadyuvante y un paciente se encuentra en tratamiento por cursar con una segunda neoplasia (leucemia aguda linfoblástica de alto riesgo) posterior al inicio de vigilancia. Se presentaron en este grupo dos defunciones, una asociada a la enfermedad de base y otra por complicaciones infecciosas.

GRUPO RIESGO INTERMEDIO

El grupo de riesgo intermedio se conformó por 5 pacientes, representando el 27.7% del total de la población, de los cuales 4 recibieron quimioterapia neoadyuvante de 1 a 4 ciclos.

De este grupo, el 60% recibieron quimioterapia adyuvante de 1 a 4 ciclos. Uno de estos pacientes continúa en manejo neoadyuvante.

Tres de estos 5 casos se presentaron como enfermedad metastásica al diagnóstico. Con respecto al grado de diferenciación histológica como factor de riesgo, dentro de este grupo se documentaron 2 casos con histología diferenciada, dos en proceso de diferenciación y uno poco diferenciado.

Actualmente de este grupo el 60% se encuentran en vigilancia, el 20% continua en tratamiento aun sin evaluación para determinar la respuesta de la enfermedad y un solo caso abandonó el seguimiento

GRUPO BAJO RIESGO

Se observaron 4 pacientes estadificados como de bajo riesgo representando el

DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMO -174 (G>C) DE LA IL-6

Para la determinación del gen de la IL-6 se llevó a cabo extracción del ADN por el método de columna de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial (Qiagen, QIAamp DNA blood, midi kit), el DNA obtenido es utilizado para la genotipificación.

Para llevar a cabo la genotipificación e identificación del polimorfismos se realizó mediante metodologías de PCR-RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*).

En la figura 3 y 4 se observa una electroforesis con los productos de PCR para el genes de la IL-6. En la figura 4 se observa la digestión del producto de PCR del gen IL-6 con la enzima de restricción Nla III, para la determinación del genotipo del SNP -174 G>C.

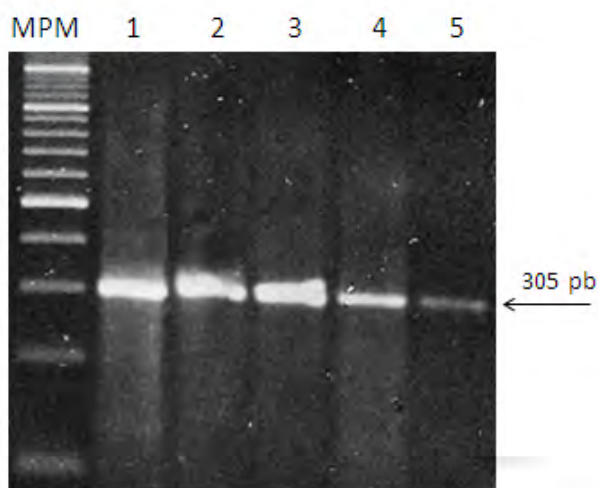


Figura 3A: Se muestran productos de PCR para el gen IL-6 de 305 pares de bases (carril 1 al 5), MPM corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb

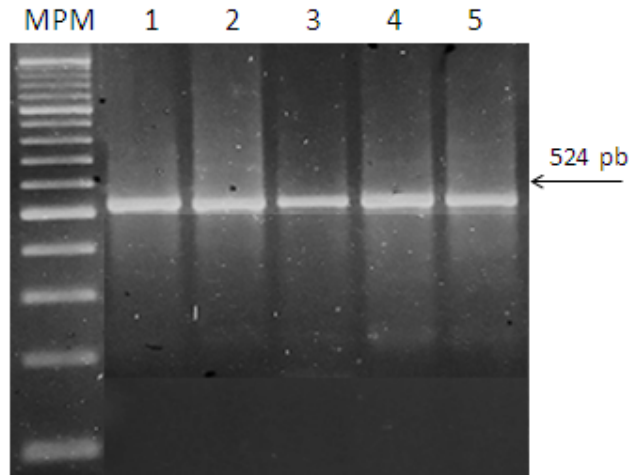


Figura 3B: Se muestran productos de PCR para el gen IL-6R de 524 pares de bases (carril 1 al 5), MPM corresponde al marcador de peso molecular de 100 pb.

Digestión del gen *IL-6* con la enzima *Nla III*

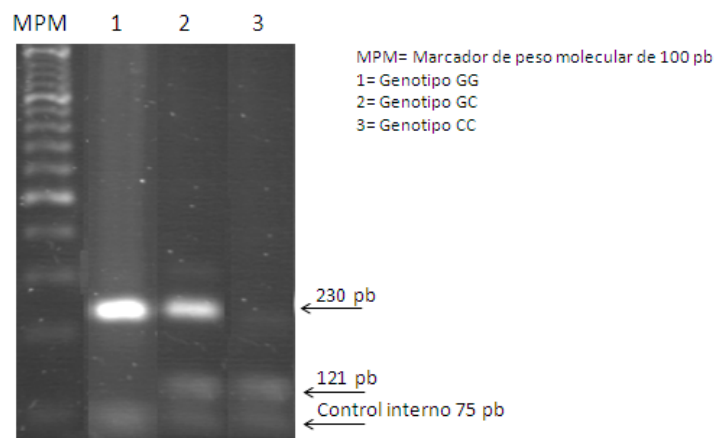


Figura 4 : Se muestran la digestión del gen *IL-6* con la enzima *Nla III* para la determinación del SNP -174 *IL-6* (G>C), se observa el genotipo GG en el carril 1 (230 pb, 75 pb), genotipo GC en el carril 2 (230 pb, 121 pb y 75 pb) y el genotipo CC en el carril 3 (121 pb y 75 pb).

GENOTIPIFICACIÓN DE LOS PACIENTES

Se determinó el genotipo del gen *IL-6* (SNP -174 (G>C)), en 18 pacientes con Neuroblastoma y 18 controles sanos.

- Se identificó el genotipo homocigoto silvestre (GG) en 12 pacientes (66.7%) con Neuroblastoma y en 4 pacientes sanos (22.2%).

- El genotipo heterocigoto (GC) se encontró en 6 pacientes con Neuroblastoma (33.3%) y en 6 de los pacientes sanos (33.3%).
- El genotipo homocigoto variante (CC) no se encontró en pacientes enfermos y se observó en 8 individuos sanos (44.5%).

Tabla 17 : Frecuencias por genotipo del SNP -174 (G>C) del gen IL-6 .

Frecuencias por genotipo para el SNP -174 (G>C) del gen IL-6				
Genotipo	Número de pacientes n=18	Frecuencia %	Individuos sanos n=18	Frecuencia %
GG	12	66.7%	4	22.2%
GC	6	33.3 %	6	33.3%
CC	0	0	8	44.5 %

- Las frecuencias alélicas en pacientes con Neuroblastoma para el alelo G fue de 83.3% y 16.7% para el alelo C.
- En los pacientes sanos las frecuencias alélicas fue del 38.9% para el alelo G y 61.1% para el alelo C.

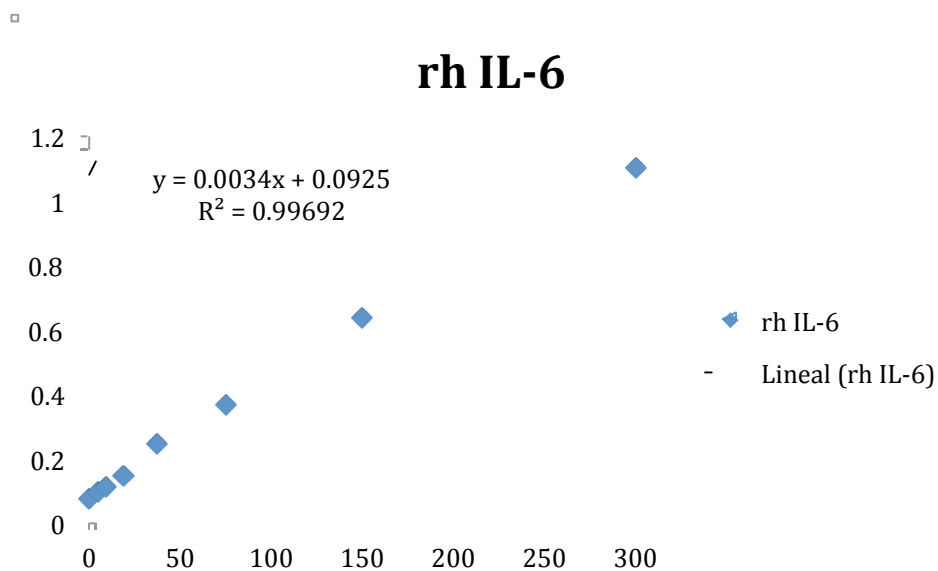
Tabla 18 : Frecuencias por alelo del SNP -174 (G>C) del gen IL-6 .

Frecuencias alélicas para el SNP -174 (G>C) del gen IL-6				
Alelo	Número de alelos n=36	Frecuencia %	Individuos sanos n=36	Frecuencia %
G	30	83.3 %	14	38.9%
C	6	16.7 %	22	61.1%

RESULTADOS DETERMINACIÓN DE NIVELES DE IL-6 EN SUERO

Para el análisis de IL-6 en suero se eliminaron 4 muestras por considerarse muestra insuficiente. Se analizaron un total de 14 muestras de sangre periférica de niños sanos utilizados como controles, los niveles séricos de IL-6 en este grupo control fueron indetectables. En los 14 pacientes con Neuroblastoma analizados los niveles de IL-6 fueron de indetectables a 3,410 pg/mL.

Curva tipo de referencia para la determinación de niveles de IL-6 en suero



15. DISCUSIÓN

De acuerdo a lo reportado en la literatura se ha observado que existe asociación del SNP -174 (G>C) como factor pronóstico en pacientes con Neuroblastoma. En nuestro estudio los pacientes analizados presentaron alta frecuencia de alelo G (83.3%) el cual ha sido reportado con mal pronóstico, niveles elevados de IL-6 en suero y progresión del Neuroblastoma. Al analizar esta frecuencia con los estadios de cada paciente no se observó una diferencia marcada entre el genotipo de -174 (G>C) y la estadificación de riesgo (alto, intermedio y bajo riesgo) ya que todos los pacientes presentaron al menos un alelo G considerado de mal pronóstico.

Es importante mencionar que ninguno de los pacientes analizados presentó el genotipo CC el cual ha sido asociado con mejor pronóstico, mejores tasas de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global.

Es importante mencionar que no contamos con las pruebas moleculares (amplificación de N-Myc o delección del 11q) necesarias para la estadificación por lo que en nuestro instituto la determinación del pronóstico se establece en relación a los factores clínicos e histopatológicos.

Por otro lado al analizar las frecuencias de genotipos para el SNP-174 (G>C) de los pacientes con neuroblastoma, en comparación con los individuos sanos utilizados para la estandarización de la técnica se encontró una marcada diferencia entre la frecuencia por genotipo para este SNP, 66.7% de los pacientes con Neuroblastoma presentaron el genotipo GG en comparación con 22.2% en población sana, la frecuencia para este genotipo es un poco mayor comparada con la reportada por Lagmay y cols (57.3% para GG) en un estudio realizado en 96 pacientes con Neuroblastoma. Además en la cohorte de pacientes analizada no encontramos genotipo CC y en la población sana la frecuencia fue de 44.5% para CC, siendo este reportado en la literatura como de buen pronóstico. Esta relación se observó claramente en el análisis de frecuencias por alelo ya que los pacientes con Neuroblastoma presentaron una frecuencia de 83.3% para el alelo G en comparación con los individuos sanos en los que se presentó una frecuencia del 38.9%, esto nos indica que el SNP-174 (G>C) puede ser un posible biomarcador de riesgo a Neuroblastoma en población mexicana.

El análisis de los niveles de IL-6 reportados en la literatura para pacientes con Neuroblastoma va de indetectable hasta 90 pg/mL, en este análisis no se identificaron niveles elevados de IL-6 en ninguno de los controles sanos evaluados, todos reportando niveles indetectables de IL-6. Con respecto a la cohorte estudiada se evaluaron 14 pacientes ya que 4 muestras fueron consideradas insuficientes para el análisis de la citocina. Dentro de los evaluados se reportó un nivel de IL-6 indetectables en el 85.7% de los casos, independientemente de su genotipificación, características clínicas o estado de la enfermedad.

Se reportaron dos casos con elevación de IL-6, el primero de ellos con un nivel de 112.5 pg/mL con valor por encima de lo reportado en la literatura. Esta una paciente con enfermedad controlada, diagnosticada inicialmente con un neuroblastoma paraespinal metastásico, con histología desfavorable con presencia de índice de mitosis/cariorrexis bajo y poco diferenciado quien presenta síndrome de Horner y quien se consolidó con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas autólogo y quien actualmente continúa su mantenimiento con ácido 13-cis-retinoico. Esta paciente con reporte de genotipo GC.

El segundo caso reportado con elevación de IL-6 llama la atención por encontrarse muy por encima de lo reportado en la literatura, con un nivel sérico de IL-6 en 3,410 pg/mL. Llama la atención que en el caso de esta paciente al momento de la toma de IL-6 presentaba síndrome de Kinsbourne activo, la paciente inicialmente diagnosticada con un neuroblastoma suprarrenal izquierdo. Se observó que al diagnóstico se consideró de bajo riesgo al presentar una histología favorable, reportada como diferenciado, no contamos con reporte histopatológico del índice de mitosis/cariorrexis. Dicha paciente presentó un genotipo GC. Actualmente se considera a la paciente en vigilancia del neuroblastoma desde 2 años previo a la medición de IL-6. Consideramos que la elevación de IL-6 puede encontrarse asociada a síndromes paraneoplásicos en el neuroblastoma, ya que ambas pacientes presentan un síndrome paraneoplásico activo durante la cuantificación de IL-6, sin embargo no se encontraron reportes en la literatura que asociaran los niveles séricos de citocinas con la actividad paraneoplásica del Kinsbourne. Actualmente la paciente se encuentra con enfermedad controlada, en tratamiento con ciclofosfamida, gammaglobulina y esteroide.

No se encontraron reportes en la literatura de niveles de IL-6 tan elevados como los documentados en este estudio en pacientes con diagnóstico de neuroblastoma. Lo anterior, abre nuevas líneas de investigación para documentar el papel que juegan estas citocinas en los síndromes paraneoplásicos y otras manifestaciones de actividad tumoral. Igualmente que ambas pacientes presentaron un genotipo GC, con un alelo de mal pronóstico como comentado previamente.

Es importante considerar por otro lado, que la adecuada estadificación de estos pacientes permite la administración de un tratamiento más personalizado y dirigido al riesgo, lo que disminuirá a corto, medio y largo plazo las comorbilidades asociadas a la administración de quimioterapia. Por lo que de acuerdo a la revisión realizada, es necesario estandarizar los criterios de evaluación de la respuesta, así como actualizar estos para seguir los estándares internacionales. Esto permitirá estratificar de manera más adecuada a los pacientes logrando ofrecer un tratamiento personalizado con disminución de toxicidad y comorbilidades, como 2º neoplasias y efectos tardíos en los supervivientes.

Para llevar a cabo una adecuada estadificación se requiere una estandarización del proceso diagnóstico y de seguimiento, integrar al diagnóstico las técnicas de biología molecular. En la realización de este estudio observamos que es necesario incrementar la descripción histopatológica para definir de forma adecuada el grado de diferenciación así como el índice de mitosis/cariorexis. Además como se mencionó previamente hasta la fecha no contamos con determinación de la amplificación del N-MYC ni delección del 11q.

El presente es el primer estudio en analizar frecuencias de estos SNP's en población mexicana, con los resultados de las frecuencias por genotipo y alelo para cada polimorfismo analizado tanto en los pacientes con Neuroblastoma y un grupo de pacientes sanos se muestran diferencias marcadas, que pueden ser importantes en el desarrollo y progresión de la enfermedad por lo cual es necesario continuar con el análisis de los polimorfismos -174 G>C en población mexicana con Neuroblastoma incluyendo una mayor cantidad de pacientes, además de analizar los niveles de IL-6 en suero, así como comparar dichos resultados con los factores de riesgo establecidos en los criterios internacionales como es la amplificación del N-Myc y niveles de ferritina, para poder establecer el papel pronóstico de estos polimorfismos.

16. CONCLUSION

- El alelo G del SNP -174 IL-6 (G>C) se presentó con mayor frecuencia en pacientes con Neuroblastoma que en individuos sanos.
- Probablemente el alelo G del SNP 174 IL-6 (G>C) y los niveles séricos de IL-6 pueden tener un rol importante en el desarrollo y progresión del Neuroblastoma, como posibles biomarcadores de mal pronóstico.
- Es necesario incluir un mayor cantidad de pacientes para determinar el impacto pronóstico de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y niveles de IL-6.

17. LIMITACION DEL ESTUDIO

El periodo de tiempo para llevar a cabo el seguimiento y evaluar supervivencia libre de evento y enfermedad.

La incidencia de la enfermedad es baja, lo cual limita la población de estudio.

En el Hospital Infantil de México Federico Gómez no se cuenta con determinación de la amplificación del N-MYC en el tejido del neuroblastoma, por lo cual no es posible estandarizar los factores pronósticos como se lleva a cabo en otros países que tratan esta enfermedad.

18. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN
Revisión bibliográfica	X	X	X	X				
Obtención muestras			X	X	X	X	X	
Procesamiento muestras				X	X	X	X	X
Obtención resultados					X	X	X	X
Elaboración base d datos							X	X
Análisis estadístico								X
Análisis de resultados								X
Discusión y conclusiones								X

BIBLIOGRAFIA

1. **Bleyer A; O'Leary, M; Barr, R.** *Cancer epidemiology in older adolescents and young adults, including SEED incidence and survival: 1975-2000.* Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2006
2. **Comisión Nacional de Protección Social en Salud.** Fondo de Protección Contra Gastos Catastróficos 2008-2013.
3. **Comisión Nacional de Protección Social en Salud.** Fondo de Protección Contra Gastos Catastróficos 2008-2013 , Dirección General de Información en Salud. Estimaciones de población no derechohabiente 2000-2018
4. **Dirección General de Epidemiología.** Sistema Estadístico Epidemiológico de las Defunciones (SEED).
5. **Foucher, S, E, Stiller C, Lacour B,** et al. *International classification of childhood cancer, third edition.* Cancer 2005;103(7):1457–1467
6. **Pizzo, Philip A.** *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* 7th.Lippincott Williams & Wilkins.2016.
7. **Gurney , J G, Davis , S and Severson , R K,**et al.*Trends in cancer incidence among children in the U.S. . US .Cancer;* 199678:532–541.
8. **Gurney , J G, Ross , J and Wall, D A,** et al. *Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992.* J Pediatr Hematol Oncol,1997;19:428–432.
9. **Heck , J E, Hung , R J and Ritz, B,**et al.*The epidemiology of neuroblastoma: a review.* Paediatr Perinat Epidemiol. 2009;23:125–143.
10. **Olshan , A F and Bunin , G R,**et al. *Epidemiology of neuroblastoma. Neuroblastoma.* In: Brodeur G M, Sawada T and Tsuchida Y, et al. eds.. Neuroblastoma Amsterdam.The Netherlands: Elsevier Science B.V.2000:33–39.
11. **Diagnóstico y tratamiento del neuroblastoma en el paciente pediátrico;** México: Secretaría de Salud; 2010.
12. **Juárez-Vilegas L, Zapata –Tarréz M,** et al, *Resultados del tratamiento de niños con neuroblastoma en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.* Gaceta Mexicana de Oncología. 2014;13(1):26-30
13. **Kaneko Y, Y and Cohn , S L,** et al. *Ploidy and cytogenetics of neuroblastoma.Neuroblastoma.* In: Brodeur G M, Sawada T and Tsuchida Y. Neuroblastoma Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V, 2000:41–56.
14. **Deyell RJ, Attiyeh EF.** *Advances in the understanding of constitutional and somatic genomic alterations in neuroblastoma.* Cancer Genet 2011;204(3):113–121
15. **JanoueixLerosey I, Schleiermacher G, Michels E,** et al. *Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma.* J Clin Oncol 2009;27(7):1026–1033.
16. **Mosse YP, Diskin SJ, Wasserman N,** et al. *Neuroblastomas have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional gene expression.* Genes Chrom Cancer 2007;46(10):936–949.
17. **Tomioka N, Oba S, Ohira M,** et al. *Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature* Oncogene 2008;27(4):441–449.

18. **Vandesompele J, Baudis M, De Preter K, et al.** *Unequivocal delineation of clinicogenetic subgroups and development of a new model for improved outcome prediction in neuroblastoma.* J Clin Oncol 2005;23(10):2280–2299.
19. **Look, A T, Hayes , F A and Nitschke , R, et al.** *Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma.* N Engl J Med. 1984;311:231–235.
20. **Katzenstein , H, Bowman , L C and Brodeur , G M, et al.** *Prognostic significance of age, MYCN oncogene amplification, tumor cell ploidy, and histology in 110 infants with stage D(S) neuroblastoma: the pediatric oncology group experience—a Pediatric Oncology Group stu.* J Clin Oncol.1998;16:2007–2017.
21. **Bagatell , R, Beck-Popovic , M and London , W B, et al.** *Significance of MYCN amplification in international neuroblastoma staging system stage 1 and 2 neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group database.* J Clin Oncol. 2009;27:365–370.
22. **Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, et al.** *Amplified DNA with limited homology to MYC cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and neuroblastoma tumour.* Nature 1983;305(5931):254-248
23. **Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, et al.** *Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc.* Nature 1984;308(5956):288-291
24. **Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, et al.** *Amplification of N-myc in untreated human neuroblastoma studied by comparative genomic hybridization.* Genes Chromosomes Cancer 1998;23(2):141-152.
25. **Brodeur GM.** *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma.* Nat Rev Cancer 2003;3(3)203-216
26. **Chen Y, Takita J, Choi YL.** *Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma.* Nature2008;455(7215):971-974.
27. **George RE, Sanda T, Hanna M, et al.** *Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma.* Nature 2008;455(7215):975-978
28. **Bown, N, Cotterill S, S and Lastowska , M, et al.** *Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma.* N Engl J Med; 1999;340:1954–1961.
29. **Plantaz, D, Vandesompele , J and Van Roy , N, et al.** *Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification.* Int J Cancer.2001;91:680–686.
30. **Shimada , H and Roald , B,et al.** *Histology: tumors of the neuroblastoma group. Neuroblastoma. Amsterdam, Netherlands. In: G M Brodeur , et al., eds. Elsevier Science ,2000:341-354.*
31. **Brodeur , G M, Pritchard , J and Berthold , F,et al.** *Revisions in the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment.* J Clin Oncol.1993;11:1466–1477.
32. **Brodeur , G M, Seeger , R C and Barrett , A.** *International criteria for diagnosis, staging and response to treatment in patients with neuroblastoma.* J Clin Oncol. 1988;6:1874–1881.
33. **Kushner , B H, et al.** *Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies.* J Nucl Med. Julio 2004;45:7:1172-1188.

34. **Brodeur , G M, Pritchard , J and Berthold , F, et al.** *Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment.* J Clin Oncol. Agosto 1993;11:8:1466-1477.
35. **Monclair , T, Brodeur , G M and Ambros , P F, et al.** *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System: An INRG Task Force Report.* J Clin Oncol.2008;27:298–303.
36. **Cohn , S L, et al., et al.,** INRG Task Force. *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system.* J Clin Oncol.2009;27:10:289-297.
37. **Kushner , B and Cohn , S L, et al.** *Treatment of Neuroblastoma.* In *Neuroblastoma.* In: Cheung N and Cohn S. Springer-Verlag. Berlin.2005:124-138.
38. **El Shafie, M, Samuel , D and Klippel CH, CH, et al.** *Intractable diarrhea in children with VIP-secreting ganglioneuroblastomas.* J Pediatr Surg.1983;18:34–36.
39. **Kaplan , S, Holbrook , C and McDaniel , H, et al.** *Vasoactive intestinal peptide secreting tumors of childhood.* Am J Dis Child.1980;134:21–24.
40. **Muller , J M, Philippe , M and Chevrier , L, et al.** *The VIP-receptor system in neuroblastoma cells.* Regul Pept. 2006;137:34–41.
41. **Hayward , K, Jeremy , R J and Jenkins , S, et al.** *Long-term neurobehavioral outcomes in children with neuroblastoma and opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome: relationship to MRI findings and anti-neuronal antibodies.* J Pediatr. 2001;139:552–559.
42. **Mitchell , W G, Davalos-Gonzalez , Y and Brumm , V L.** *Opsoclonus-ataxia caused by childhood neuroblastoma: developmental and neurologic sequelae.* Pediatrics . 2002;109:86–98.
43. **Huang , E J and Reichardt , L F, et al.** *Trk receptors: roles in neuronal signal transduction.* Annu Rev Biochem. 2003;72:609–642.
44. **Nakagawara, A., et al.** *Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development.* Cancer Lett.2001;169:107–114.
45. **Patapoutian , A and Reichardt , L F, et al.** *Trk receptors: mediators of neurotrophin action.* Curr Opin Neurobiol. 2001;11:272–280.
46. **Guo , C, White , P S and Weiss , M J. , et al.** *Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas.* Oncogene.1999:4948–4957.
47. **Beiske , K, Burchill, S A and Cheung , I Y, et al.** *Consensus criteria for sensitive detection of minimal neuroblastoma cells in bone marrow, blood and stem cell preparations by immunocytology and QRT-PCR: recommendations by the International Neuroblastoma Risk Group Task Force.* Br J Cancer.2009; 100:1627–1637.
48. **Breslow , N and McCann B., B, et al** *Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma.* Cancer Res.1971;31:2098–2103.
49. **Castleberry , R P, Cantor , A B and Green , A A, et al.** *Phase II investigational window using carboplatin, iproplatin, ifosfamide, and epirubicin in children with untreated disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group Study.* J Clin Oncol.1994;12:1616–1620.
50. **Kellie , S J, DeKraker , J and Lilleyman , J S, et al.** *Ifosfamide in previously untreated disseminated neuroblastoma. Results of Study 3A of the European Neuroblastoma Study Group.* Eur J Cancer Clin Oncol. 1988;24:903.
51. **Kretschmar, C S, Kletzel , M and Murray, K, et al.** *Response to paclitaxel, topotecan, and topotecan-cyclophosphamide in children with untreated disseminated*

- neuroblastoma treated in an upfront phase II investigational window: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2004;22:4119–4126.
52. **Frantz , C N, London , W B and Diller , L, et al.** *Recurrent neuroblastoma: randomized treatment with topotecan + cyclophosphamide (T+C) vs. topotecan alone(T). A POG/CCG Intergroup Study.* ASCO Annual Meeting.2004. Abstract no. 8512.
 53. **Bagatell , R, Wagner, L M and Cohn , S L., et al.** *Irinotecan plus temozolomide in children with recurrent or refractory neuroblastoma: a phase II Children's Oncology Group study.* *J Clin Oncol.* 2009;27:100-11.
 54. **Kushner , B H, Kramer , K and LaQuaglia MP, M P, et al.** *Curability of recurrent disseminated disease after surgery alone for local-regional neuroblastoma using intensive chemotherapy and anti-G(D2) immunotherapy.* *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003; 25:515–519.
 55. **Perez, C A, Matthay , K K and Atkinson, J B, et al.** *Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a Children's Cancer Group study.* *J Clin Oncol.* 2000;18:18–26.
 56. **Nuchtern , J G, et al.** *Perinatal neuroblastoma.* *Semin Pediatr Surg.*2006;15:10–16.
 57. **Strother , D R, London , W B and Schmidt , M L, et al.** *Surgery alone or followed by chemotherapy for patients with stages 2A and 2B neuroblastoma: results of Children's Oncology Group Study.* *Advances in Neuroblastoma Research.* Los Angeles,2006.
 58. **Segreti , J A, Polakowski , J S and Koch , K A, et al.** *Tumor selective antivascular effects of the novel antimitotic compound ABT-751: an in vivo rat regional hemodynamic study.* *Cancer Chemother Pharmacol.*2004;54:273–281.
 59. **Cho, S Y, Adamson, P C and Hagey , A E, et al.** *Phase I trial and pharmacokinetic (PK) study of ABT-751, an orally bioavailable tubulin binding agent, in pediatric patients with refractory solid tumors [ASCO Annual Meeting Proceedings 2004].* *J Clin Oncol.*2004;22:20.
 60. **Baker, D L, Schmidt , M and Cohn , S, et al.** *A phase III trial of biologically-based therapy reduction for intermediate risk neuroblastoma.* *J Clin Oncol;*2007;25:9504.
 61. **Matthay , K K, Perez , C and Seeger , R C, et al.** *Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a Children's Cancer Group study.* *J Clin Oncol.*1998;16:1256–1264.
 62. **Cheung , N V and Heller , G, et al.** *Chemotherapy dose intensity correlates strongly with response, median survival, and median progression-free survival in metastatic neuroblastoma [see comments].* *J Clin Oncol.*1991;9:1050–1058.
 63. **Hartmann , O and Berthold , F, et al.** *Treatment of advanced neuroblastoma: the European experience. In: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, et al., eds. Neuroblastoma.* Amsterdam. The Netherlands Elsevier Science B.V.2000:437–452.
 64. **Matthay , K K and Castleberry , R P, et al.** *Treatment of advanced neuroblastoma: the U.S. experience. Neuroblastoma.. In: Brodeur G M, Sawada T and Tsuchida Y. The Netherlands: Elsevier Science. Amsterdam.*2000:417–436.
 65. **Ladenstein, R, Philip , T and Lasset , C., et al.** *Multivariate analysis of risk factors in stage 4 neuroblastoma patients over the age of one year treated with megatherapy and stem-cell transplantation: a report from the European Bone Marrow Transplantation Solid Tumor Registry.* *J Clin Oncol.* 1998;16: 953–965.
 66. **Borriello L, Seeger R, et al.** *More than genes, the tumor microenvironment in neuroblastoma.* *Cancer Letters,* 380:2016: 304-314.

67. **Ferreti E, Cocco C, Airoidi I, Pistoia V.** *Targeting acute myeloid leukemia cells with cytokines.* Journal of Leukocyte Biology, 2012, Vol. 92: 567-575
68. **Lippitz, B.** *Cytokines patterns in patients with cancer: a systematic review.* The Lancet, Vol 14, 2013:
69. **Panday S, Singh S, Anang V, et al.** *Pattern Recognition Receptors in Cancer Progression and Metastasis.* Cancer Growth and Metastasis 2015;8: 25-35
70. **Boonham N, Kreuze J, Winter S, et al.** *Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing.* Virus research 186 (2014) 20-31
71. **Koziel J, Maciag A, et al.** *Phagocytosis of Staphylococcus aureus by Macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors.* Plosone April 2009 (4); 4 eS210
72. **Cheng XY, Li, J.** *Biological activity of cytotoxic dendritic cells cocultured with cytokine-induced killer cells and their effect on acute leukemia cells.* Genetics and molecular research 14(4): 13208-13214 (2015)
73. **Grivennikov S, Florian G, Kerin M.** *Immunity, inflammation and cancer.* Cell 140, 883-899, March 19, 2010
74. **Hunter C, Jones S.** *IL-6 as a keystone cytokine in health and disease.* Nature Immunology Volume 16, 5, May 2015.
75. **Tasnim A, Lipig S, et al.** *Interleukin-6 in the bone marrow microenvironment promotes the growth and survival of neuroblastoma cells.* Cancer Res. 2009 January 1; 69(1): 329-337
76. **Grivennikov S, Karin M.** *Inflammation and oncogenesis: a vicious connection.* Curr Opin Genet Dev. 2010 Feb; 20(1): 65.
77. **Mauer J, Denson J, Brürning J.** *Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer.* Trends in immunology, Feb(2015), vol 35;2
78. **Totaro F, Cimmino F, Pignataro P, et al.** *Impact of interleukin-6 -174G>C gene promoter polymorphism on Neuroblastoma.* Plosone, oct(2013) vol 8;10,e76810
79. **Grivennikov SI, Karin M.** *Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage.* Ann Rheum Dis. 2011 70 Suppl1:i104-8.
80. **Vendramini-Costa DB, Carvalho JE.** *Molecular link mechanisms between inflammation and cancer.* Curr Pharm Des. 2012;18(26):3831-52
81. **Medzhitov R.** *Origin and physiological roles of inflammation.* Nature 2008;454 (7203):428-35.
82. **Medzhitov R.** *Inflammation 2010: new adventures of old flame.* Cell 2010; 19-40 (6):771-6.
83. **Hunter CA, Jones SA.** *IL-6 as a keystone cytokine in health and disease.* Nat Immunol. 2015 May;16(5):448-57.
84. **Ghandadi M, Sahebkar A.** *Interleukin-6: A Critical Cytokine in Cancer Multidrug Resistance.* Curr Pharm Des. 2015 Nov 24.

85. **Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R.** *Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions.* Nat Rev Cancer. 2014 Nov;14(11):736-46.
86. **Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL.** *The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer.* Eur J Cancer. 2005 Nov;41(16):2502-12.
87. **Lagmay JP, London WB, Gross TG, Termuhlen A, Sullivan N, Axel A, Mundy B, Ranalli M, Canner J, McGrady P, Hall B.** *Prognostic significance of interleukin-6 single nucleotide polymorphism genotypes in neuroblastoma: rs1800795 (promoter) and rs8192284 (receptor).* Clin Cancer Res. 2009 Aug 15;15(16):5234-9.
88. **Grivennikov SI, Karin M.** *Inflammation and oncogenesis: a vicious connection.* Curr Opin Genet Dev. 2010 Feb;20(1):65-71
89. **Liao C, Yu Z, Guo W, Liu Q, Wu Y, Li Y, Bai L.** *Prognostic value of circulating inflammatory factors in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis.* Cancer Biomark. 2014;14(6):469-81.
90. **Naugler WE, Karin M.** *The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer.* Trends Mol Med. 2008 Mar;14(3):109-19.
91. **Tanaka T, Kishimoto T.** *The biology and medical implications of interleukin-6.* Cancer Immunol Res. 2014 Apr;2(4):288-94.
92. **Rivera-Chavez FA, Peters-Hybki DL, Barber RC, O'Keefe GE.** *Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6 cytokine responses.* Shock. 2003 Sep;20(3):218-23
93. **Keller ET, Wanagat J, Ershler WB.** *Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor.* Front Biosci. 1996 Dec 1;1:d340-57
94. **De Michele A, Martin AM, Mick R, Gor P, Wray L, Weber B and et al.** *Interleukin-6 -174G>C Polymorphism is associated with improved outcome in High-Risk Breast Cancer,* Cancer research. 2003; 63: 8051-8056
95. **Totaro F, Cimmino F, Pignataro P, Acierno G, De Mariano M, Longo L, Tonini GP, Iolascon A, Capasso M.** *Impact of interleukin-6 -174 G>C gene promoter polymorphism on neuroblastoma.* PLoS One. 2013 Oct 21;8(10):e7681

1. ANEXOS

CARTA DE CONSENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

“Asociación de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6 en pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma en el Hospital Infantil de México”

Estamos invitando a su hijo(a) a participar en este estudio de investigación médica que se lleva a cabo en el Hospital Infantil de México Federico-Gómez, en el departamento de Hemato-Oncología.

El estudio tiene como objetivo estudiar la información de las células de su hijo (a) y asociarlo con la evolución del tratamiento que le realizarán a su hijo (a).

JUSTIFICACION:

El Neuroblastoma es una enfermedad que afecta a niños y tiene diferentes características, en algunos casos se cura fácilmente y en otros casos puede ser difícil su tratamiento el cual puede no funcionar.

Debido a que la información de algunas células puede estar relacionada con el desarrollo de la enfermedad y que las células malas lleguen a otras zonas del cuerpo. Es por ello que la información que se obtenga como resultado de este estudio nos dará datos que podrán ayudar a clasificar mejor a los pacientes y lograr en un futuro dar una mejor opción de tratamiento para niños en la situación de su hijo (a).

Su hijo(a) es candidato a participar en este estudio, su participación es completamente voluntaria y debe ser autorizada por los padres o tutores.

Siéntase con absoluta libertad y confianza de hacer las preguntas que desee sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Derecho y respeto de los participantes: La participación de su paciente en el estudio es enteramente voluntaria y usted como su tutor es libre de rehusar tomar parte o abandonar en cualquier momento el estudio, sin afectar ni poner en peligro la atención médica futura. Además tiene usted derecho a ser tratado con respecto a conocer el propósito del estudio y retirarse de el sin ninguna presión de los investigadores.

CARTA DE CONSENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

TITULO DEL ESTUDIO:

“Asociación de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6 en pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma en el Hospital Infantil de México”

Nombre del paciente _____

Nombre del tutor _____

Después de haber sido debidamente informado(a) sobre el objetivo del estudio y de haberme enterado que el estudio implica riesgo mínimo para mi hijo(a), he decidido aceptar voluntariamente la participación de mi hijo(a) en este proyecto.

Al aceptar por escrito la participación de su hijo(a), queda en el entendido que:

- La participación de su hijo(a) es completamente voluntaria.
- **No** se altera en ninguna forma el tratamiento de su hijo(a).
- Existe riesgo mínimo, ya que al momento de la obtención de la muestra de sangre de su hijo(a), se le realizará un piquete en el brazo de su hijo(a) y puede sentir un poco de dolor al introducir la aguja y surgir o no un moretón en el brazo de su hijo(a).
- Los estudios realizados en esta investigación **NO** tendrán ningún costo para el paciente.
- Se realizara una sola toma de 2 ml de sangre (aproximadamente 1 cucharadita) de los tubos utilizados para sus pruebas rutinarias.
- Se mantendrá en secreto la información relacionada con su persona.
- En cualquier momento puede retirar a su hijo(a) del estudio sin que esto afecte su tratamiento.
- Su hijo (a) podrá tener o no un beneficio directo y ayudar más adelante a los niños que tengan esta enfermedad.
- Usted tendrá acceso a la información y/o resultados que se obtengan sobre su hijo (a) como parte del estudio principal y esta información será proporcionada por el investigador.
- En caso de que usted tenga alguna duda relacionada al estudio, usted puede preguntarla a los investigadores.
- Los resultados obtenidos de este estudio podrán ser publicados a nivel nacional e internacional, manteniendo siempre la confidencialidad del paciente.

En el caso que tuviese cualquier duda, pregunta o queja relacionada a la conducción de este estudio, puedo discutirlo con los investigadores el Dr. Luis Enrique Juárez Villegas y la Dra.

Gabriela Hernández Pliego. Que se encuentran en el teléfono 52 28 9917 en la ext. 4205 y 4204 respectivamente.

Ante dos testigos y el investigador principal, firmo o imprimo mi huella dactilar como constancia de mi aceptación voluntaria en la participación de mi hijo(a) en este estudio, el día _____ del mes de _____ del 2017 en la Ciudad de México.

Firma o huella dactilar del padre o tutor

Testigo 1

NOMBRE	FIRMA
--------	-------

DIRECCIÓN	PARENTESCO
-----------	------------

Testigo 2

NOMBRE	FIRMA
--------	-------

DIRECCIÓN	PARENTESCO
-----------	------------

Investigador

Investigador

Dr. Luis Enrique Juárez Villegas

Dra. Gabriela Hernández Pliego

CARTA DE ASENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

TITULO DEL ESTUDIO:

“Asociación de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6 en pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma en el Hospital Infantil de México”

Nombre del paciente: _____ Edad: _____

Te estamos invitando a participar en este estudio de investigación médica que se realiza en el Hospital Infantil de México Federico-Gómez.

Objetivo:

El estudio tiene como objetivo estudiar la información de las células de tu sangre y asociarlo con el resultado del tratamiento que te realizarán.

Justificación:

El Neuroblastoma es una enfermedad que afecta a niños y tiene diferentes características, en algunos casos se cura fácilmente y en otros casos puede ser difícil su tratamiento el cual puede no funcionar.

Debido a que la información de tus células pueden estar relacionados con el desarrollo y que las células malas lleguen a otras zonas de tu cuerpo. Es por ello que los datos que se obtenga como resultado de este estudio darán información que podrá ayudar a clasificar mejor a los pacientes y lograr en un futuro una mejor opción de tratamiento.

Eres candidato a participar en este estudio, tu participación es completamente voluntaria y debe ser autorizada por tus padres o tutores y por ti.

Siéntete con absoluta libertad y confianza de hacer las preguntas que desees para aclarar tus dudas al respecto.

Derecho y respeto de los participantes: Tu participación en este estudio es completamente voluntaria y tanto tu como tus padres o tutores son libres de negarse a tomar parte o abandonar en cualquier momento el estudio, sin afectar ni poner en peligro tu atención médica futura. Además tienes derecho a ser tratado con respecto a conocer el propósito del estudio y retirarte de el sin ninguna presión de los investigadores.

CARTA DE ASENTIMIENTO VOLUNTARIO PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN.

TITULO DEL ESTUDIO:

“Asociación de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6 en pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma en el Hospital Infantil de México”

Nombre del paciente: _____ Edad: _____

Después de haber sido debidamente informado(a) sobre el objetivo del estudio y de haberme enterado que el estudio no tiene riesgo para mí, he decidido aceptar voluntariamente participar en este proyecto.

Al aceptar por escrito tu participación, queda en el entendido que:

- **No** se altera en ninguna forma tu tratamiento.
- Existe riesgo mínimo, ya que al momento de la obtención de la muestra de sangre, se te realizará un piquete y puedes sentir un poco de dolor al introducir la aguja y puede surgir o no un moretón en tu brazo.
- Los estudios realizados en esta investigación **NO** tendrán ningún costo.
- Se realizará una sola toma de 2 ml de sangre (aproximadamente 1 cucharadita) de los tubos utilizados para tus pruebas rutinarias.
- Se mantendrá en secreto la información relacionada con tu persona.
- En cualquier momento puedes retirarte del estudio sin que esto afecte tu tratamiento.
- Puedes tener o no un beneficio directo y ayudar más adelante a los niños que tengan esta enfermedad.
- Podrás conocer los resultados que se obtengan como parte del estudio y esta información te la dará el investigador.
- En caso de que tengas alguna duda relacionada al estudio, puedes preguntarla a los investigadores.
- Los resultados obtenidos de este estudio podrán ser publicados a nivel nacional e internacional, manteniendo siempre en secreto tus registros.

En caso que tengas cualquier duda, pregunta o queja relacionada con este estudio, puedes discutirlo con el investigador principal el Dr. Luis Enrique Juárez Villegas y la Dra. Gabriela Hernández Pliego Que se encuentran en el teléfono 52 28 9917 en la ext. 4205 y 4204 respectivamente.

Ante dos testigos y el investigador principal, firmo o imprimo mi huella dactilar como constancia de mi aceptación para participar voluntaria en este estudio, el día _____ del mes de _____, 2017 en la Cd. de México.

Firma o huella dactilar del padre o tutor

Testigo 1

NOMBRE FIRMA

DIRECCIÓN PARENTESCO

Testigo 2

NOMBRE FIRMA

DIRECCIÓN PARENTESCO

Investigador

Dr. Luis Enrique Juárez Villegas

Investigador

Dra. Gabriela Hernández Pliego