



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES DE INMUNIDAD
INNATA Y PREDISPOSICIÓN A CÁNCER PEDIÁTRICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

GABRIELA ABIGAIL ROSALES BRAVO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. GABRIELA ELISA MERCADO CELIS

ASESOR DE TESIS

DRA. RAQUEL RETANA UGALDE

MÉXICO D.F.

NOVIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

o

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios Superiores Zaragoza por mi formación académica.

A la Dra. Gabriela Elisa Mercado Celis directora de este trabajo, por su apoyo profesional al compartirme su experiencia y conocimientos, así como por su paciencia y tiempo brindado.

A la Dra. Raquel Retana Ugalde como asesora, por su gran calidad profesional y humana.

Al comité de sinodales Q.F.B. Francisco Javier Parada García, M. en C. Rodrigo Aníbal Mateos Nava y M. en C. Rosa Elba Galván Duarte, por su asesoría durante la revisión este trabajo.

Al Instituto de Medicina Genómica por sus instalaciones y equipamiento con lo que fue posible desarrollar el trabajo experimental. Al Dr. David Vázquez Fernández y Dra. Alejandra Virginia Contreras por su apoyo en el tratamiento estadístico de los resultados, y estudio de haplotipos. Al equipo de trabajo del laboratorio de oncogenómica pediátrica por su ayuda y amistad brindada durante mi estancia.

Al servicio de oncología del Hospital infantil de México “Federico Gómez”, por su colaboración en el proyecto de investigación. Al Dr. Miguel Ángel Palomo Colli, Dr. Luis Enrique Juárez Villegas y Dr. Pablo Lezama del Valle por su apoyo en el reclutamiento de los pacientes y revisión de expedientes, así como al personal de enfermería por la recolección de muestras.

Especialmente mi gratitud a los pacientes y padres de familia, gracias a cuya colaboración en este proyectos de investigación nada de esto sería posible.

o

DEDICATORIA

A mi familia por su apoyo libre de condiciones.

Especialmente a Mónica Bravo López por ser mi fuerza, luz y aliciente.

A mis amistades por su compañía y complicidad.

“Sueña alto, las estrellas se esconden en tu alma.

Sueña profundo, por que cada sueño precede a una meta.”

Pamela S. Vaull

“El genoma humano no es más que un manual de instrucciones para construir y hacer funcionar a un ser humano, en su interior se ocultan miles de genes y millones de otras secuencias que constituyen un tesoro de secretos filosóficos.”

Matt Ridley

RESUMEN

El cáncer en la infancia es una enfermedad que representa en México la primera causa de mortalidad en niños de 0 a 14 años después de los accidentes. En los niños, este padecimiento se produce con mucha mayor rapidez que en los adultos debido a que tiene diferente origen y comportamiento clínico el crecimiento celular es más rápido, agresivo e invasor, y más sensible a la quimioterapia debido a que las células tumorales suelen ser embrionarias e inmaduras.

La identificación de genes de susceptibilidad asociados a las enfermedades, es uno de los grandes desafíos en el campo de la genética humana. Dentro de las estrategias utilizadas para tal fin se encuentran los estudios de asociación en poblaciones entre grupos de casos y controles, en este tipo de estudios, se utilizan como marcadores genéticos a los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP`s) analizando a los alelos más comunes como marcadores que confieren un riesgo para el desarrollo de la enfermedad.

Mucho se ha avanzado en el estudio del cáncer y algunos de los factores etiológicos que lo predisponen. Se sabe que la interacción de factores génicos y estímulos ambientales provoca alteraciones celulares, que frecuentemente llevan a una proliferación anormal y que para eliminar estas aberraciones, el sistema inmune posee diversos mecanismos que le permiten reconocer y eliminar las células transformadas; Sin embargo, en algunas ocasiones, la respuesta inmune no es lo suficientemente efectiva para controlar el

o

crecimiento celular anormal o esta respuesta es nula, lo que trae como consecuencia el desarrollo de un tumor.

Debido a la importancia de los mecanismos inmunológicos implicados en la génesis tumoral, en este trabajo se evaluó la posible asociación de 10 polimorfismos en genes que regulan estas vías con el fin de encontrar una asociación entre la presencia de estas variaciones y el riesgo a padecer cáncer a temprana edad. Se estudiaron 101 casos pacientes del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" (HIM) con diagnóstico clínico de cáncer pediátrico confirmado y 274 controles todos ellos adultos sanos sin antecedentes de cáncer. Para cada polimorfismo se calcularon las frecuencias tanto genotípicas como alélicas y se evaluó el equilibrio de Hardy Weinberg (HWE). La asociación entre el cáncer y las variables categóricas, tales como son los polimorfismos seleccionados y otros potenciales confusores, se analizaron mediante la prueba chi-cuadrada de Pearson y odds ratio (OR), asimismo se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para analizar su asociación con la supervivencia a la enfermedad. En conclusión en este estudio se observó que las variantes génicas en los genes de IL6, IL8 e IL10-592 podrían estar asociadas a la predisposición de cáncer pediátrico en población mexicana, no se encontró asociación de los polimorfismos con la supervivencia a la enfermedad.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	9
2. MARCO TEÓRICO	11
2.1 EPIDEMIOLOGÍA	11
2.1.1 CÁNCER PEDIÁTRICO EN MÉXICO	11
2.1.2 CÁNCER PEDIÁTRICO EN EL MUNDO	15
2.2 ETIOLOGÍA	15
2.3 SISTEMA INMUNE INNATO Y SU RELACIÓN CON CÁNCER	18
2.3.1 SISTEMA INMUNE	18
2.3.2 INMUNIDAD INNATA	18
2.3.3 RELACIÓN DEL SISTEMA INMUNE CON PREDISPOSICION A CANCER	18
2.4 POLIMORFISMOS	21
2.4.1 POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO UNICO (SNP)	22
2.5 GENES Y POLIMORFISMOS EN CITOCINAS Y SUS RECEPTORES	23
2.5.1 INTERLEUCINA 6 (IL-6) -174G/C (RS1800795)	24
2.5.2 INTERLEUCINA 8 (IL-8) -251 A/T (RS4073)	26
2.5.3 INTERLEUCINA 10 (IL-10) O CSIF	27
2.5.4 RECEPTOR ASOCIADO A CINASA (IRAK1) -532 T/C (RS1059703)	28
2.5.5 INTERLEUCINA 1 RECEPTOR ANTAGONISTA (IL-1RN) +2018T/C (RS419598)	30
2.5.6 INTERLEUCINA 1 BETA (IL-1B) -511C/T(RS16944)	31
2.5.7 ANTÍGENO CD14 -159C/T(RS2569190)	33
2.5.8 TOLL LIKE RECEPTOR 4 (TLR-4) -1183G/A (RS4986790)	34
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
4. HIPÓTESIS	41
5. OBJETIVOS	41
5.1 GENERAL	41
5.2 PARTICULARES	41
6. MATERIAL Y MÉTODOS	42
6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	42
6.2 CRITERIOS DE INCLUSION, EXCLUSION, ELIMINACIÓN	43
6.3 VARIABLES	44
6.4 OBTENCIÓN DE MUESTRA SANGRE	45
6.5 EXTRACCIÓN DE ADN	45
6.6 CUANTIFICACION ADN	46
6.7 EVALUACIÓN DE INTEGRIDAD	47
6.8 GENOTIPIFICACIÓN	48
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
8. RESULTADOS	51
8.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	51
8.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN	55
8.3 GELES DE INTEGRIDAD	55
8.4 COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS DE SNP'S EN DIFERENTES POBLACIONES	57
8.5 EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG	60

8.6 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN CON POLIMORFISMOS	69
8.7 ANALISIS ASOCIACIÓN CON CARACTERÍSTICAS SEXO Y TIPO DE TUMOR	70
8.8 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA	73
8.8.1 SUPERVIVENCIA GLOBAL	73
8.8.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD	79
9. DISCUSIÓN	87
10. CONCLUSIONES	102
11. PERSPECTIVAS	103
12. ANEXOS	105
13. REFERENCIAS	109

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Frecuencia de cáncer en menores de 20 años según tipo histológico.....	13
Ilustración 2 Incidencia de cáncer pediátrico por entidad federativa en México	14
Ilustración 3 Tasas de mortalidad de cáncer pediátrico en México 1990-2008.	14
Ilustración 4 Incidencia de cáncer infantil por raza/grupo étnico	15
Ilustración 5 Termociclado PCR-tiempo real en detector Viiia7	50
Ilustración 6 Frecuencia según subtipo de cáncer pediátrico.....	54
Ilustración 7 Frecuencia según tipo de tumor.....	54
Ilustración 8 Visualización con luz UV de perfil electroforético de muestras en gel de agarosa al 1% con buffer TAE, marcador de peso molecular de 1000 pb.....	56
Ilustración 9 Diagramas Finetti equilibrio de Hardy-Weinberg	63
Ilustración 10 Gráfico Supervivencia global.....	74
Ilustración 11 Gráfico Supervivencia global vs diagnóstico	76
Ilustración 12 Gráfico Supervivencia global vs SNP's.....	78
Ilustración 13 Gráfico Supervivencia libre de enfermedad.....	80
Ilustración 14 Gráfico Supervivencia libre de enfermedad vs diagnóstico	82
Ilustración 15 Gráfico Supervivencia libre de enfermedad vs SNP's.....	84
Ilustración 16 Gráfico Supervivencia libre de enfermedad vs Haplotipo IL10... 86	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación Internacional de Cáncer Pediátrico (ICCC)	12
Tabla 2 Casos de cáncer en menores de 20 años según tipo histológico de tumor y sexo	13
Tabla 3 SNP's Candidatos, función y origen.....	36
Tabla 4 Estudios de SNP's candidatos implicados en predisposición a cáncer	37
Tabla 5 Sondas TaqMan Genotipificación	49
Tabla 6 Frecuencias controles, edad y sexo.	52
Tabla 7 Frecuencias casos sexo y edad	53
Tabla 8 Frecuencias según subtipo de cáncer pediátrico	53
Tabla 9 Concentración de ADN en muestras (casos).....	55

Tabla 10 SNP's Candidatos, Frecuencia en poblaciones en base a estudios reportados en HapMap.	58
Tabla 11 Resultados prueba χ^2 Pearson equilibrio HWE	62
Tabla 12 Equilibrio Hardy-Weinberg IRAK1 solo mujeres.....	66
Tabla 13 Resultados prueba coeficiente de consanguinidad (F)	68
Tabla 14 Resultados asociación entre casos y controles	70
Tabla 15 Resultados χ^2 Pearson asociación con sexo	71
Tabla 16 Resultados χ^2 Pearson asociación con tipo de tumor	72
Tabla 17 Supervivencia global.....	74
Tabla 18 Supervivencia global vs diagnóstico	75
Tabla 19 Supervivencia global vs SNP's	78
Tabla 20 Regresión Cox Supervivencia global	79
Tabla 21 Resultados Supervivencia libre de enfermedad.....	80
Tabla 22 Supervivencia libre de enfermedad vs diagnóstico	81
Tabla 23 Supervivencia libre de enfermedad vs SNP's	83
Tabla 24 Regresión Cox Supervivencia libre de enfermedad	85

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
OMS	Organización Mundial de la Salud
ICCC	International Classification of Childhood Cancer
NCBI	National Center for Biotechnology Information
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
STB	Tumor de tejido blando
PMN	Polimorfonucleares
NK	Natural Killer
IL	Interleucina
IRAK1	Receptor asociado a cinasa 1
IL1RN	Interleucina 1 receptor antagonista
TLR4	Receptor Toll like 4
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
IFN-β	Interferon beta
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
LPS	Lipopolisacarido
r.p.m.	Revoluciones por minuto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
HWE	Equilibrio de Hardy Weinberg
OR	Odds ratio
pb	Pares de base

1. INTRODUCCIÓN

A principios de este siglo inició lo que se conoce como la era genómica, partiendo de la secuenciación del genoma humano. La obtención de las secuencias de ADN de individuos de distintas regiones geográficas ha definido con mayor precisión la variación que existe dentro de los seres humanos. Conocer estas variaciones en el genoma humano nos puede permitir identificar algunos de los genes que confieren susceptibilidad o protección hacia ciertas enfermedades complejas, identificar la interacción de los mismos con los diversos factores ambientales e incluso predecir la respuesta al tratamiento de las enfermedades.

Los estudios de “asociación genética” buscan establecer la relación estadística entre variables genéticas poblacionales y un fenotipo determinado. Estos estudios están siendo utilizados para descubrir el componente genético asociado a las enfermedades comunes de alta prevalencia como la diabetes mellitus (DMT), la enfermedad coronaria, la insuficiencia cardíaca e incluso el cáncer. Se trata generalmente de estudios de cohorte o de tipo casos y controles, en los cuales se establece el peso relativo del componente genético con respecto a otros factores como el medio ambiente.

Habitualmente, en este tipo de estudios, se utilizan como marcadores genéticos a los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP`s). Estas variaciones pueden ser en sí mismas funcionales y estar relacionadas a la fisiopatología de la enfermedad, pero en la mayoría de los casos, son utilizadas para el mapeo y ubicación de las verdaderas variantes relevantes. Los SNP`s actúan como

o

improntas de nacimiento y su variedad caracteriza a los diferentes grupos poblacionales. Cada individuo es portador de un patrón propio de SNP's que lo identifica y que comparte con su grupo étnico. Sin embargo, es importante remarcar que la mayoría de las enfermedades son el producto de desórdenes genómicos complejos, es decir, generalmente el riesgo de una enfermedad esta dado por un conjunto de SNP's que participan de manera aditiva.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer infantil tiene gran importancia en el ámbito de la salud pública, hasta hace algunos años, esta patología era considerada una rareza por los médicos generales, sin embargo, actualmente el cáncer es la segunda causa de muerte en niños de 1 a 9 años, superado sólo por los accidentes (1).

2.1.1 CÁNCER PEDIÁTRICO EN MÉXICO

De acuerdo al reporte de la Secretaría de Salud, Subsecretaría de prevención y Dirección general de epidemiología, la población inscrita en el RCNA (Registro Nacional de Cáncer en Niños y Adolescentes) durante el periodo 2005-2010, asciende a 3 569 pacientes menores de 20 años, cuya distribución por sexo muestra un predominio masculino, con el 54.9% del total de los casos, en cuanto a la distribución por edad, la mayor concentración de los casos se ubican en el grupo de 10 a 14 años (53.4%), seguido del grupo de 5 a 9 años (30.7%) (1).

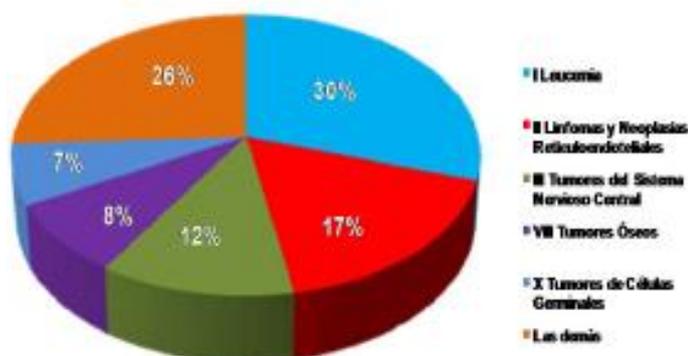
El cáncer infantil se clasifica siguiendo una categorización distinta a la que define al cáncer en adulto. Esta clasificación es una modificación de la “International Classification of Disease for Oncology” (ICD-O) de la OMS, que agrupa los tumores en 12 grandes categorías (Tabla 1), que a su vez engloban subgrupos que permiten estudiar hasta 40 tipos diferentes de tumores (International Classification of Childhood Cancer (ICCC)).

Tabla 1 Clasificación Internacional de Cáncer Pediátrico (ICCC)

I	Leucemias
II	Linfomas y otros tumores reticuloendoteliales
III	Tumores del sistema nervioso central
IV	Tumores del sistema nervioso simpático (neuroblastoma)
V	Retinoblastoma
VI	Tumores renales
VII	Tumores hepáticos
VIII	Tumores óseos
IX	Sarcomas de tejidos blandos
X	Neoplasia de células germinales, trofoblásticas y otras neoplasias gonadales
XI	Carcinoma y otras neoplasias malignas epiteliales
XII	Otros no especificados

En el análisis de los casos atendidos en las Unidades Médicas Acreditadas en México, de 2005 a 2010, se reportó que los primeros tres lugares, de acuerdo con el tipo histológico del tumor, lo ocupan: Leucemias (30%), Linfomas y Neoplasias Reticuloendoteliales (17.1%) y Tumores del Sistema Nervioso Central SNC (11.9%). Dentro de las Leucemias el diagnóstico más frecuente es la Leucemia Linfoblástica Aguda, siguiendo la Leucemia Mieloblástica Aguda, y la Leucemia Granulocítica; de los Linfomas, el más frecuente es el Linfoma Hodgkin, y en segundo lugar el Linfoma No Hodgkin. Respecto a los Tumores de SNC los más frecuentes en orden ascendente son el Astrocitoma, Meduloblastoma, Glioma, Ependimoma, y Tumor Neuroectodérmico Primitivo. Los sarcomas de partes blandas ocupan el cuarto lugar siendo el tipo más frecuente en este grupo el Rbdomiosarcoma (2). (Ilustración 1)

Porcentaje de casos de cáncer en menores de 20 años, según el tipo histológico de tumor. Unidades Médicas Acreditadas. Secretaría de Salud, 2005-2010



Fuente: CENAVECE/DGE/RCNA, 2005-2010

Ilustración 1 Frecuencia de cáncer en menores de 20 años según tipo histológico (2)

Tabla 2 Casos de cáncer en menores de 20 años según tipo histológico de tumor y sexo (2)

Unidades Médicas Acreditadas. Secretaría de Salud, 2005 - 2010

Tipo histológico*	Sexo				Total
	Masculino	%	Femenino	%	
I Leucemia	375	54.3	316	45.7	691
II Linfomas y neoplasias reticuloendoteliales	252	64.0	142	36.0	394
III Tumores del Sistema Nervioso Central	148	54.0	126	46.0	274
IV Tumores del Sistema Nervioso Simpático	39	49.4	40	50.6	79
V Retinoblastoma	51	54.8	42	45.2	93
VI Tumores renales	78	56.9	59	43.1	137
VII Tumores hepáticos	25	62.5	15	37.5	40
VIII Tumores óseos	99	52.4	90	47.6	189
IX Sarcomas de tejidos blandos	87	55.1	71	44.9	158
X Tumores de células germinales	87	54.0	74	46.0	161
XI Carcinomas y otras neoplasias epiteliales	10	38.5	16	61.5	26
XII Neoplasias inespecíficas	28	45.9	33	54.1	61
Subtotal	1,279	55.5	1,024	44.5	2,303
Total	1,959	54.9	1,610	45.1	3,569*

Fuente: CENAVECE/DGE/RCNA, 2005-2010

** Incluye 1,266 casos sin dato.

*Según Clasificación Internacional de Cáncer en la Niñez

En cuanto a la incidencia de cáncer pediátrico en el país por entidad federativa según datos actuales del RCNA, siete entidades (Michoacán, Veracruz, Oaxaca, Edo México, Chihuahua, Sinaloa y Sonora) concentran el 50% de los casos incorporados a dicho registro. En el extremo opuesto, las entidades de

o

Aguascalientes, Coahuila, Colima, Guerrero, Nuevo León, Quintana Roo y Tlaxcala, contribuyen con menos del 5% de los casos inscritos (Ilustración2) (2).

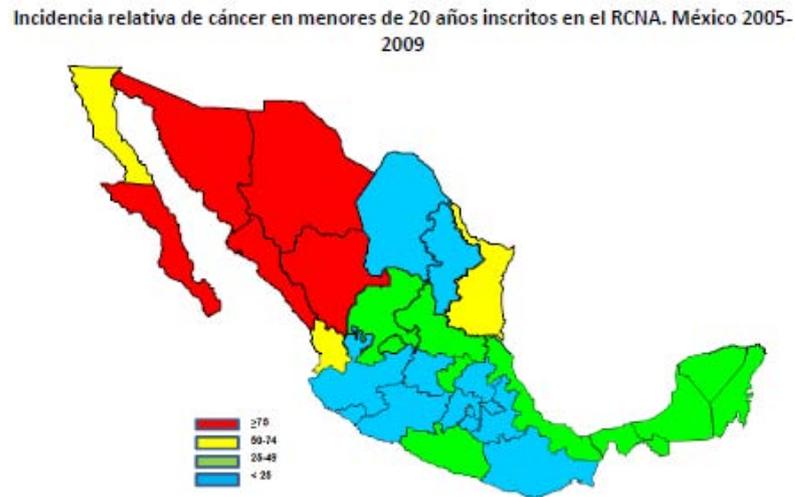


Ilustración 2 Incidencia de cáncer pediátrico por entidad federativa en el país de México (2)

La tasa de mortalidad en los menores de 20 años durante el periodo analizado fue de 5.4 muertes por 100,000 casos. Los grupos de edad con mayor mortalidad fueron los de 1 a 4 años y de 15 a 19 años (2). (Ilustración 3)

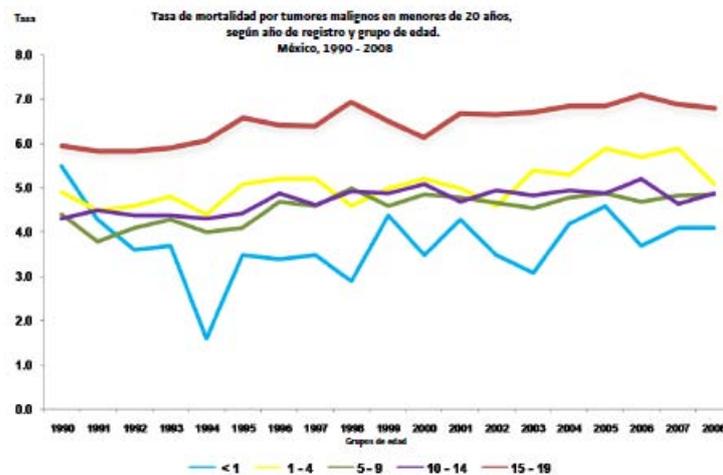


Ilustración 3 Tasas de mortalidad de cáncer pediátrico en México 1990-2008 (2)

2.1.2 CÁNCER PEDIÁTRICO EN EL MUNDO

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su reporte mundial de cáncer, indica que para la población infantil en las regiones de Europa, Norte América, y otras regiones desarrolladas, las tasas de incidencia son alrededor de 140 por millón de habitantes (Ilustración 4). Se estiman aproximadamente 160,000 nuevos casos, y 90,000 muertes en menores de 15 años de edad cada año por cáncer (3, 4).

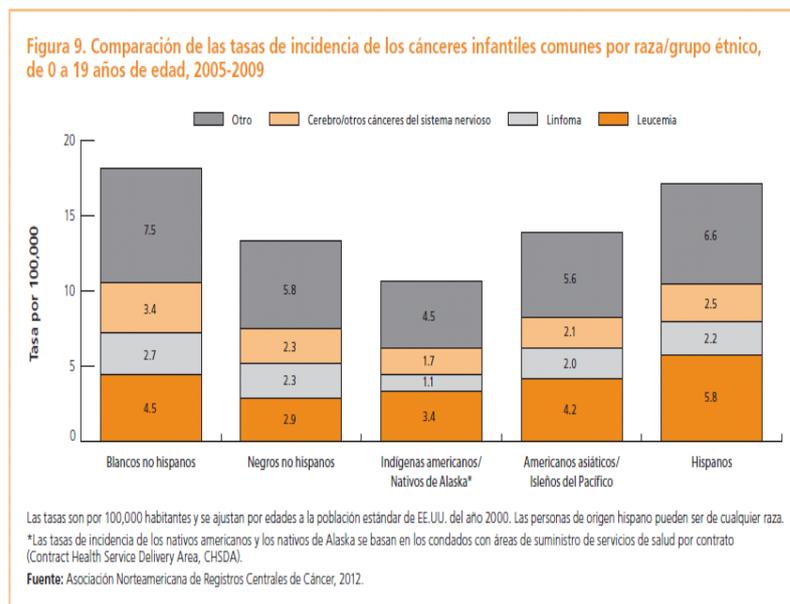


Ilustración 4 Incidencia de cáncer infantil por raza/grupo étnico (3, 4)

2.2 ETIOLOGÍA

El cáncer, tal como lo conocemos en los adultos, es una patología completamente diferente a la que se presenta en los niños. En edad infantil tiene diferente origen y comportamiento clínico, la mayoría de los tumores infantiles son de origen embrionario, en la mayoría de los casos no se han identificado factores ambientales que influyan en su desarrollo, al contrario de lo que sucede en el adulto. Sin embargo, los tumores infantiles presentan

o

diferencias geográficas y étnicas que son una posible expresión de riesgos ambientales, los cuales no han sido determinados hasta el momento (5).

La conducta clínica de los tumores pediátricos es más agresiva y son de crecimiento rápido, sin embargo, la respuesta del tumor a la quimioterapia y a la radioterapia es mejor que en los tumores del adulto ya que son tejidos más sensibles a estos tratamientos, por lo tanto la supervivencia también suele ser mayor (5).

Por otra parte, el incremento de la supervivencia en pacientes pediátricos hace necesario el estudio de los efectos secundarios adversos en órganos y tejidos a largo plazo incluso segundas neoplasias debidas a los tratamientos utilizados para curar el tumor primario (5).

La etiología del cáncer en general sigue siendo en gran parte desconocida, pero para la mayoría de ellos su origen es multifactorial (6). Sin embargo, sabemos que el cáncer tiene una base genética en donde células normales sufren una transformación progresiva, tras la adquisición multiseccuencial de mutaciones en su genoma, provocando finalmente la proliferación incontrolada de un clon celular en un determinado tejido, que escapa a los procesos naturales de senescencia y apoptosis, resultando en la inmortalización y posteriormente en la capacidad de invasión de tejidos anexos y distantes (metástasis) (7).

Los principales avances de los últimos años en el cáncer se ha dado en el campo de la genética, tanto en el descubrimiento de alteraciones genéticas que predisponen al cáncer (8, 9), como en la identificación de alteraciones genotípicas somáticas que modifican el comportamiento celular (crecimiento,

o

diferenciación y apoptosis). Estas alteraciones genómicas puede afectar a oncogenes, genes supresores, genes reparadores o genes interruptores (los que regulan las cascadas de señales intracelulares cinasas, fosforilasas) así como factores de transcripción. También es de gran importancia la existencia de alteraciones en genes que predisponen a errores en la replicación o reparación del ADN, tanto por daños producidos por factores endógenos como radicales libres y exógenos como, radiaciones ionizantes, radiación ultravioleta, agentes químicos y biológicos (virus, bacterias y hongos) (8).

En el caso de cáncer pediátrico los estudios de secuenciación de nueva generación han demostrado que en muchos casos son tumores silenciosos, es decir, presentan pocas mutaciones somáticas, como es el caso de leucemias, sarcomas etc., a diferencia de tumores en adultos donde se pueden identificar numerosas alteraciones somáticas. Por este motivo, aun cuando la segregación familiar explica un muy escaso número de casos, se ha propuesto que variantes genéticas germinales raras podrían tener un papel muy importante como factores causales en el cáncer pediátrico (8). Por este motivo, en la actualidad se están llevando a cabo diversos estudios y estrategias para poder identificar variantes raras de riesgo para cáncer infantil.

2.3 SISTEMA INMUNE INNATO Y SU RELACIÓN CON CÁNCER

2.3.1 SISTEMA INMUNE

El sistema inmune regula los procesos celulares y moleculares implicados en la defensa de la integridad biológica del organismo a través de la identificación de las sustancias propias y detección de las sustancias extrañas y su destrucción (10).

En cada organismo, los mecanismos de defensa son muy diversos y heterogéneos, aunque siempre existe una actuación integrada de todos ellos. Los mecanismos de defensa pueden ser de tipo inespecífico (innata) y específico (adaptativa), dependiendo de las circunstancias en unos casos predomina una u otra de estas modalidades de respuesta (10).

2.3.2 INMUNIDAD INNATA

La respuesta inespecífica o innata es la primera barrera defensiva del organismo y no requiere sensibilización previa. Las células que median esta respuesta inespecífica, son las células polimorfonucleares (PMN) neutrófilos, macrófagos y células natural killer (NK), que son células que se caracterizan por activarse de forma inmediata siempre que cualquier sustancia extraña penetra en el organismo, asimismo este tipo de respuesta es la encargada de los procesos de apoptosis celular (10).

2.3.3 RELACIÓN DEL SISTEMA INMUNE CON PREDISPOSICION A CANCER

El papel del sistema inmune en el reconocimiento tumoral y en su eliminación es conocido desde hace décadas. Su potencial es tal, que la mayoría de las personas sanas eliminan células tumorales a diario gracias a un eficaz sistema

o

inmune. Se han descrito en pacientes con cáncer, alteraciones del sistema inmune adaptativo como aumento de células T reguladoras, disminución de células T CD8 efectoras y aumento de citocinas reguladoras (11). Así, se ha encontrado que en diversos tumores los mecanismos de procesamiento y presentación de antígenos se encuentran alterados en grado diferente y expresan citocinas, quimiocinas, o factores de crecimiento, que inducen finalmente a tolerancia o evasión de la respuesta inmune en contra del tumor inhibiendo la respuesta antitumoral eficiente (12, 13).

Por otra parte se sabe que las células cancerosas son capaces de atraer diferentes tipos de células en el microambiente del tumor a través de la secreción de proteasas extracelulares, factores pro-angiogénicos y citocinas (10).

Las citocinas son pequeñas moléculas que pueden inhibir o propagar inflamación y activar o desactivar procesos celulares y sus vías. Existen diversos estudios que han demostrado la relevancia de las citocinas en el cáncer, en primer lugar, juegan un papel importante en el medio ambiente para el crecimiento y mantenimiento del tumor, los modelos animales knockout de algunas citocinas muestran predisposición para el desarrollo del cáncer, y por último, se ha encontrado evidencia que muestra que polimorfismos en genes que codifican para citocinas están asociados con mayor riesgo de enfermedades inflamatorias y cáncer (10, 11).

o

Con base en lo expuesto anteriormente, existe importante cuerpo de evidencia que muestra una clara relación entre el sistema inmune innato, mediante la participación de citocinas y el desarrollo de cáncer. Diversos autores han postulado teorías acerca de la relación entre el sistema inmune innato y el cáncer.

➤ INFLAMACIÓN

La inflamación crónica está implicada en la patogénesis de la mayoría de los cánceres más comunes. La asociación entre el cáncer y este proceso puede tener implicación como un agente causal, participando en la iniciación del tumor, la progresión temprana del tumor o favoreciendo la metástasis (13).

De manera general el proceso de inflamación se caracteriza por la infiltración del tejido dañado por leucocitos, inicialmente neutrófilos y mastocitos, que son reclutados como parte de un mecanismo celular multifactorial. Los mastocitos juegan un papel importante especialmente en la liberación de mediadores inflamatorios preformados almacenados que atraen a más células en respuesta a quimiocinas y citocinas promoviendo así la formación del tumor (10).

Las variaciones alélicas de los genes implicados en la inflamación pueden alterar los niveles de citocinas proinflamatorias y quimiocinas. Como se comentó previamente las variaciones en la expresión de citocinas podrían participar en el desarrollo y progresión de cáncer, por lo que diversos estudios han evaluado si los polimorfismos de genes de inmunidad innata se asocian con un aumento en el riesgo de cáncer, sin embargo la mayoría de los estudios se han realizado en población adulta (11-13).

o

➤ INMUNOVIGILANCIA

Esta teoría postula que el sistema inmune es capaz de detectar células cancerosas reconociendo sus características particulares y eliminarlas previniendo la progresión del cáncer. Sin embargo, en algunos casos, este proceso no es eficaz. De manera general este consta de tres etapas: En la primera, *Eliminación* el sistema inmune es capaz de destruir células neoplásicas básicamente mediante efectores de la inmunidad innata, seguida de una fase de *Equilibrio*, donde se inducen efectores específicos que reconocen y destruyen al tumor pero también se genera una presión de selección sobre las células tumorales generando variantes neoplásicas mutadas. Por último, en la etapa de *Escape*, las variantes del tumor que sobreviven se vuelven resistentes al reconocimiento y/o eliminación por los efectores inmunes y el tumor crece (10).

El sistema inmune innato se encuentra implicado en este proceso de eliminación de células neoplásicas mediante procesos de apoptosis regulando así la producción, formación y propagación de tumores debido a su participación en el proceso de inmunovigilancia, se cree que alteraciones en el funcionamiento de este sistema pueden estar implicados en el desarrollo de cáncer y de ahí su importancia en el presente estudio (12, 13).

2.4 POLIMORFISMOS

La semejanza entre los genomas de individuos de una misma especie, se ha estimado en un 99.9%. El 0.1% restante del genoma presenta variaciones en la secuencia de ADN y se les conoce como polimorfismos genéticos. Estos consisten, por tanto, en variaciones en la secuencia del ADN, tengan o no

o

consecuencia biológica alguna, que se detectan en al menos el 1% de los individuos de una población (14). La mayoría de estas variaciones se consideran neutras, es decir, sin efecto alguno sobre el fenotipo. Algunos pueden ir desde la modificación de una sola base hasta cambios en número y/o tamaño en la unidad de repetición.

Pueden clasificarse de acuerdo al tipo de cambio que se produce, en polimorfismos de secuencia y polimorfismos de longitud. También podemos clasificarlos de acuerdo al número de alelos que presentan como polimorfismos bialélicos y multialélicos (15).

2.4.1 POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO UNICO (SNP)

Los SNP's (Single Nucleotide Polymorphism por sus siglas en inglés) consisten en la sustitución de un nucleótido por otro y pueden dar lugar a variaciones en la secuencia del ADN. Se localizan por todo el genoma, son típicamente bialélicos, si bien cabe mencionar que pueden observarse SNP tri- y tetra alélicos (15). En conjunto, constituyen hasta el 90% de todas las variaciones genéticas humanas, estimándose que uno de cada 200-300 nucleótidos varía entre los distintos individuos. Actualmente están identificados más de 9 millones de SNP's.

Aunque la mayoría de los SNP's se encuentran en regiones no funcionales del ADN o son sinónimos (se produce un cambio de nucleótido que genera el mismo aminoácido, sin alterar por tanto la secuencia de las proteínas), careciendo probablemente de efecto biológico, existen también los que afectan

o

a regiones codificantes o funcionales del genoma, logrando modificar el sentido de un codón o alterar la expresión de un gen (15). Se ha propuesto la hipótesis de que estos últimos polimorfismos son los responsables de gran parte de las diferencias fenotípicas entre individuos, pudiendo determinar la respuesta individual a factores ambientales, farmacológicos y la predisposición a la mayoría de las enfermedades, especialmente las complejas como el cáncer.

A un grupo específico de SNP's que se heredan en bloque, se le suele denominar haplotipo. Lo que se define como una combinación de alelos de diferentes loci que están ligados en un mismo cromosoma y que debido a cortas distancias físicas entre ellos, éstos pueden heredarse como una unidad. Dada la alta variabilidad alélica, la probabilidad de que dos individuos no relacionados presenten un mismo haplotipo, es prácticamente nula. Es por esto que el estudio de haplotipos se ha convertido en una herramienta útil en la determinación de relaciones genéticas entre individuos (16).

2.5 GENES Y POLIMORFISMOS EN CITOCINAS Y SUS RECEPTORES

Diversos estudios (Tabla 4) han identificado SNP's en la secuencia de genes que codifican para citocinas, particularmente se han localizado en las regiones de promotores de estos genes, y se han asociado con diferentes niveles de transcripción. Algunos de estos SNP's que han sido reportados en la literatura se describen a continuación:

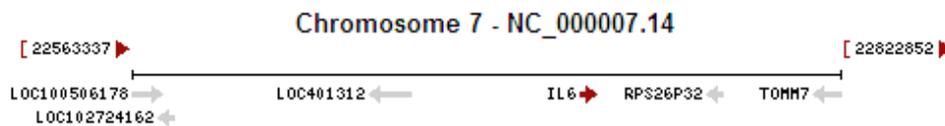
o

2.5.1 INTERLEUCINA 6 (IL-6) -174G/C (rs1800795)

Localización gen: 7p21Exón 5

Secuencia:ACTTTTCCCCTAGTTGTGTCTTGC[C/G]ATGCTAAAGGACGTCACATTGCAA

Cambio de base: C/G



Función: Es producida por diversos tipos celulares: monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, sinoviocitos, células de la glía, adipocitos y células epiteliales intestinales, entre otras. Los principales estímulos para su síntesis y liberación son las infecciones por ciertos microorganismos, particularmente virus y bacterias (lipopolisacárido bacteriano) y por la acción de otras citocinas, como la IL-1, TNF- α y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (17). Asimismo, sus principales objetivos o dianas celulares son los linfocitos T y B, las células epiteliales, los monocitos/macrófagos y los hepatocitos. Esta citocina ejerce diferentes acciones hematológicas, inmunológicas, endocrinológicas y metabólicas; es la principal estimuladora de la producción de la mayoría de las proteínas de fase aguda, como la proteína C-reactiva, amiloide sérico A, ceruloplasmina, haptoglobina, hemopexina, ferritina, algunas proteínas del sistema del complemento y diferentes proteínas de la cascada de la coagulación. Juega un papel importante en la patogénesis de la anemia y de las enfermedades crónicas al inducir la producción hepática de hepcidina, que inhibe la absorción intestinal de hierro. Además, induce la expresión de ferritina, que promueve el almacenamiento y retención del hierro dentro de los macrófagos. Asimismo

o

coestimula el crecimiento de diferentes colonias de precursores hematopoyéticos; promueve el crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos e interviene en la proliferación y maduración de la serie megacariocítica (18).

En el sistema inmune es una citocina pluripotencial ya que tiene acciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias; promueve la diferenciación y maduración de los linfocitos T y B, estimula la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B, inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1. En este sentido, la IL-6 tiene también acciones antiinflamatorias y, junto con el aumento en la producción del cortisol, ayuda a controlar la respuesta inflamatoria (18).

Asociación con cáncer: La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria que constituye uno de los mediadores más importantes de la respuesta inflamatoria aguda. Existe un polimorfismo en la región del promotor en la posición -174G>C y estudios previos han demostrado que este cambio afecta la afinidad de proteínas nucleares que están involucradas en la transcripción del gen (17). La actividad de citocina IL-6 influye en la patogénesis de linfoma no Hodgkin (NHL) y se ha asociado con la disminución del riesgo de muerte, así como a la recaída y cáncer secundario (19). El genotipo G/G esta asociado con niveles elevados de IL-6 y se ha relacionado con un mayor riesgo a cáncer gástrico (20), cáncer de mama (21). Contrariamente en pacientes con neuroblastoma portadores de uno o más alelos C tuvieron una SG (sistema de Gleason que

o

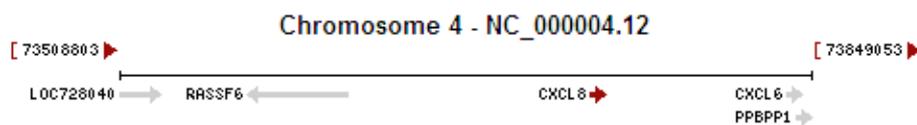
identifica 5 patrones de crecimiento celular y el impacto del cáncer sobre la sobrevivencia) superiores a los que son homocigotos para el alelo G (22).

2.5.2 INTERLEUCINA 8 (IL-8) -251 A/T (rs4073)

Localización gen: 4q13-q21 Exón 4

Secuencia:TTATCTAGAAATAAAAAAGCATACA[A/T]TTGATAATTCACCAAATTGTGGAGC

Cambio de base:A/T



Función: Miembro de la familia de citocinas CXC, es un quimiotáctico de neutrófilos y linfocitos, induce proliferación celular, migración y angiogénesis. Es importante también en la migración y activación de linfocitos y neutrófilos, lo que amplifica la respuesta inflamatoria, asimismo promueve el crecimiento celular (17).

La IL-8 es bien conocida por su capacidad para producir la desgranulación de los neutrófilos, lo cual resulta en un aumento en la expresión del receptor del complemento tipo I (CRI) y III (CR3). IL-8 actúa como un factor quimiotáctico para los eosinófilos y para los linfocitos humanos, en concreto las células T (17).

Asociación con cáncer: Hay una acumulación de evidencias que apoyan que esta interleucina juega un importante papel en el proceso inflamatorio de muchas patologías. Se ha identificado un polimorfismo en la región del promotor IL-8 -251T/A, en el cual, los genotipos AA/ AT se asociaron con un aumento significativo del riesgo de cáncer (23). En un estudio realizado por el

o

investigador Wang Z. y cols. 2013 (24) han asociado este SNP con cáncer de mama, nasofaríngeo, gástrico, oral y de laringe. Así como un menor riesgo de cáncer de próstata. También se ha estudiado su implicación con una menor sobrevida al linfoma folicular (25).

2.5.3 INTERLEUCINA 10 (IL-10) o CSIF (Human cytokines synthesis inhibitory factor)

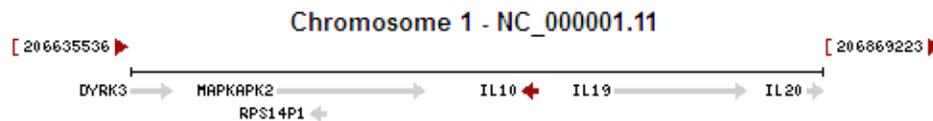
Localización gen: 1q31-q32 Exón 5

Cambio de base:

-1082 rs1800896 A/G

-819 rs1800871 C/T

-592 rs1800872 A/C



Función: Es una citocina anti-inflamatoria, que inhibe la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como interferón gama (IFN- γ), IL1, IL2, IL3, IL6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y células T ayudadoras tipo 1. Es una hormona de 185 aminoácidos, la cual se deriva de un pro-péptido de 212 aminoácidos que se localiza en la superficie de los macrófagos. Tiene la característica de inhibir la función de los macrófagos y de las células dendríticas, lo que afecta la producción de citocinas pro-inflamatorias, como IL-4, IL-5, IFN- γ (18).

Asociación con cáncer: La producción de IL-10 está se han relacionado con polimorfismos genéticos localizados en la región promotora del gen de esta

o

citocina. El promotor de IL-10 es altamente polimórfico, particularmente se han estudiado tres SNP's que se localizan en el promotor en las posiciones -1082, -819 y -592, estas variaciones regulan los niveles de IL-10. Los estudios de desequilibrio de ligamiento han demostrado que solo hay cuatro posibles haplotipos ATA, ACC, GCC y GTA los cuales están asociados con una expresión diferencial de IL-10 (17).

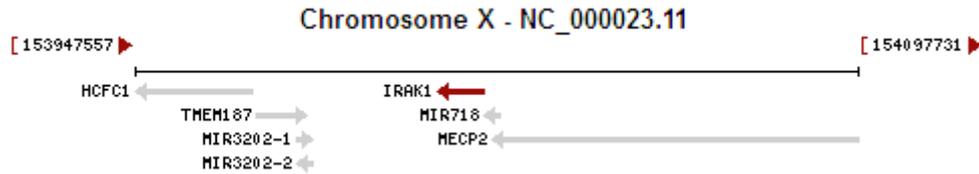
Existen diversos estudios que sugieren que las variaciones genéticas en el promotor de IL-10 influyen la cantidad de proteína producida de esta citocina. El SNP en la región -1082 el alelo (G) se asocia a un aumento en la expresión y el SNP en la región -592 el alelo (A) con una disminución en la expresión. El haplotipo ATA está asociado a una menor producción de IL-10, mientras que el haplotipo GCC (SNP-1082, -819 y -592) se identifica como un fenotipo con alta producción de IL-10 de modo que este se asocia a un mayor riesgo de cáncer oral, cáncer gástrico en comparación con el haplotipo ATA (26). El haplotipo GTA (-3575T>A,-1082A> G,-819c>T y 592>A) se ha asociado con un mayor riesgo para los linfomas de células B (27). El alelo menor (A) del SNP-592 rs1800872 conocido por producir menos Interleucina 10, se asoció con un mayor riesgo de recurrencia del cáncer de próstata (28).

2.5.4 RECEPTOR ASOCIADO A CINASA (IRAK1) -532 T/C (rs1059703)

Localización gen: Xq28 Exón 14

Secuencia:AGGGGGGATGCAGCTGGCGGCCTCC[A/G]AATGCCCGGGCACCCCGCCA
CCAC

Cambio de base: A/G



Función: Se localiza en monocitos y células endoteliales, ha sido identificado como el receptor para LPS y participa de manera importante en la activación de la apoptosis a través de FADD (Fas-Associated Death Domain Protein) y caspasa 8, lo cual explica la estrecha relación que existe entre respuesta inflamatoria sistémica, control de la infección y muerte celular programada (17).

Asociación con cáncer: Interleucina 1 se une a dos receptores específicos, cuando lo hace con el receptor tipo I (IL-1RI) desencadena una vía de señalización intracelular que incluye la fosforilación proteica mediada por cinasas conocidas como IRAK's (cinasas asociadas al receptor de IL1), y que es responsable de los efectos biológicos de la citocinas (29).

Los receptores miembros de la familia IRAK son indispensables para la transducción de señales por LPS. Una cascada de múltiples fosforilaciones y desfosforilaciones secuenciales de diferentes cinasas (como las protein-cinasas activadas por estrés, SAP-cinasas) resulta en activación de proteínas que participan en la traducción y traslocación de factores transcripcionales (particularmente NF- κ B y AP-1). Debido a que en las células se expresan pocos receptores de IL-1 y que sólo se necesita la activación de pocos de estos receptores para producir una respuesta biológica a IL-1 puede deducirse que el mecanismo de señalización es altamente eficiente. La mejor explicación de la potencia de la señalización inducida por IL-1 es la amplificación, luego de la unión al receptor, a través de múltiples protein-cinasas (29).

o

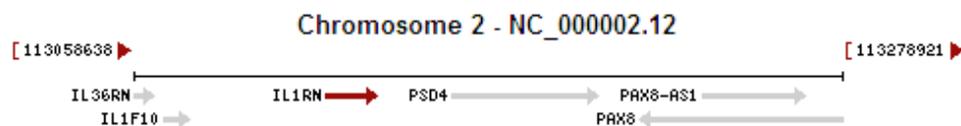
Polimorfismos de este gen parecen estar implicados en una amplia gama de enfermedades entre ellas el cáncer. Estudios realizados lo han asociado con mayor riesgo a padecer cáncer de próstata (30), así mismo mediante la inhibición de este receptor IRAK1 se encontró un aumento de las respuestas terapéuticas en el melanoma (29).

2.5.5 INTERLEUCINA 1 RECEPTOR ANTAGONISTA (IL-1RN) +2018T/C (rs419598)

Localización gen: 2q14.2 Exón 11

Secuencia: ATCTGAGGAACAACCAACTAGTTGC[C/T]GGATACTTGCAAGGACCAAATGTA

Cambio de base: C/T



Función: La IL-1RN (antagonista de receptor) es liberada durante la lesión tisular y no posee un efecto en si, sino que compite como antagonista del receptor de la IL- 1. Es una proteína de la familia de la IL 1, cuya función principal es inhibir la actividad de IL-1 α e IL-1 β , y de ese modo modular la gran variedad de respuestas inmunológicas mediadas por estas interleucinas (17).

Asociación con cáncer: El gen de la IL-1RN tiene 5 exones y existen 3 isoformas conocidas de IL-1RN: IL-1RN soluble glicosilado (sIL-1Ra) y dos formas intracelulares no glicosiladas (icIL-1RaI e icIL-1RaII). sIL-1Ra e icIL-1RaI provienen del mismo gen, mediante transcripción alternativa del primer exón. La expresión de sIL-1Ra e icIL-1RaI está regulada por 2 promotores

o

distintos, localizados corriente arriba de cada uno de los primeros exones alternativos con diferentes elementos reguladores de la transcripción. La regulación de la expresión de icIL-1Ra es específica de cada tipo de célula (17).

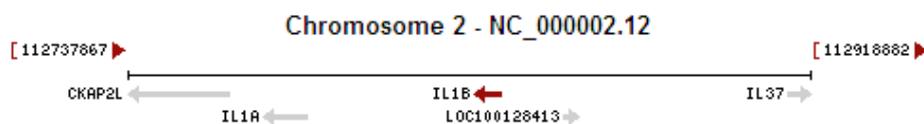
Debido a que la función principal es inhibir la actividad de IL-1 α e IL-1 β las cuales participan de manera importante tanto en actividades proinflamatorias como en la respuesta citotóxica sobre las células cancerosas e infectadas. Estudios realizados del polimorfismo IL-1RN 2018T>C lo han asociado con cáncer de colon, donde la frecuencia del genotipo CC entre los pacientes es significativamente mayor que en el grupo control (31).

2.5.6 INTERLEUCINA 1 BETA (IL-1B) -511C/T (rs16944)

Localización gen: 2q14 Exón 7

Secuencia: TACCTTGGGTGCTGTTCTCTGCCTC[G/A]GGAGCTCTCTGTCAATTGCAGGA
GC

Cambio de base: G/A



Función: Es primariamente producida por macrófagos, monocitos, células endoteliales, queratinocitos, células sinoviales, astrocitos, osteoblastos, neutrófilos, células de la glía. Así también por células no inmunológicas, tales como fibroblastos y células endoteliales activadas durante la lesión celular, la infección, la invasión y la inflamación (17).

o

Esta citocina es liberada al medio extracelular cuando la célula sufre apoptosis, actúa sobre los receptores IL-1RI e IL-1RII. Muchas de las actividades proinflamatorias de la IL-1 están relacionadas con su capacidad de inducir la ciclooxigenasa-2 (COX-2) con incremento de productos eicosanoides, incluyendo prostaglandina E2 (PGE2) y leucotrieno B4 (LTB4) como segundos mensajeros. Induce la síntesis de otras citocinas como TNF, IL-6, GM-CSF y, mediante retroalimentación positiva, un incremento en la síntesis de IL-1. Al igual que el TNF, tiene efectos citotóxicos sobre las células cancerosas e infectadas (27).

Asociación con cáncer: La IL-1B es codificada por un gen cuya longitud es de 9,7 kb que comprende 7 exones, el promotor de la IL-1B contiene una caja TATA, un motivo típico de los genes inducibles (17).

Experimentos *in vitro* e *in vivo* han mostrado múltiples efectos biológicos tanto de IL-1a como de IL-1B; la base para la gran variedad de propiedades de la IL-1 es el efecto de esta única citocina en la expresión de varios genes, como es el caso de aquellos genes inducibles que responden a retos endógenos o exógenos; esto incluye la habilidad de IL-1B para aumentar la expresión de la familia de genes de IL-1. En forma similar, los genes de otras citocinas inflamatorias, factores de crecimiento de linfocitos, factores estimuladores de colonias y factores de crecimiento mesenquimal, son estimulados por IL-1 (27).

Por sus propiedades proinflamatorias y su papel en la respuesta inmune innata se ha pensado que la IL-1 podría estar implicada en los mecanismos fisiopatológicos de una amplia gama de enfermedades.

o

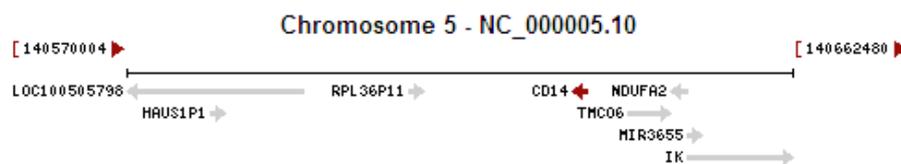
Actualmente, hay un interés creciente en el estudio de los polimorfismos de los genes que codifican para cada uno de los miembros de la súper familia de la IL-1, que parecen afectar la expresión proteica de estas citocinas ya sea por aumento o por defecto, y de esta manera afectar el fenotipo de la enfermedad. Existe un estudio en el que se ha encontrado una relación de este gen con cáncer esofágico donde se asocia con un menor riesgo (27).

2.5.7 ANTÍGENO CD14 -159C/T (rs2569190)

Localización gen: 5q31.1 Exón 3

Secuencia: AATGAAGGATGTTTCAGGGAGGGGG[A/G]CCGTAACAGGAAGGATTCTGCA
GGG

Cambio de base: A/G



Función: Es una proteína de membrana de 55 kDa anclada a glucosilfosfatidilinositol, expresada sobre la superficie de monocitos, macrófagos, células de la microglía y leucocitos PMN. CD14 es reconocido como el principal receptor de lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram-negativas (17). Una vez que interaccionan CD14-LPS, el receptor similar a toll tipo 4 (TLR4) actúa como un coreceptor e induce señales intracelulares conduciendo a la activación de factores nucleares como NF-KB, desencadenando la síntesis de mediadores solubles inmunológicos como las citocinas y quimiocinas; el cambio de base se ha asociado con incremento en la producción de Interferón gamma (IFN- γ) (32).

o

Asociación con cáncer: Existe un polimorfismo CD14-159C>T que se localiza en la región del promotor de este gen, este polimorfismo modula los niveles circulantes de CD14. Los individuos homocigotos para el alelo -159T tienen niveles elevados de CD14. Este polimorfismo también está asociado con un incremento en la producción IFN- γ (17).

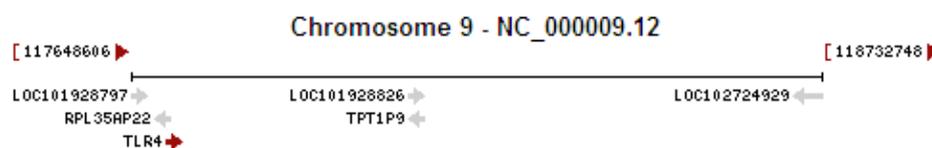
Estudios previos han encontrado una asociación significativa con cáncer de próstata (33); Asimismo, en estudios de expresión antigénica se ha encontrado que la sobre expresión de CD14 regula el alza de la respuesta inflamatoria TNF- α y suprime la malignidad de las células en carcinoma gástrico y leucemia mieloide aguda (34).

2.5.8 TOLL LIKE RECEPTOR 4 (TLR-4) -1183G/A (rs4986790)

Localización gen: 9q33.1 Exón 4

Secuencia: GCATACTTAGACTACTACCTCGATG[A/G]TATTATTGACTTATTTAATTGTTTG

Cambio de base: A/G



Función: Son proteínas transmembranales con un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina (N-terminal), un dominio extracelular y uno intracelular denominado TIR (C-terminal), el cual es similar al dominio intracelular del receptor de IL1 (17).

Los TLR's se expresan tanto en tejido linfoide como no linfoide en monocitos, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y linfocitos, además de

o

células endoteliales y epiteliales. Son considerados receptores de "vigilancia", lo que indica que son capaces de vigilar los tejidos para los estados de la enfermedad ya que son los encargados de reconocer patógenos activando la respuesta inmune celular y son una parte imprescindible de la respuesta inmune innata (35).

Asociación con cáncer: Se han identificado varios SNP's en el promotor y en regiones codificantes del gen; El SNP en el exón cuatro da como resultado el cambio en la posición 299 de una glicina por una asparagina. Este SNP esta en desequilibrio de ligamiento con otro SNP en la posición 399 que cambia una treonina por una isoleucina. Estos SNP's se localizan en el dominio extracelular LRR de TLR4, y alteran la señalización mediada por esta molécula (17).

Existen algunos estudios que han demostrado la asociación de esta variante con un aumento de riesgo de cáncer (36), el genotipo GC se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer gástrico (37) y cáncer de vesícula biliar (35).

Tabla 3 SNP's Candidatos, función y origen

Gen	Cromosoma	Origen	Principal función
IL6	7p15-p21	Monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, sinoviocitos, células de la glía, adipocitos y células epiteliales intestinales.	Media la respuesta de la fase aguda de inflamación, Induce la diferenciación de eosinófilos y la producción de IgA.
IL8	4q13-q21	Monocitos	Induce la quimiotaxis y activación de neutrófilos.
IL10	1q31-q32	Macrófagos, queratinocitos, linfocitos T y B.	Induce la proliferación de células T, potencia la proliferación mastocitos inducida por la IL-3.
IRAK1	Xq28	Monocitos y células endoteliales.	Activa la apoptosis a través de FADD y caspasa 8, actúa como mediador de la respuesta inflamatoria.
IL1RN	2q14.2	Linfocitos B Neutrófilos, monocitos y células de medula ósea.	Inhibe la actividad de IL-1 α e IL-1 β , modulando las respuestas inmunológicas mediadas por estas interleucinas.
IL1B	2q14	Monocitos, células endoteliales, macrófagos alveolares, fibroblastos.	Induce la síntesis de otras citocinas como TNF, IL-6 y ciclooxigenasa-2(COX-2), tiene efectos citotóxicos sobre las células cancerosas e infectadas
CD14	5q31.1	Monocitos, macrófagos, células de la microglía y leucocitos PMN	Actúa como un correceptor e induce señales intracelulares desencadenando la síntesis de mediadores inmunológicos como las citocinas y quimiocinas.
TLR4	9q33.1	Tejido linfoides y tejido no linfoides, monocitos, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, linfocitos, células endoteliales y epiteliales.	Receptor encargado de reconocer patógenos activando la respuesta inmune celular y son una parte imprescindible de la respuesta inmune innata.

Tabla 4 Estudios de SNP's candidatos implicados en predisposición a cáncer

SNP	ID	FENOTIPO	OR / P	REFERENCIA
IL-6 - 174 G/C	rs1800795	Su actividad influye en la patogénesis de linfoma no Hodgkin (NHL).	La variante IL6 se asoció significativamente con una disminución del riesgo de muerte, así como la recaída y cáncer secundario, entre las personas con linfoma no Hodgkin.	Briseis Aschebrook-Kilfoy, y cols. 2012 (19).
		En pacientes brasileños, la frecuencia de alelo (G) fue mayor en cáncer gástrico que en los pacientes con gastritis crónica.	La variante se asocio a la presencia de adenocarcinoma gástrico, la asociación fue independiente del tipo de tumor (p 0,001)	Lobo Gatti, Rodríguez R, y cols. 2007 (20).
		Asociación de rs1800795 (promotor) y rs8192284 (Receptor) en Neuroblastoma.	Pacientes portadores de uno o más alelos (C) tuvieron una SG superiores a los que son homocigotos para el alelo (G) (p =0,0413)	Lagmay J, Londonw, y cols. 2009 (22).
		Asociación con cáncer de mama	Las mujeres con la variante presentaron mayor riesgo OR 1,5 (IC del 95% (01.04 a 02.03) p = 0,04)	Hefler L, Grimm C, y cols. 2005 (21).
IL-8 - 251 A/T	rs4073	Asociación con una disminución el riesgo de cáncer en población africana.	Los genotipos AA/ AT se asociaron con un aumento significativo del riesgo de carcinoma nasofaríngeo en comparación con el genotipo TT (OR=1,48, IC 95%, 1,16-1,89).	Lin-Bo Gao , Xin-Min Pan, y cols. 2010 (23).
		Asociación con cáncer de pulmón no microcítico.	Los genotipos T/ T(P=0,004) se asocio a un aumento significativo del riesgo de CPNM	Rafrafi A, Chahed B, y cols. 2013 (38).
		Asociación y significado pronóstico en la supervivencia de linfoma folicular.	SNP IL8 (rs4073) se asocio con supervivencia (p = 0,001).	Lang Q. y cols. 2006 (39).
		Asociación del alelo-251A con mayor riesgo a padecer cáncer; cáncer de mama, cáncer gástrico y cáncer nasofaríngeo, así como un menor riesgo de cáncer de próstata, no se encontró evidencia que indique que el alelo-251A predisponga a sus portadores a cáncer colorrectal ni pulmonal.	Cáncer de mama: homociotos ye heterocigotos para el alelo-251A, fueron de : OR 1,45(IC del 95%:1,18 a 1,79) y (IC del95%: 1,25-1,85) 1,52, respectivamente. Cáncer gástrico: homocigotos y heterocigotos para alelo -251A fueron OR 1.28 (IC95% 1,02-1,62) y OR 1,13(IC del95%:0,98 a 1,30), respectivamente. El cáncer nasofaríngeo: homociotos ye heterocigotos para el alelo-251A, fueron de : OR 2,04 (IC del 95%:1,38 a 2,99) y 1,59 (95% CI1.19-2.13) respectivamente.	Dluzniewski, P. Wang, y cols. 2012 (28).

		Asociación con un menor riesgo de cáncer de laringe.	OR 0.70 (95% CI = 0.50-0.98)	Campa, D. Hashibe, M. y cols. 2007 (40)
		Asociaron con un mayor riesgo a cáncer oral.	Los genotipos AA y AT del polimorfismo IL-8-251A>T se asociaron con un mayor riesgo a cáncer oral. (OR = 1.23, 95% CI: 1.03–1.46, <i>P</i> = 0.025; OR = 1.25, 95% CI: 1.07–1.47, <i>P</i> = 0.006; respectivamente)	Wang, Z. Wang, C. y cols. 2013 (24).
		Asociación con un mayor riesgo de cáncer oral en poblaciones caucásicas.	Los genotipos AA y AT del polimorfismo IL-8-251A> T se asocia a un mayor riesgo de cáncer oral en poblaciones caucásicas. (OR = 1.40, 95% CI: 1.14–1.72, <i>P</i> = 0.001; OR = 1.29, 95% CI: 1.06–1.57, <i>P</i> = 0.011; respectivamente)	Wang, Z. Wang, C. y cols. 2013 (24).
IL-10 - 1082 G/A	rs1800896	Asociación con riesgo a cáncer de próstata.	El polimorfismo rs1800896 alelo (A), se asocia positivamente con riesgo a cáncer de próstata. (AG vs. GG, OR de 1.69, CI: 1.10-2.60; AA vs. GG, OR of 1.81, CI: 1.11-2.96)	Wang M. Dluznowski P. y cols. 2012 (28).
		Asociación con un mayor riesgo a linfomas de células B.	Tanto el haplotipo AGCC([OR] =1,54, IC del95% [CI] = 1,21 a 1,96, <i>P</i> <0,001) y el haplotipo TATA (OR=1,37, IC 95% = 1,05 a 1,79, <i>P</i> =0,02) se asociaron con mayor riesgo de linfomas de células B.	Lan Q, Zheng T. y cols. 2006 (39).
		Asociación con riesgo de cáncer gástrico.	Haplotipo IL-10 GCC (-1082, -819y-592) se asoció con un mayor riesgo de cáncer gástrico. OR =2,3, IC del95%, 01.02 a 04.01, <i>P</i> =0,005)	Liu J, Song B. y cols. 2011 (26).
IL-10- 819C/T	rs1800871	Asociación con riesgo de cáncer oral.	El haplotipo GCC (SNP-1082, -819y-592) se asocia a un mayor riesgo de cáncer oral en comparación con el haplotipo ATA. (OR=1.716; 95% CI, 1.230-2.395; <i>P</i> =0.001)	Yao J. Gao L. y cols. 2008 (41).
IL-10- 592 C/A	rs1800872	Asociación con riesgo a melanoma.	El SNP IL-10 rs1800872 se asociado a un menor riesgo de desarrollar melanoma (<i>P</i> =0.02)	Schoof N. Bonin F. y cols. 2009 (42).
		Asociación con un riesgo de recurrencia del cáncer de próstata.	El alelo (A), se asoció con un mayor riesgo de recurrencia del cáncer de próstata (OR = 1.76, 95% CI: 1.00-3.10)	Dluzniewski P. Wang M. y cols. 2012 (28).
IRAK1	Expresión en células de melanoma.	Asociación con melanoma	Aumento de las respuestas terapéuticas en el melanoma por la inhibición de IRAK-1	Srivastava R. Geng D. y cols. 2012 (29).
	rs1059703	Asociación con mortalidad del cáncer de próstata.	La variante en Toll-like se asocia a la mortalidad del cáncer de próstata.	Stark J. Wiklund F. y cols. 2009 (30).
IL1RN	rs419598	Asociación con el cáncer de colon.	El alelo 2018T-C se asocia con el cáncer de colon. (OR2,42, IC del 95%: 1,06 a 5,53, <i>p</i> =0,034)	Burada F. Dumitrescu T. y cols. 2013 (31).

IL1B	rs16944	Asociación con cáncer gástrico y lesiones precursoras.	Asociación de polimorfismos de genes en el cáncer gástrico y lesiones precursoras.	Chiurillo M. 2014 (43).
		Asociación con cáncer de esófago.	El genotipo GA se asoció con una disminución significativa del riesgo de CECE(OR =0.69, IC 95% = 0,49-0,99, p =0,041)	Liang Z. Jun Y. y cols. 2013 (27).
CD14	rs2569190	Asociación con cáncer de próstata.	Se encontró asociación entre los genotipos C(C /C + C/T) y el cáncer de próstata(P =0,07) los genotipos C se asociaron significativamente con el riesgo a cáncer de próstata (OR: 2,18, IC 95%: 1,07 a 4,44, P <0,05)	Mason T, Ricks S. y cols. 2010 (33).
		Expresión antigénica	La sobreexpresión de CD14 regula al alza las respuestas inflamatorias TNF-a-mediada y suprime la malignidad de las células de carcinoma gástrico.	Kang L, Zeng D. y cols. 2013 (44).
		Asociación con leucemia mieloide aguda.	Implicaciones pronósticas de positividad de CD14 en leucemia mieloide aguda.	Choi Y. Je-Hwan L. y cols. 2013 (34).
TLR4 (790)	rs4986790	Asociación con cáncer gástrico	Los polimorfismos TLR4Asp299Gly (rs4986790) se relaciona con un mayor riesgo de lesiones gástricas pre cancerosas y el cáncer gástrico.	Anton G. Kutikhin, y cols. 2011 (35).
		Asociación con cáncer gástrico	El genotipo A/G se asocia con un mayor riesgo de cáncer gástrico. (p =0,033)	Garcia de Oliveira J, Fla'via A, y cols. 2013 (37).
		Asociación con susceptibilidad al cáncer.	Se asociaron con un aumento de riesgo de cáncer (rs4986790: OR =1,24, IC 95% = 1,01 a 1,52 en el modelo dominante, OR = 1,24, IC 95% = 1,02 a 1,52 en el modelo recesivo.)	Zhang K. Zhou B. y cols. 2013 (36).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer en la infancia es una enfermedad que representa la segunda causa de mortalidad en niños de 0 a 14 años, solo después de los accidentes. En los niños, este padecimiento tiene diferente origen y comportamiento clínico debido a que el crecimiento celular es más rápido, agresivo e invasor, y más sensible a la quimioterapia debido a que las células tumorales suelen ser embrionarias e inmaduras.

Mucho se ha avanzado en el estudio del cáncer así como en los factores etiológicos que lo predisponen. Se sabe que la interacción de factores génicos y estímulos ambientales provoca alteraciones celulares, que frecuentemente llevan a una proliferación anormal y que para eliminar estas aberraciones, el sistema inmune posee diversos mecanismos que le permiten reconocer y eliminar las células transformadas; sin embargo, en algunas ocasiones, la respuesta inmune no es lo suficientemente efectiva para controlar el crecimiento celular anormal o esta respuesta es nula, lo que trae como consecuencia el desarrollo de un tumor.

Debido a la importancia de los mecanismos inmunológicos implicados en la génesis tumoral, mediante este proyecto se pretende estudiar polimorfismos en genes que regulan estas vías con el fin de encontrar si existe una asociación entre la presencia de estas variaciones y el riesgo a padecer cáncer a temprana edad.

4. HIPÓTESIS

Alteraciones en el funcionamiento de la inmunidad innata afectan los procesos de apoptosis, proliferación y proceso inflamatorio, favoreciendo con esto el desarrollo de células cancerígenas. Por lo tanto, los polimorfismos funcionales en genes que participan en la inmunidad innata pueden asociarse al desarrollo de cáncer a edad temprana, así como a su comportamiento clínico.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Aportar y reunir información que enriquezca el conocimiento básico de la asociación entre los polimorfismos en los genes de Interleucina 6 -174G/C(rs1800795), Interleucina 8 -251 A/T (rs4073), Interleucina 10 -1082G/A (rs1800896), -819C/T (rs1800871), -592C/A (rs1800872), Receptor asociado a quinasa IRAK1-532 T/C (rs1059703), Interleucina 1 receptor antagonista +2018T>C (rs419598), Interleucina 1 beta IL1B-511C/T (rs16944), Antígeno CD14 -159C/T (rs2569190), Receptor TollLike 4 TLR4-G1183A (rs4986790) y el desarrollo de cáncer pediátrico.

5.2 PARTICULARES

- Genotipificar utilizando el sistema de discriminación alélica (Real-Time PCR Viiia7™) mediante sondas TaqMan polimorfismos de genes que codifican distintas citocinas (IL-6 -174G/C, IL-8 -251 A/T, IL-10 -1082 G/A -819C/T -592 C/A, IRAK1-532 T/C, IL1RN +2018T>C, IL-1B -511C>T, CD14-159C/T, TLR-4 G1183A) a partir de ADN extraído de

o

muestras sanguíneas de pacientes con distintos tipos de cáncer pediátrico.

- Determinar la frecuencia del alelo de riesgo para cada uno de los genes candidatos.
- Comparar frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos seleccionados entre casos y controles con la finalidad de evaluar si existe asociación entre los mismos con el cáncer pediátrico.
- Determinar si existe asociación entre el tiempo de supervivencia de la enfermedad según los datos de los pacientes y la presencia de los polimorfismos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

- **Diseño de investigación:** Estudio de casos y controles, estudio de asociación de genes candidato.
- **Tipo de estudio:** Observacional, Comparativo, Retrospectivo, Transversal
- **Población de estudio:** Pacientes con cáncer pediátrico procedentes del Hospital Infantil México "Federico Gómez"

CASOS

En este estudio se incluyeron un total de 101 casos, individuos no relacionados entre si que acudieron al servicio de oncología pediátrica del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" (HIM), con previo consentimiento informado de los

o

padres y en su caso de los pacientes. El estudio fue autorizado por los comités de bioética de las instituciones participantes.

Todos los individuos fueron examinados por un oncólogo pediatra y su diagnóstico fue confirmado por el servicio de patología del HIM. Los datos de filiación de los pacientes fueron recabados para la identificación del paciente. Se registró en una base de datos edad, sexo, diagnóstico por patología, fecha del diagnóstico, estado actual (vivo /muerto con o sin enfermedad), fecha de última consulta, fecha recaída y fecha de defunción (según sea el caso).

CONTROLES

Se incluyeron en el grupo un total de 274 adultos sanos sin antecedentes de cáncer pediátrico, que fueron seleccionados del biobanco del estudio del mapa de haplotipos (45) del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Los individuos seleccionados otorgaron su consentimiento informado para la utilización de sus muestras en estudios genéticos.

6.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN, ELIMINACIÓN

Los criterios de selección para casos y controles se describen a continuación:

➤ Inclusión

Casos

- ✓ Edad pediátrica que comprende desde el nacimiento hasta los 18 años de edad
- ✓ Pacientes diagnosticados con algún tipo de cáncer pediátrico confirmado por patología
- ✓ Pacientes sin antecedentes de enfermedades inmunológicas

o

- ✓ Firma de consentimiento informado

Controles

- ✓ Adultos sanos sin antecedentes de cáncer pediátrico
- ✓ Individuos informados y de acuerdo en participar como controles en el proyecto de investigación

➤ **Exclusión**

- ✓ Pacientes con antecedentes de enfermedades inmunológicas

➤ **Eliminación**

- ✓ Los padres o el paciente que decidan no seguir participando en el proyecto
- ✓ Muestra de DNA insuficiente o de mala calidad para realizar ensayos de genotipificación.

6.3 VARIABLES

Dependientes

- Genotipos de los polimorfismos en los genes: IL-6, IL-8, IL-10, IRAK1, IL1RN, IL1B, CD14, TLR4

Independientes

- Cáncer
- Subtipo de cáncer
- Respuesta a Tratamiento
- Sobrevida Libre de Enfermedad
- Sobrevida Global

6.4 OBTENCIÓN DE MUESTRA SANGRE

A todos los individuos se les realizó una extracción de una muestra de sangre periférica, recolectadas en tubos al vacío con EDTA como anticoagulante, obtenida por personal especializado en el Hospital Infantil, esta fue trasladada al Instituto Nacional de Medicina Genómica inmediatamente almacenada a -20°C hasta el momento de la extracción de ADN y les fue asignado un número de identificación (ID).

6.5 EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN fue extraído a partir de sangre total con el kit Puregene bloodcore (Cat. 158389 QIAGEN) de acuerdo al protocolo del fabricante, con algunas modificaciones a continuación.

Las muestras fueron tratadas con choque térmico dentro de un baño María a 37°C durante 30 segundos. Se realizó la eliminación de los hematíes incubando la sangre del paciente en solución RBC durante 10 minutos a temperatura ambiente, invirtiendo el tubo varias veces durante la incubación. Las muestras se centrifugaron posteriormente a 3,000 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante en el que se encontraban los restos de los hematíes, con una pipeta de tipo Pasteur (Este paso se repitió las veces necesarias para la eliminación total de hematíes). El botón se resuspendió utilizando un agitador tipo “vórtex” y se añadió 1 mL de solución de lisis, compuesta por un detergente aniónico cuya función es romper la membrana de los leucocitos, principales células nucleadas de la sangre, dejando así los componentes celulares en suspensión.

o

El siguiente paso implicó la eliminación de proteínas celulares y nucleares mediante una precipitación salina, consistente en la adición de 0.45 μ L de solución de precipitación seguida de agitación en un agitador tipo “vórtex” durante 20 segundos y centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente. El resultado de la centrifugación es un precipitado marrón oscuro y un sobrenadante limpio de partículas que contiene el ADN. Éste se transfirió a un tubo limpio con 1.3 mL de isopropanol frío y se agitó aproximadamente 20 veces, procediéndose después a una centrifugación de 8 minutos a 3,000 r.p.m. La función que lleva a cabo el isopropanol es precipitar el ADN este precipitado, que presenta un color blanquecino, se separó del sobrenadante, que se desechó y se dejó secar durante aproximadamente 10 minutos con el fin de evaporar los restos de isopropanol. Posteriormente se añadió 1 mL de etanol al 70% para lavar el ADN y se centrifugó durante 8 minutos a 3.000 r.p.m. Una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado durante 30 minutos.

Por último, se resuspendió el precipitado en 200 μ L de solución hidratante (DNA Hydration Solution), se transfirió a un criotubo y se dejó reposar en hielo mínimo 30 minutos antes de su cuantificación.

6.6 CUANTIFICACION ADN

La cuantificación de ADN se realizó con el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Para medir la concentración de ácidos nucleicos, se determinó la absorbancia a 260nm y a 280nm en el espectrofotómetro, el cálculo de la concentración de los ácidos nucleicos se realizó siguiendo la relación: 1 A

o

260nm = 1 OD ADN = 50 µg/mL. También se evaluaron los valores de la relación 260/280 (ADN/proteínas) y 260/230 (ADN/solventes orgánicos) que aportan información sobre la pureza de la muestra. Los valores que se consideraron para la relación OD260/280 fue 1.8 – 2.0 y un valor de OD260/230 en intervalo de 2.0 – 2.2. Las mediciones de cada una de las muestras se realizaron por triplicado.

Una vez realizada la cuantificación de ADN extraído (ADN stock) se hicieron diluciones del ADN stock hasta lograr una concentración final de 3 ng/µL, las muestras fueron depositadas en placas de 96 pozos y fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

6.7 EVALUACIÓN DE INTEGRIDAD

La integridad del ADN de las muestras se evaluó mediante electroforesis, la cual se basa en la separación de macromoléculas en función del tamaño, carga eléctrica y otras propiedades físicas. Así pues, consiste en aplicar corriente eléctrica colocando electrodos en ambos extremos del gel con el fin de que las moléculas migren a través de él y sean separadas.

Las propiedades de una molécula determinan su separación y la velocidad, según la naturaleza de la carga neta, las partículas cargadas migrarán hacia el cátodo o hacia el ánodo. De modo que cuando se aplica un campo eléctrico a un gel con pH neutro, los grupos fosfato del ADN cargados negativamente lo harán migrar hacia el ánodo y su velocidad de migración será en función a su tamaño (46).

o

La electroforesis se realizó utilizando gel de agarosa al 1% preparados con Ultrapure (Cat.15510-027) y solución amortiguadora TAE1X (Tris-Acetato-EDTA). Se cargaron 3.0 ng de muestra más 7 μ L de solución amortiguadora de carga, obteniendo un volumen final de 10 μ L. La integridad se evaluó comparando la corrida de la muestra frente a la de un marcador de peso molecular conocido formado por fragmentos que cubren el rango de tamaño 100 -1000 pb con incrementos de 100 pb entre una banda y la siguiente, corrido a 80 voltios durante 1 hr. Finalmente el revelando del gel se realizó utilizando Gel Red® NucleicAcidStain 10000x BIOTIUM (Cat. 41003) como colorante fluorescente y se observó con luz UV en el transiluminador Kodak.

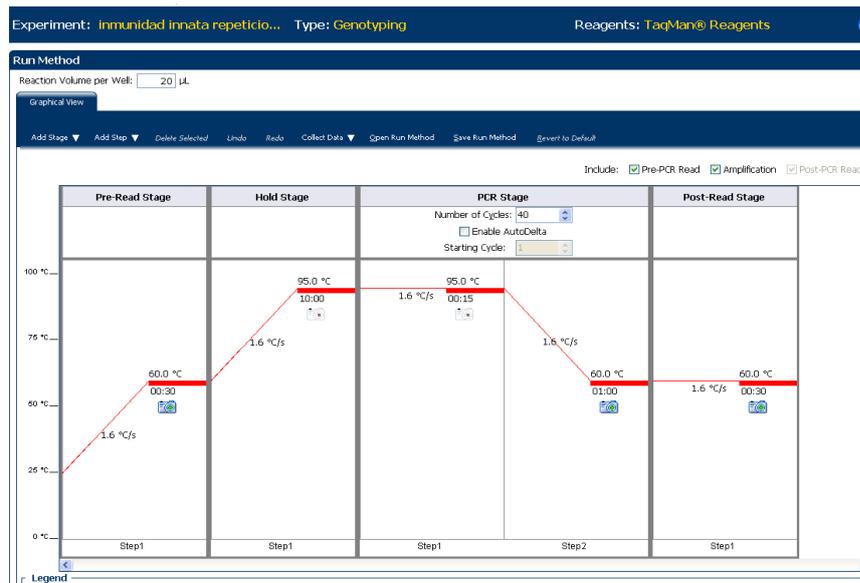
6.8 GENOTIPIFICACIÓN

Los dos alelos fueron genotificados utilizando el sistema de discriminación alélica mediante sondas TaqMan (Real-Time PCR Vii7™). Los ensayos diseñados y probados funcionalmente (Assay-by-Design) se obtuvieron de AppliedBiosystems, excepto la sonda y primers para el SNP 174G/C de IL6, el cual fue diseñado por AppliedBiosystems (Assay-on-demand). Las reacciones fueron preparadas utilizando TaqMan Genotyping Master Mix (AppliedBiosystems Cat.4371357), sondas TaqMan® SNP Genotyping Assay AppliedBiosystems 20X o 40X (según sea el caso), agua libre de DNAsas (Lonza cambrex accugene Cat. 51200), 10 ng de ADN genómico en un volumen final de 10 μ L por reacción.

Tabla 5 Sondas TaqMan Genotipificación

Gen	SNP ID	No Catalogo	RefSNP AllelesVIC/FAM	ContextSequence [VIC/FAM]
IRAK 1	rs1059703	C_8966368_1_0	A/G (REV C/T)	AGGGGGGATGCAGCTGGCGGCCTCC[A/G]AATGCCCGGGCACCCCCG CCACCAC
IL10	rs1800896	C_1747360_1_0	A/G (REV T/C)	TCCTCTTACCTATCCCTACTTCCCC[T/C]TCCCAAAGAAGCCTTAGTAGTG TTG
IL10	rs1800871	C_1747362_1_0	A/G (REV C/T)	AGTGAGCAAAGTGGAGCACAGAGAT[A/G]TTACATCACCTGTACAAGGG TACAC
IL10	rs1800872	C_1747363_1_0	T/G (REV A/C)	CTTCCAGAGACTGGCTTCTACAG[T/G]ACAGGCGGGGTCACAGGATG TGTTTC
IL1RN	rs419598	C_8737990_1_0	C/T (FWD)	ATCTGAGGAACAACCAACTAGTTGC[C/T]GGATACTTGCAAGGACCAAAT GTCA
TLR4	rs4986790	C_11722238_20	A/G (FWD)	GCATACTTAGACTACTACCTCGATG[A/G]TATTATTGACTTATTTAATTGTT TG
IL8	rs4073	C_11748116_10	A/T (FWD)	TTATCTAGAAATAAAAAAGCATACA[A/T]TTGATAATTCACCAAATTGTGG AGC
IL1B	rs16944	C_1839943_1_0	G/A (FWD)	TACCTTGGGTGCTGTTCTCTGCCTC[G/A]GGAGCTCTCTGTCAATTGCAG GAGC
IL6	rs1800795	IL6-174G/C	G/C (REV C/G)	ACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGC[C/G]ATGCTAAAGGACGTCACATTG CACA
CD14	rs2569190	C_16043997_10	A/G (FWD)	AATGAAGGATGTTTCAGGGAGGGGG[A/G]CCGTAACAGGAAGGATTCTG CAGGG

Posteriormente la amplificación y detección de los productos de PCR se realizó utilizando el instrumento Viiia7™ Real-Time PCR System (AppliedBiosystems). Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: 10 min 95°C para activación de la enzima seguida de 40 ciclos a 92°C por 15 segundos y 60°C por un minuto (Ilustración 5).



Ilustracion5 Termociclado PCR-tiempo real en detector Vii7

Este sistema detecta la acumulación de productos específicos de PCR al utilizar sondas marcadas con fluorocromos distintos, para la detección de los alelos silvestre (WT o alelo ancestral) y alelo menos frecuente. Cada sonda tiene en el extremo 5' un fluorocromo emisor (reporter) y en el extremo 3' un fluorocromo receptor (quencher). Durante la fase de extensión de la PCR, la sonda de discriminación alélica es hidrolizada por la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa, provocando la separación de los fluorocromos reporter y quencher con un consecuentemente un aumento de la fluorescencia. Esta fluorescencia es cuantificada por el equipo y será proporcional al número de copias del gen presente en la muestra; así la genotipificación está determinada por la fluorescencia generada en la reacción de PCR (47).

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los resultados para la búsqueda de una asociación genética entre cáncer pediátrico y los polimorfismos en genes de inmunidad innata se realizó mediante el programa SPSS versión 15.0 y FINETTI (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Para cada polimorfismo se calcularon las frecuencias tanto genotípicas como alélicas, y se evaluó el equilibrio de Hardy Weinberg (HWE). La asociación entre el estatus de cáncer, subtipo de cáncer, y las variables categóricas, tales como son los polimorfismos seleccionados y otros potenciales confusores, se analizaron utilizando la prueba del chi-cuadrada. Se calcularon el OR (odds ratio) y los intervalos de confianza. Finalmente se utilizó el método de Kaplan-Meier para evaluar la supervivencia global y libre de enfermedad, así como Log-Rank y regresión Cox para analizar la asociación de cada polimorfismo con la supervivencia.

8. RESULTADOS

8.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

El análisis descriptivo de la población estudiada se llevó a cabo utilizando el paquete estadístico SPSS 15.0 (IBM, Chicago, Illinois). Las variables cualitativas fueron descritas en función de proporciones en los diferentes grupos, mientras que el análisis de variables cuantitativas se llevó a cabo utilizando medidas de tendencia central (media o mediana en función de las características de la variable).

CONTROLES

Se incluyeron un total de 274 individuos en el grupo control todos ellos con una edad mayor a 18 años, con cierto predominio del sexo masculino con un 52.9% de hombres y un 47.1% de mujeres (Tabla 6). Todos los individuos incluidos en la población control fueron adultos sanos sin antecedentes de cáncer pediátrico.

Tabla 6 Frecuencias controles, edad y sexo.

Característica	n 274	Frecuencia (%)
SEXO		
Femenino	145	47.1
Masculino	129	52.9
EDAD	Adultos (mayores de 18 años)	100

CASOS

En cuanto a los casos el estudio incluyó un total de 101 pacientes con diagnóstico clínico de cáncer pediátrico confirmado por patología. Se observó predominio del sexo masculino 54.5% contra un 45.5% de mujeres, la mediana de edad de los mismos fue de 94.5 meses con un rango de 4 a 213 meses. Los grupos de edades que presentaron mayor frecuencia de padecer cáncer pediátrico fue el grupo de 5-9 años de edad con una frecuencia de 31.7% seguido del grupo de 10-14 años con un 29.7%, el grupo de 1-4 años con 18.8% y el grupo de 15-18 años con 11.9%, finalmente los menores a un año de edad presentaron un 7.9% siendo la menor frecuencia entre los pacientes (Tabla 7).

Tabla 7 Frecuencias casos sexo y edad

Característica	Frecuencia	
	n101	(%)
SEXO		
Femenino	46	45.5
Masculino	55	54.5
EDAD CATEGORIAS		
< 1 año	8	7.9
1-4 años	19	18.8
5-9 años	32	31.7
10-14 años	30	29.7
15-18 años	12	11.9
EDAD RANGO (meses)		
Mínimo	4	
Máximo	213	
Media	94.5	

En cuanto al diagnóstico confirmado de cada uno de los pacientes, el tipo predominante de acuerdo a la frecuencia correspondió a Leucemia con 27.7%, seguida de tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) 25.5%, Tumores Hepáticos 12.9%, carcinomas 10.9% (carcinoma papilar ó medular de tiroides, carcinoma de glándulas suprarrenal), Sarcomas de Tejidos Blandos (STB) y Tumores Renales con un 5%, Tumores óseos, Germinales, y Linfomas con un 4% y finalmente Neuroblastoma con el menor porcentaje en los pacientes 1% (Tabla 8, Ilustración 6).

Tabla 8 Frecuencias según subtipo de cáncer pediátrico

DIAGNÓSTICO	FRECUENCIA	%
LEUCEMIAS	28	27,7
SNC	26	25,7
HEPÁTICOS	13	12,9
CARCINOMAS	11	10,9
RENALES	5	5,0
SARCOMAS DE TEJIDOS BLANDOS	5	5,0
ÓSEOS	4	4,0
CÉLULAS GERMINALES	4	4,0
LINFOMAS	4	4,0
NEUROBLASTOMA	1	1,0
Total	101	100

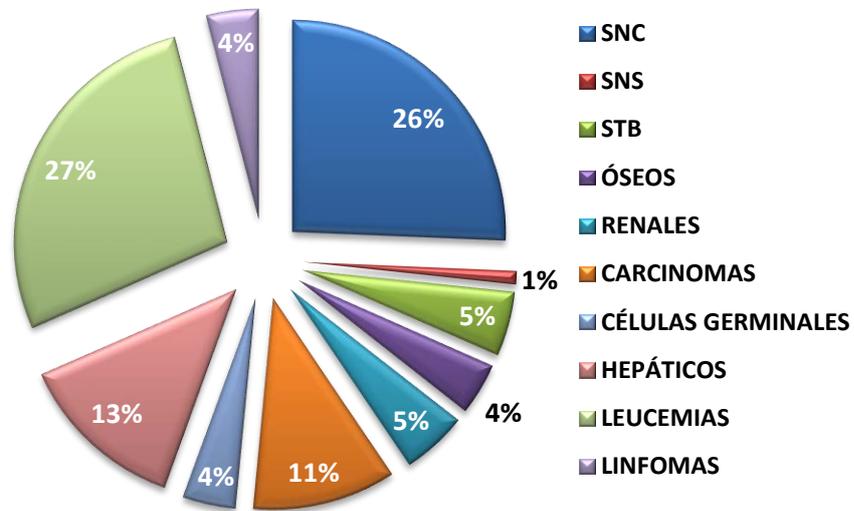


Ilustración 6 Frecuencia según subtipo de cáncer pediátrico

Tras una segunda clasificación de los tipos de tumor donde se agruparon de acuerdo a su grupo siendo hematológico o sólido, se observó claramente que la mayor frecuencia la presenta en su conjunto los tumores sólidos con un 69% (Ilustración 7).

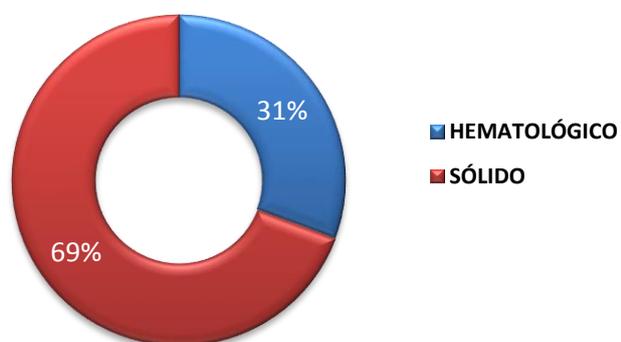


Ilustración 7 Frecuencia según tipo de tumor

o

8.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN

El ADN extraído de cada muestra fue cuantificado por triplicado en el equipo de espectrofotometría NanoDrop con los resultados obtenidos se calculó el promedio, mínimo y máximo de la concentración de ADN así como los promedios de los parámetros 260/280 y 260/230 los cuales nos indican la pureza de la muestra (Tabla 9). Obteniendo así un promedio de concentración de 1009.58 (ng/uL) y un resultado para los factores de 260/280 (1.86) y 260/230 (2.03).

Tabla 9 Concentración de ADN en muestras (casos)

	Concentración (ng/uL)	A260	A280	260/280	260/230
Promedio	1009,58	20191,73	10902,27	1,86	2,03
Desv.	785,454	15709,12	8885,44	,070	,295
Mínimo	51,97	1039	,55	1,32	,52
Máximo	4510,63	90213	53520	1,95	3,20

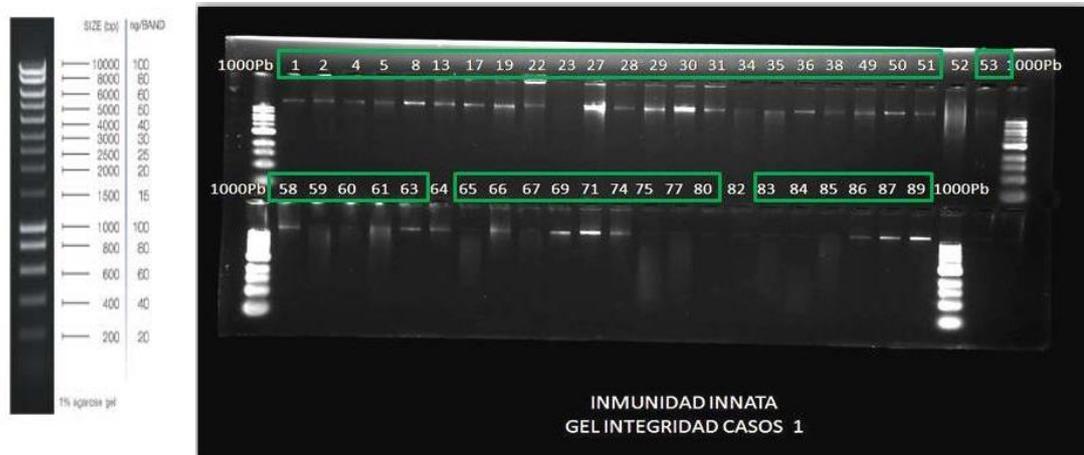
8.3 GELES DE INTEGRIDAD

La evaluación de la integridad del ADN extraído se evaluó siguiendo el método de electroforesis en gel de agarosa. Tras la corrida de este, se visualizo el gel con una lámpara de luz UV (Ilustración8), obteniendo las bandas correspondientes a las muestras de ADN extraído y los marcadores de peso molecular de 1 Kb ideal para determinar el tamaño de ADN de doble cadena.

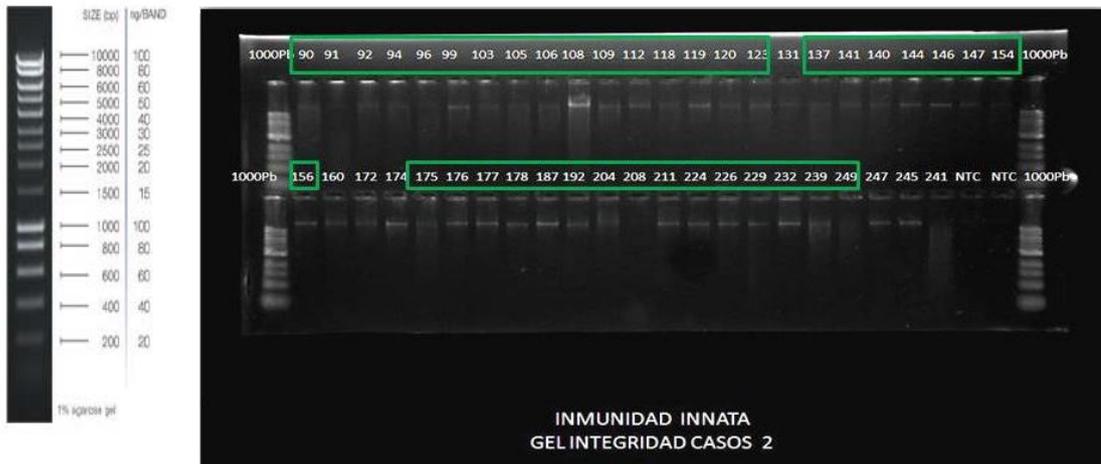
Se obtuvo el perfil electroforético de las distintas muestras, en la gran mayoría de ellas (marcadas en recuadro verde) se observó una banda estrecha, integra y de alto peso molecular. No así en muestras con ID 52, 241, 245, 343 en las

o

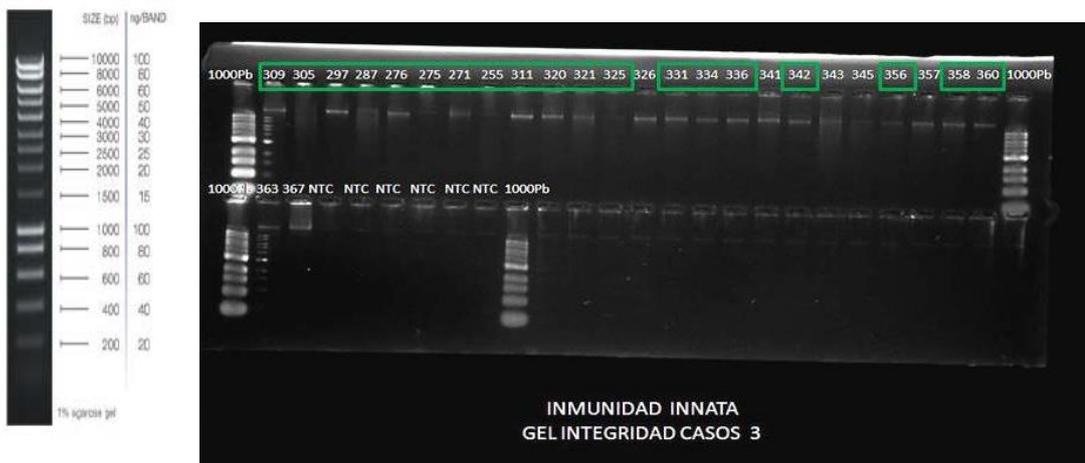
cuales se observó claramente una banda difusa de más de un cm lo cual indica degradación del ADN, estas muestras fueron descartadas del estudio.



Perfil electroforético de la muestras ID 1 a la 89



Perfil electroforético de la muestra ID 90 a la 241



Perfil electroforético de la muestra ID 309 a la 360

Ilustración 8 Visualización con luz UV de perfil electroforético de muestras en gel de agarosa al 1% con buffer TAE, marcador de peso molecular de 1000 pb

8.4 COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS DE SNP'S EN DIFERENTES POBLACIONES

Se realizó una búsqueda en dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database, disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), la cual es una base de datos de polimorfismos, que incluye SNP's, (indels/DIPs), (STRs), (MNPs), entre otras. La base de datos fue desarrollada por el National Center for Biotechnology Information (NCBI) en colaboración con el National Human Genome Research Institute (NHGRI). Todos los genes estudiados fueron identificados en ésta página, determinándose de ese modo su localización cromosómica, la posición del polimorfismo, el cambio de base, así como sus frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo en distintas poblaciones. La tabla 10 muestra la distribución del alelo menos frecuente en las distintas poblaciones reportadas en dbSNP.

Tras la recopilación de los resultados en los estudios reportados para cada uno de los SNP's se pudo evaluar el comportamiento de nuestra población de interés ya sea hispana o mexicana en comparación a las demás, se observó lo siguiente:

Tabla 10 SNP's Candidatos, Frecuencia en poblaciones en base a estudios reportados en HapMap. Referencia NCBI dbSNP(Database for Short Genetic Variations)

Gen	ALELO MENOS FRECUENTE EN POBLACIONES							
	HAP MAP CEU (EUROPEAN)	HAP MAP HCB (ASIAN)	HAP MAP JPT (ASIAN)	HAP MAP YRI (AFRICAN)	HISP	MEX	CAUC	RESULTADO CONTROLES
IL-6	0.535	1.00	1.00	1.00	0.205	0.160	0.500	0.142
IL8	GENO_PANEL 0.600	GENO_PANEL 0.611	GENO_PANEL 0.729	GENO_PANEL 0.175	0.522	N/R	0.565	0.606
IL10-592 (360)	0.531	0.047	0.052	0.274	0.238	0.320	0.403	0.255
IL10 - 1082 (362)	GENO_PANEL 0.208	GENO_PANEL 0.733	GENO_PANEL 0.698	GENO_PANEL 0.363	0.261	N/R	0.290	0.424
IL10-819 (363)	0.211	0.238	0.634	0.473	0.273	0.378	0.290	0.425
IRAK1	0.775	0.167	0.205	0.621	N/R	N/R	N/R	0.445
IL1RN	0.296	0.047	0.064	0.018	N/R	0.340	N/R	0.330
IL1B	0.642	0.547	0.523	0.420	0.391	0.500	0.742	0.423
CD14	0.474	0.500	0.488	0.293	0.348	N/R	0.621	0.520
TLR4 (238)	0.033	0	0	0.033	0.043	N/R	0.032	0.026

IL6 La población mexicana tiene un comportamiento similar a la hispana 0.160 pero totalmente alejado a lo que reporta tanto la población europea 0.532, como la asiática y africana con 1.00.

IL8 La población hispana 0.522 se comporta de manera similar tanto a la europea 0.600 como a la asiática 0.729, difiriendo completamente a lo reportado para la africana 0.178. Para este SNP no se reportan estudios realizados en población mexicana.

IL10-592 Se puede observar que tanto la población hispana 0.238 como la mexicana 0.320, se comportan muy similar a las frecuencia de dicho alelo en la africana 0.274 y difieren con la europea la cual reporta un aumento de mas

o

del doble de la frecuencia 0.53, esto contrario a la población asiática la cual reporta una frecuencia por mucho menor a estas 0.052.

IL10-1082 La población hispana con una frecuencia de 0.261 se comporta con mayor similitud a la europea 0.208 y africana con 0.383 difiriendo de la población asiática con unas frecuencias por mucho mayor 0.698. Para este SNP no se reportan estudios realizados en México.

IL10-819 Tanto la población hispana con una frecuencia de 2.73 como la mexicana reportada 0.378 se comportan de manera muy similar a la europea 0.211, difiriendo evidentemente tanto para la población asiática 0.634 como la africana 0.473.

IRAK 1 No existen reportes para las poblaciones mexicana ni hispana por lo cual no es posible conocer el comportamiento de estas, en cuanto a lo reportado para las poblaciones europea 0.775 se comporta de manera similar a la africana 0.621 difiriendo de la asiática 0.205.

IL1RN No se reporta una frecuencia para la población hispana, pero si para la mexicana 0.340 la cual se comporta similar a la europea 0.296 difiriendo de las poblaciones asiática 0.064 y africana 0.018.

IL1B La población hispana 0.391 se comporta similar a la africana 0.420 difiriendo de la asiática 0.523 y europea 0.642. Para este SNP no se reportan estudios realizados en población mexicana.

CD14 La población hispana presenta una frecuencia considerablemente menor del alelo en comparación con la población tanto europea como asiática observándose un 0.348 contra 0.47 y 0.50 respectivamente, no así para la africana la cual difiere reportando un 2.93. Para este SNP no se reportan estudios realizados en México.

o

TLR4 La población hispana 0.043 se comporta de manera muy similar en cuanto a la frecuencia, tanto para la población europea 0.033 como la africana 0.033 y a los caucásicos 0.032. Para este SNP no se reportan estudios realizados en México ni Asia.

De manera general tomando en cuenta el comportamiento de todos los SNP's, se puede observar que existe una mayor similitud en el comportamiento de la población tanto hispana como mexicana con los resultados en las poblaciones africana y europea, así mismo coinciden en diferir con las frecuencias alélicas reportadas para la población asiática.

Agregado a este análisis entre las variaciones reportadas en estudios previos en las distintas poblaciones, se realizó un análisis estadístico más utilizando χ^2 de Pearson comparando las frecuencias alélicas obtenidas en nuestra población control para cada SNP y lo reportado para la población nacional. Con lo que no se encontró diferencia significativa es decir que el resultado obtenido en nuestra población control se comporta similar a los valores de frecuencias alélicas reportados para cada SNP en la base de datos dbSNP para la población mexicana o hispana.

8.5 EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG

El principio de Hardy-Weinberg (HWE) es un modelo teórico el cual establece que las frecuencias de los alelos y genotipo en una población permanecerán constantes de generación en generación y se fijarán en un valor de equilibrio

o

particular correspondiente a una función en la ausencia de otras influencias evolutivas. Estas influencias son: el apareamiento no aleatorio, ausencia de diploidia, mutación, selección, deriva génica y el flujo genético. Debido a que una o más de estas influencias son típicamente presentes en las poblaciones reales, el principio de Hardy-Weinberg describe una condición ideal contra el cual los efectos de estas influencias se pueden analizar ya que las violaciones de sus suposiciones pueden causar desviaciones de los valores esperados. Debido a esto es una pieza clave cuando se estudian asociaciones genéticas entre casos y controles, proporciones de HWE se pueden utilizar para detectar penetrancia, errores de genotipificación, estratificación de la población y asociación genética (16).

Con el objetivo de establecer posibles diferencias entre la distribución de las frecuencias genotípicas esperadas siguiendo los lineamientos teóricos de HWE y las obtenidas en la genotipificación, se realizó la comparación de dichas frecuencias mediante un test de contingencia tipo X^2 de Pearson para su evaluación, estableciendo un valor de significación de p-value <0.05. Estas comparaciones se llevaron a cabo utilizando la plataforma estadística on-line FINETTI. Tras el análisis X^2 el valor obtenido de p-value debe ser no significativo y así poder decir que el SNP evaluado se encuentra en equilibrio debido a que no existe una diferencia entre la distribución observada y la teórica establecida por lineamientos de la teoría de Hardy-Weinberg.

En los resultados obtenidos los SNP's IL8, IL6, IL10-1082, IL10-819, IL1RN, IL1B, CD14 Y TLR4 (238) fueron no significativos, tanto para casos como

o

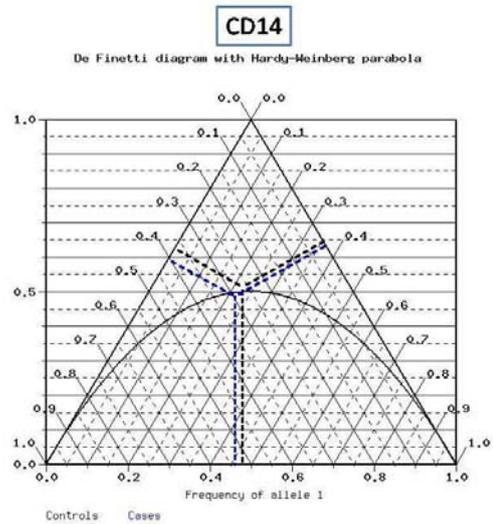
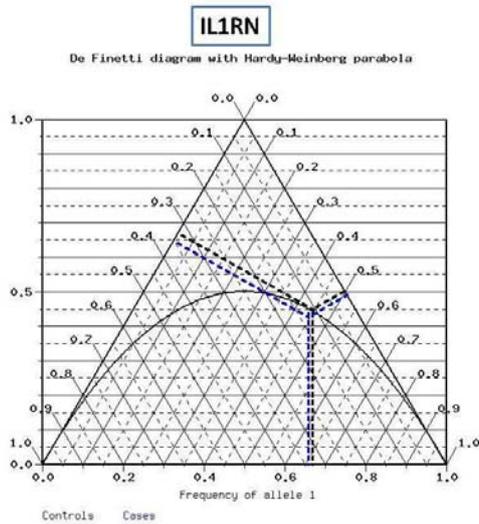
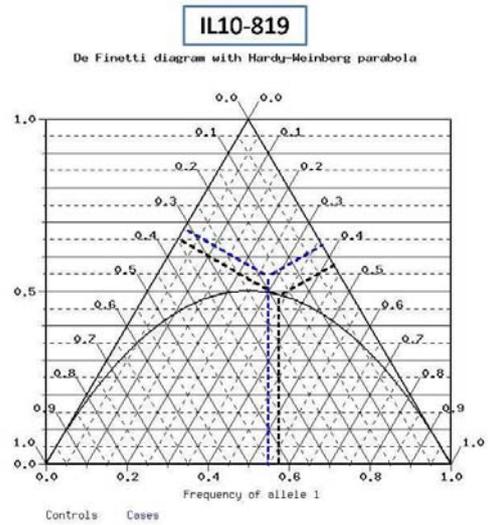
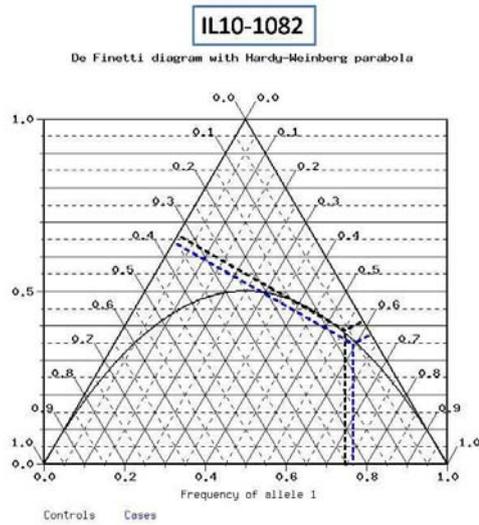
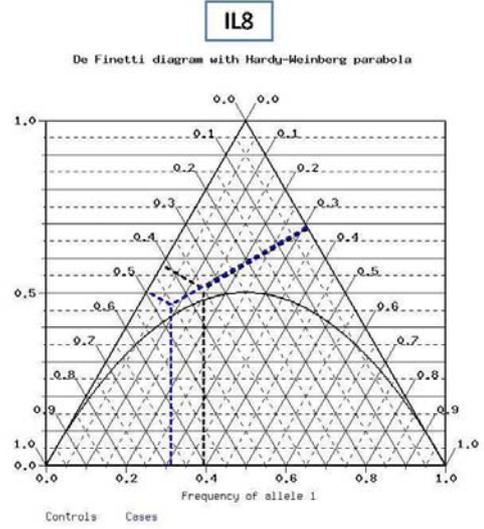
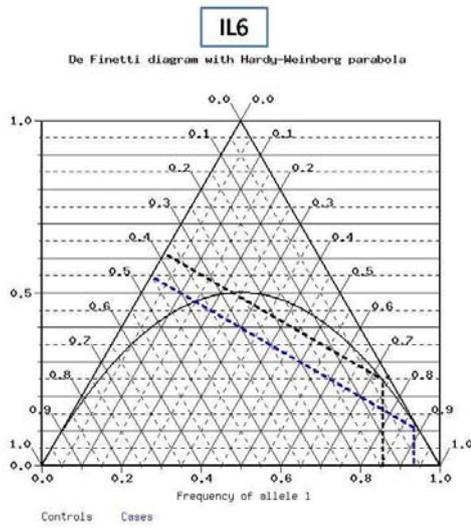
controles, No así para el SNP IL10-592 en el cual el resultado de sus casos tuvieron un resultado de p-value <0.05 siendo este significativo (0.0018) y finalmente el SNP IRAK1 fue significativo tanto para casos como para controles (Tabla 11).

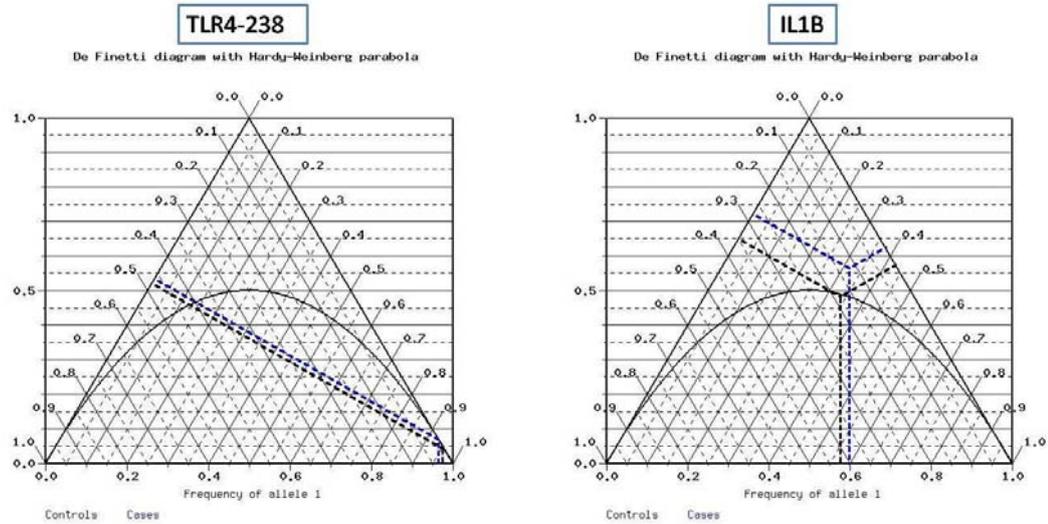
Tabla 11 Resultados prueba χ^2 Pearson equilibrio HWE

SNP	PRUBA DE EQUILIBRO HWE (χ^2 PEARSON)	
	CONTROLES (p- value)	CASOS (p- value)
IL6	0.7850	0.3364
IL8	0.2476	0.4250
IL10-1082	0.4632	0.7667
IL10-819	0.9231	0.3154
IL10-592	0.9851	0.0018
IRAK 1 (localización en cromosoma x)	1.76X10 ⁻¹⁶	2.83X10 ⁻⁰⁷
IL1RN	0.8076	0.5907
IL1B	0.8255	0.0790
CD14	0.6094	0.8126
TLR4 (238)	0.0562	0.7182

De la misma manera la plataforma estadística nos arroja los resultados representados en un gráfico de FINETTI. El cual nos muestra las frecuencias genotípicas mediante un sistema de coordenadas triangular, donde las longitudes de los segmentos P, H y Q representan las frecuencias de los genotipos AA, Aa y aa, respectivamente, los vértices en la base representan la fijación del alelo a (izquierda) y del alelo A (derecha), el vértice superior representa una población constituida solo por heterocigotos, sin homocigotos y finalmente la parábola representada dentro del triángulo representa el conjunto de puntos de población con frecuencias genotípicas de equilibrio Hardy-Weinberg.

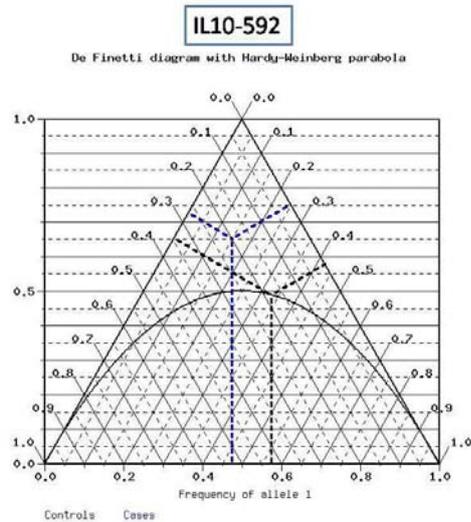
Ilustración 9 Diagramas Finetti equilibrio de Hardy-Weinberg





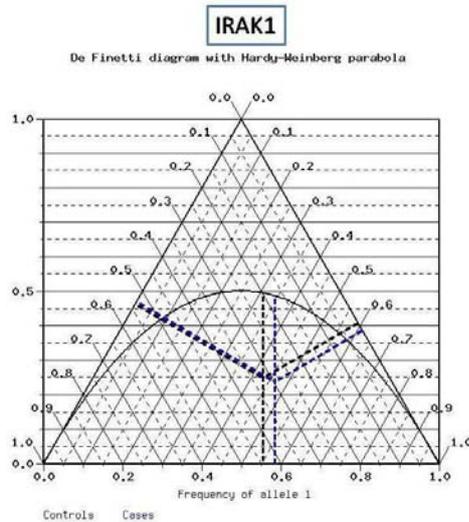
Tras la obtención del gráfico de FINETTI (ilustración 9), se puede observar que los SNP IL6, IL8, IL10-1089, IL10-819, IL1RN, CD14 y TLR4 tanto para casos como controles la intersección de cada genotipo se encuentran dentro de la parábola que representa el equilibrio teórico de Hardy-Weinberg. En el diagrama que representa a IL1B, se puede observar que la intersección de genotipos para la población de casos se encuentra ligeramente fuera de la parábola, esto por su frecuencia relativamente alta de heterocigotos sin embargo, el valor de p-value obtenido no fue significativo (0.0790) por lo que a pesar de ello se considera en equilibrio.

o



En la particularidad del SNP IL10-592, las frecuencias genotípicas correspondientes a los controles se encuentran en un equilibrio de la ecuación. No para la población de los casos, en los que se puede observar que la intersección sale de la parábola, esto debido a que las frecuencia genotípicas de heterocigotos es de 65.3% siendo esta mayor a la esperada con un de p significativo (< 0.05).

Finalmente en el caso del SNP IRAK1, se observa un comportamiento peculiar ya que tal pareciera que las intersecciones de los genotipos tanto para casos como para controles se encuentran dentro de la parábola de equilibrio, las frecuencias de los genotipos para los controles son WT (43.1%) heterocigotos (24.8%), homocigotos (32.15%) y para casos WT (46.5%) heterocigotos (23.8%), homocigotos (29.7%) con estos valores en el resultado de la ecuación de Hardy-Weinberg se obtiene un valor significativo entre el valor esperado (teórico) y el obtenido.



En algunas publicaciones, para los genes ubicados en el cromosoma X, como es el caso de IRAK1, se analiza el HWE solo en los individuos del sexo femenino. Se realizó este ejercicio y se encontró que en el grupo de casos el HWE se mantiene pero en el caso de los controles se reporta un valor $p = 0.02$ por lo tanto existe desviación del HWE (Tabla 12)

Tabla 12 Equilibrio Hardy-Weinberg IRAK1 solo mujeres

SNP			FRECUENCIA GENOTIPICA			PRUBA DE EQUILIBRO HDW (χ^2 PEARSON)
			WT (%)	HET (%)	HOM* (%)	p
IRAK1 SEXO FEMENINO	CASOS	n=46	13 (28.3)	24 (52.2)	9 (19.6)	0.7272
	CONTROLES	n= 145	47 (32.4)	59 (40.1)	39 (26.9)	0.0269

Con el fin de buscar una explicación más a este desequilibrio para los SNP's analizados y así saber si hay estratificación de la población o una verdadera asociación genética, se realizó el cálculo utilizando la plataforma estadística online FINETTI el coeficiente de consanguinidad o endogamia (F). El cual se define como el cruzamiento entre individuos emparentados, es decir es la probabilidad de que 2 genes, en un locus de un individuo de la población, sean

o

idénticos por descendencia. Su efecto primario es el de provocar una desviación de las frecuencias genotípicas de la población con respecto a las esperadas en equilibrio Hardy-Weinberg; en concreto, provoca un incremento en la frecuencia de homocigotos y un descenso paralelo en la frecuencia de heterocigotos (16).

En este sentido, es posible cuantificar el nivel de endogamia (F) de una población en virtud de sus efectos como la reducción proporcional en la frecuencia de heterocigotos en población con respecto a la esperada. Si no hay endogamia en población ($F = 0$) las frecuencias genotípicas serán las de equilibrio Hardy-Weinberg (p^2 , $2pq$ y q^2), si la endogamia es máxima ($F = 1$), sólo habrá homocigotos AA y aa , en frecuencias p y q , respectivamente, Sin embargo, cuando F está entre 0 y 1, hay un exceso de homocigotos en comparación con proporciones esperadas, y cuando ($F < 0$) hay un exceso de heterocigotos. Para poder concluir que existe una estratificación de la población, el valor de F debe ser consistente para todos los marcadores (16).

Basado en lo anterior y en análisis del resultado obtenido en el coeficiente de consanguinidad (Tabla 13). Se muestra que los SNP IL10-592 (-0.31014) y IL1B (-0.17478) en la población de casos se obtuvieron un valor de F menor a 0, lo que nos sugiere que se detecta un exceso de heterocigotos en la población.

Tabla 13 Resultados prueba coeficiente de consanguinidad (F)

SNP	PRUEBA COEFICIENTE DE CONSANGUINIDAD (F)	
	CONTROLES	CASOS
IL6	-0.01648	0.09565
IL8	-0.06983	-0.08017
IL10-1082	-0.02253	0.02951
IL10-819	0.00293	-0.09989
IL10-592	0.00057	-0.31014
IRAK 1 (localización en cromosoma x)	0.49763	0.51090
IL1RN	-0.01471	-0.05350
IL1B	0.01331	-0.17478
CD14	-0.03086	-0.02358
TLR4 (238)	0.02039	-0.03590

Así mismo como se comentó anteriormente, el SNP IRAK1 está ligado al cromosoma X por lo que este hecho queda comprobado al presentar un fuerte desequilibrio de Hardy-Weinberg, ya que obtuvo un 0.49 y 0.51 para controles y casos respectivamente, lo que nos indica que hay un exceso de homocigotos en comparación con proporciones esperadas.

A excepción de lo ya mencionado el resto de los SNP's tanto para las poblaciones de casos y controles, el valor de consanguinidad de la población no fue significativamente diferente de $F=0$, lo que nos indica que no existe una desviación significativa del equilibrio Hardy Weinberg. Finalmente no se detectó para ninguno de los SNP's analizados un valor de $F=1$, por lo que se descarta la endogamia máxima tanto para la población control como para los casos estudiados.

8.6 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN CON POLIMORFISMOS

Se llevó a cabo un análisis estadístico X^2 de Pearson, comparando la distribución de los diferentes polimorfismos entre casos y controles en función de sus frecuencias genotípicas y alélicas, con el fin de determinar una posible asociación, utilizando la plataforma estadística on-line FINETTI. Las diferencias se establecieron a partir de un nivel de significancia de $p < 0.05$. Para estimar el riesgo derivado de las diferencias significativas se calculó la Razón de momios (“Odds Ratio”,OR) se expresó en todos los casos con un intervalo de confianza del 95%.

En los Resultados arrojados por FINETTI solo tres de los SNP analizados resultaron con un valor de P significativo (Tabla 14) estos fueron: IL8 con un valor de $p= 0.04327$ con un OR de 0.701 (IC 95% = 0.496-0.990) así como IL6 con valor de $p= 0.0037$ con un OR de 2.413 (IC 95% = 1.310-4.445) y finalmente IL10-592 con valor de $p= 0.0062$ con un OR de 0.670 (IC 95% = 0.502-0.894)

Tabla 14 Resultados asociación entre casos y controles

SNP		FRECUENCIA GENOTÍPICA			FRECUENCIA ALELICA		ASOCIACION ALELO MENOS FRECUENTE CON CANCER		
		WT (%)	HET (%)	HOM* (%)	Alelo ancestral %	Alelo menos frecuente %	P	OR	IC 95%
IL 6	Casos	89 (88.1)	11 (10.9)	1 (1.0)	94.6	5.4	0.0037	2.413	1.31 0- 4.44 5
	Controles	201 (73.4)	68 (24.8)	5 (1.8)	85.8	14.2			
IL8	Casos	8 (7.9)	48 (47.5)	45 (44.6)	31.7	68.3	0.04327	0.701	0.49 6- 0.99 0
	Controles	38 (13.9)	140 (51.1)	96 (35.0)	39.4	60.6			
IL10-1082 (360)	Casos	60 (59.4)	35 (34.7)	6 (5.9)	76.7	23.3	0.5373	1.113	0.79 2- 1.56 5
	Controles N= 1060	588 (56.0)	409 (39.0)	63 (6.0)	75.5	25.5			
IL10-819 (362)	Casos	28 (27.7)	55 (54.5)	18 (17.8)	55.0	45.0	0.4677	0.898	0.67 2- 1.20 0
	Controles N= 1080	359 (33.2)	526 (48.7)	195 (18.1)	57.6	42.4			
IL10-592 (363)	Casos	15 (14.9)	66 (65.3)	20 (19.8)	47.5	52.5	0.0062	0.670	0.50 2- 0.89 4
	Controles N= 1092	360 (33.0)	532 (49.0)	197 (18.0)	57.5	42.5			
IRAQ1	Casos	47 (46.5)	24 (23.8)	30 (29.7)	58.4	41.6	0.47130	1.128	0.81 3- 1.56 3
	Controles	118 (43.1)	68 (24.8)	88 (32.1)	55.5	44.5			
IL1RN	Casos	45 (44.6)	43 (42.6)	13 (12.9)	65.8	34.2	0.7710	0.951	0.67 6- 1.33 7
	Controles	122 (44.5)	123 (44.9)	29 (10.6)	67.0	33.0			
IL1B	Casos	32 (31.7)	57 (56.4)	12 (11.9)	59.9	40.1	0.58119	1.097	0.79 0- 1.52 3
	Controles	92 (33.6)	132 (48.2)	50 (18.2)	57.7	42.3			
CD14	Casos	22 (21.8)	49 (48.5)	30 (29.7)	46.0	54.0	0.63467	0.925	0.66 9- 1.27 8
	Controles	61 (22.3)	141 (51.5)	72 (26.3)	48.0	52.0			
TLR4 (238)	Casos	94 (93.1)	7 (6.9)	0 (0)	96.5	3.5	0.50249	0.730	0.29 0- 1.83 6
	Controles	261 (95.3)	12 (4.4)	1 (0.4)	97.4	2.6			

8.7 ANALISIS ASOCIACIÓN CON CARACTERÍSTICAS SEXO Y TIPO DE TUMOR

Se realizó un análisis utilizando el paquete estadístico SPSS 15.0 (IBM, Chicago, Illinois) de asociación con las características de sexo y tipo de tumor

mediante el análisis de X^2 , con el fin de determinar la posible influencia de estas dos variables en la significación encontrada.

En los resultados obtenidos de asociación de los SNP's analizados con la característica del sexo del paciente (tabla 15) solo IRAK1 resultó con un valor de p significativo siendo este < 0.000 con un OR de 2.539 (IC 95% = 1.022-6.303).

Tabla 15 Resultados X^2 Pearson asociación con sexo

SNP		FRECUENCIA GENOTIPICA			ASOCIACION SNP CON SEXO		
		WT (%)	HET (%)	HOM* (%)	P	OR	IC 95%
IL 6	Masculino	50 (90.9)	5 (9.1)	0 (0)	0.436	<0.000	0-NaN
	Femenino	39 (84.8)	6 (13.0)	1 (2.1)			
IL8	Masculino	6 (10.9)	28 (50.9)	21 (38.2)	0.252	0.566	0.255-1.252
	Femenino	2 (4.3)	20 (43.5)	24 (52.2)			
IL10-1082 (360)	Masculino	36 (65.5)	18 (32.7)	1 (1.8)	0.115	0.151	0.017-1.350
	Femenino	24 (52.2)	17 (36.9)	5 (10.9)			
IL10-819 (362)	Masculino	14 (25.5)	28 (50.9)	13 (23.6)	0.247	2.538	0.830-7.760
	Femenino	14 (30.4)	27 (58.7)	5 (10.9)			
IL10-592 (363)	Masculino	6 (10.9)	35 (63.6)	14 (25.5)	0.195	2.276	0.765-6.511
	Femenino	9 (19.6)	31 (67.4)	6 (13.0)			
IRAK1	Masculino	34 (61.8)	0 (0)	21 (38.2)	<0.000	2.539	1.022-6.303
	Femenino	13 (28.3)	24 (52.2)	9 (19.6)			
IL1RN	Masculino	25 (45.5)	23 (41.8)	7 (12.7)	0.980	0.972	0.302-3.127
	Femenino	20 (43.5)	20 (43.5)	6 (13.0)			
IL1B	Masculino	16 (29.1)	31 (56.4)	8 (14.5)	0.613	1.787	0.501-6.366
	Femenino	16 (34.8)	26 (56.5)	4 (8.7)			
CD14	Masculino	9 (16.3)	26 (47.3)	20 (36.4)	0.176	2.057	0.644-5.011
	Femenino	13 (28.3)	23 (50.0)	10 (21.7)			
TLR4 (238)	Masculino	51 (92.7)	4 (7.3)	0 (0)	0.882	<0.000	0-NaN
	Femenino	43 (93.5)	3 (6.5)	0 (0)			

o

En tanto al análisis de asociación entre el SNP y la característica del tipo de tumor (Tabla 16) ya sea sólido o hematológico en los resultados obtenidos ninguno de los SNP's analizados presentó valor de p significativo (<0.05).

Tabla 16 Resultados X² Pearson asociación con tipo de tumor

SNP		FRECUENCIA GENOTÍPICA			ASOCIACION SNP CON TIPO DE TUMOR		
		WT (%)	HET (%)	HOM* (%)	P	OR	IC 95%
IL 6	Sólido	61 (87.2)	8 (11.4)	1 (1.4)	0.768	<0.000	0-NaN
	Hematológico	28 (90.3)	3 (9.7)	0 (0)			
IL8	Sólido	6 (8.6)	33 (47.1)	31 (44.3)	0.936	0.965	0.412- 2.258
	Hematológico	2 (6.5)	15 (48.4)	14 (45.1)			
IL10-1082 (360)	Sólido	39 (55.7)	27 (38.6)	4 (5.7)	0.460	0.878	0.152- 5.070
	Hematológico	21 (67.7)	8 (25.8)	2 (6.5)			
IL10-819 (362)	Sólido	21 (30.0)	40 (57.1)	9 (12.9)	0.143	0.761	0.300- 1.931
	Hematológico	7 (22.6)	15 (48.4)	9 (29.0)			
IL10-592 (363)	Sólido	13 (18.6)	45 (64.5)	12 (17.1)	0.226	0.594	0.215- 1.644
	Hematológico	2 (6.5)	21 (67.7)	8 (25.8)			
IRAQ1	Sólido	33 (47.1)	15 (21.4)	22 (31.4)	0.681	1.317	0.509- 3.406
	Hematológico	14 (45.2)	9 (29.0)	8 (25.8)			
IL1RN	Sólido	32 (45.7)	30 (42.9)	8 (11.4)	0.802	2.223	0.084- 0.591
	Hematológico	13 (41.9)	13 (41.9)	5 (15.2)			
IL1B	Sólido	22 (31.4)	40 (57.1)	8 (11.4)	0.968	0.871	0.241- 3.140
	Hematológico	10 (32.2)	17 (54.9)	4 (12.9)			
CD14	Sólido	15 (21.4)	35 (50)	20 (28.6)	0.898	0.84	0.336- 2.095
	Hematológico	7 (22.6)	14 (45.2)	10 (32.2)			
TLR4 (238)	Sólido	67 (95.7)	3 (4.3)	0 (0)	0.116	<0.000	0-NaN
	Hematológico	27 (87.1)	4 (12.9)	0 (0)			

8.8 ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

El análisis de supervivencia se realizó utilizando el método de Kaplan-Meier con el paquete estadístico SPSS 15.0 (IBM, Chicago, Illinois). La supervivencia global la cual corresponde al tiempo transcurrido desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de último contacto con el paciente y la supervivencia libre de enfermedad que corresponde al tiempo transcurrido desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de recaída. Se calculó la función de supervivencia, media y mediana de supervivencia (el tiempo en el que el 50% de los sujetos siguen sin haber desarrollado el evento), los percentiles (25, 50 y 75%) y finalmente se construyeron los gráficos de supervivencia con sus correspondientes errores estándar y los intervalos de confianza al 95%. Se realizó la comparación de curvas de supervivencia con el fin de evaluar su igualdad mediante la técnica Test Log-Rank para comprobar si estas diferencias muestrales entre los grupos (diagnostico, tipo de tumor) son diferencias significativas o se deben al azar. Finalmente las variables identificadas como posibles factores de riesgo (SNP's) se introdujeron en un análisis multivariante mediante modelo de regresión de COX con el fin de identificar cuáles de ellas tienen una influencia significativa sobre la función de supervivencia. El nivel de significación estadística asumido durante todo el estudio fue del $p < 0.05$.

8.8.1 SUPERVIVENCIA GLOBAL

Se analizó un total de 84 pacientes de los 101 que participaron en el estudio ya no fue posible conocer el estado actual del resto de los pacientes pues tras su diagnóstico, resección tumoral, tratamiento o recuperación se perdió su

o

contacto. Los resultados del análisis estadístico reportaron una media de supervivencia global de 56.94 meses (I.C 49.27 – 64.612) así como un percentil 25% de 67 meses percentil 50% de 57 meses y percentil 75% de 57 meses (Tabla 17, Ilustración 10).

Tabla 17 Supervivencia global

N° total	N° de eventos	Censurado	
		N°	Porcentaje
84	9	75	89,3%

Medias y medianas del tiempo de supervivencia

Media(a)				Mediana			
Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
56.944	3.912	49.277	64.612	57.000	14.871	27.854	86.146

a La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Percentiles

25,0%		50,0%		75,0%	
Estimación	Error típico	Estimación	Error típico	Estimación	Error típico
67.000	.	57.000	14.871	57.000	22.660

Función de supervivencia

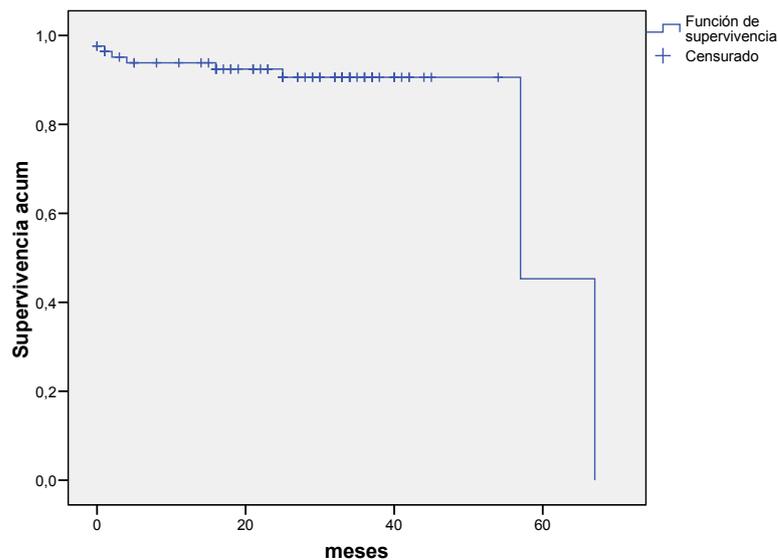


Ilustración 10 Gráfico Supervivencia global

SUPERVIVENCIA GLOBAL DE ACUERDO A DIAGNÓSTICO

Los resultados del análisis estadístico por tipo de tumor reportaron una media de supervivencia global de 54.10 meses (I.C 48.53 – 59.67) para tumor hematológico y una supervivencia global aparentemente mayor para el tumor sólido con 63.06 meses (I.C 58.99 - 67.14) (Tabla 18).

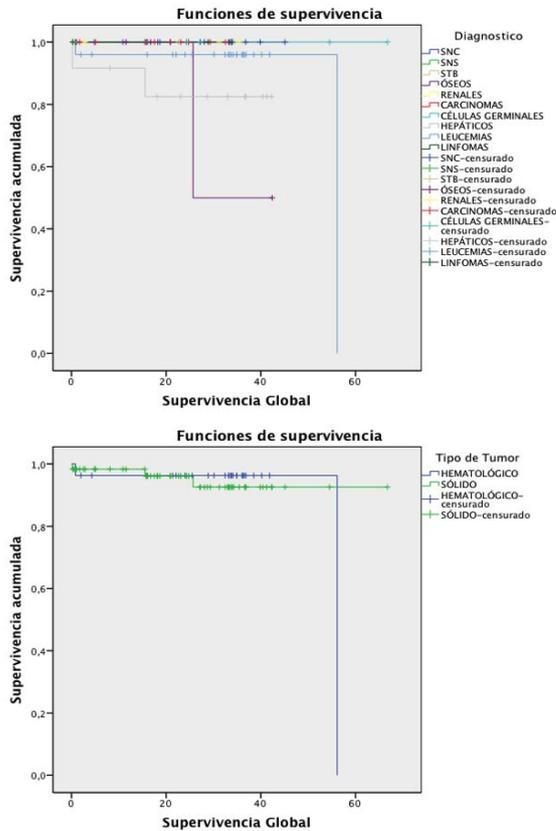
Tabla 18 Supervivencia global vs diagnóstico

Medias y medianas para el tiempo de supervivencia				
Tipo de Tumor	Media ^a			
	Estimación	Error estándar	Intervalo de confianza de 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
HEMATOLÓGICO	54.100	2.842	48.530	59.670
SÓLIDO	63.069	2.080	58.992	67.147
Global	58.630	3.791	51.199	66.061

Resumen de procesamiento de casos				
Diagnóstico	N total	N de eventos	Censurado	
			N	Porcentaje
SNC	22	0	22	100.0%
SNS	1	0	1	100.0%
STB	2	0	2	100.0%
ÓSEOS	4	1	3	75.0%
RENALES	5	0	5	100.0%
CARCINOMAS	9	0	9	100.0%
CÉLULAS GERMINALES	4	0	4	100.0%
HEPÁTICOS	12	2	10	83.3%
LEUCEMIAS	25	2	23	92.0%
LINFOMAS	3	0	3	100.0%
Global	87	5	82	94.3%

o

Sin embargo no se demostraron diferencias en la supervivencia según el tipo de tumor ($p = 0.923$ Log-Rank). Asimismo la supervivencia no se modificó según el tipo histológico ($p = 0.335$ Log-Rank) (Ilustración 11).



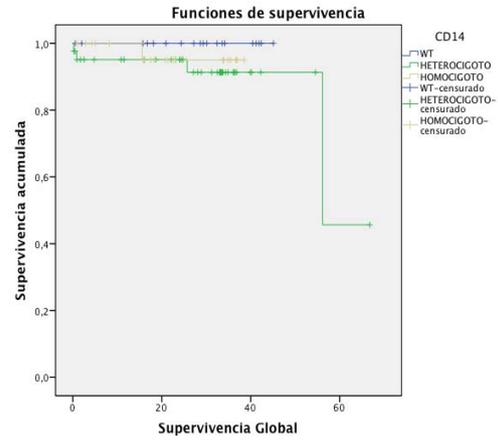
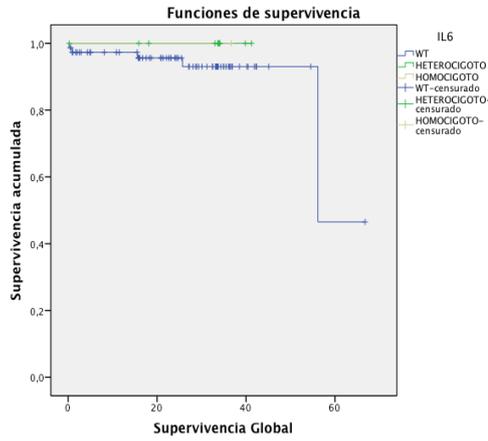
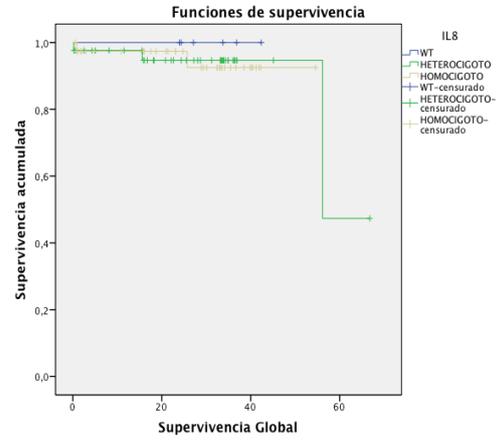
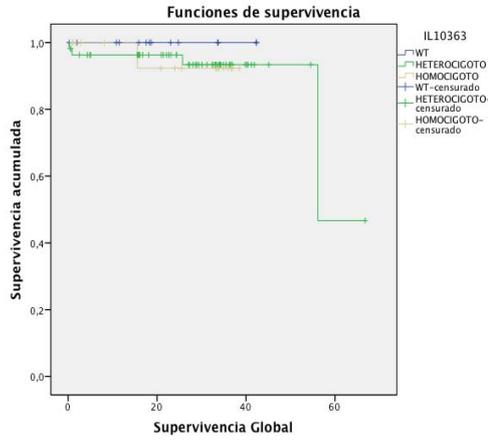
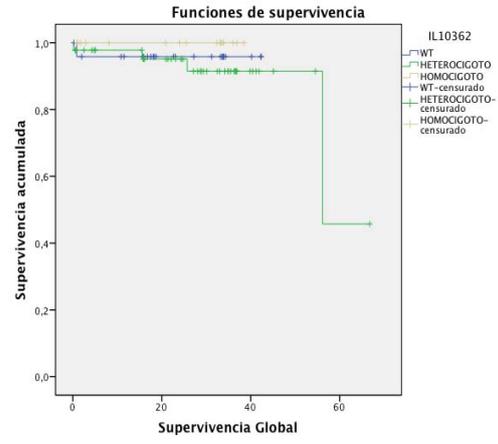
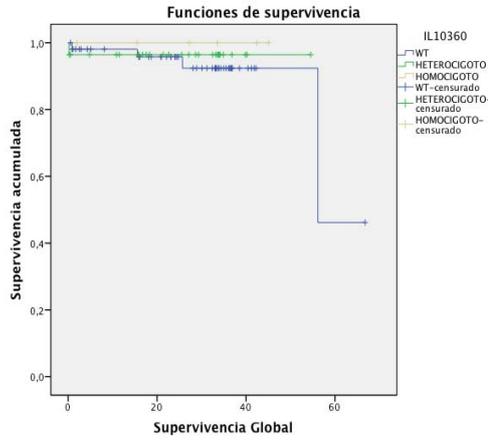
Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	10,200	9	,335

Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,009	1	,923

Ilustración 11 Gráfico Supervivencia global vs diagnóstico

SUPERVIVENCIA GLOBAL VS POLIMORFISMOS

Al realizar la comparación de curvas de supervivencia, no se observaron diferencias en la supervivencia según el SNP analizado: IL10360 ($p = 0.798$ Log-Rank), IL10362 ($p = 0.565$ Log-Rank), IL10363 ($p = 0.723$ Log-Rank), IL8 ($p = 0.840$ Log-Rank), IL6 ($p = 0.689$ Log-Rank), CD14 ($p = 0.471$ Log-Rank), IRAK1 ($p = 0.809$ Log-Rank) y IL1B ($p = 0.219$ Log-Rank). Sin embargo se mostró un resultado para ILRN de ($p = 0.051$ Log-Rank) y TLR4 ($p = 0.69$ Log-Rank) (Tabla 19, ilustración 12).



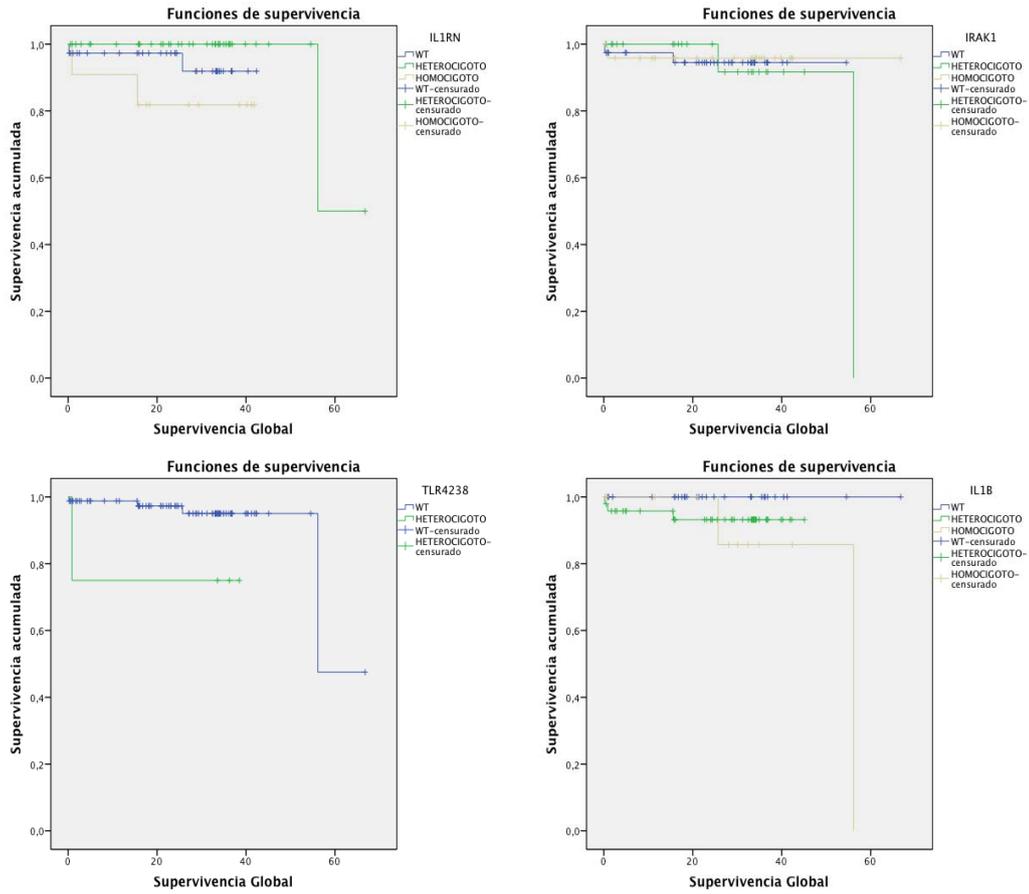


Ilustración 12 Gráfico Supervivencia global vs SNP's

Tabla 19 Supervivencia global vs SNP's

	WT	Eventos	HET	Eventos	HOM	Eventos	Log Rank
IL10360	53	4	28	1	6	0	0.798
IL10362	25	1	45	4	17	0	0.565
IL10363	14	0	55	4	18	1	0.723
IL8	6	0	42	3	39	2	0.840
IL6	75	5	11	0	1	0	0.689
CD14	19	0	42	4	26	1	0.471
IL1RN	37	2	39	1	11	2	0.051
IRAK1	39	2	23	2	25	1	0.809
TLR4	83	4	4	1	--	--	0.069
IL1B	28	0	48	3	11	2	0.219

o

Las variables pronósticas de supervivencia fueron: diagnóstico, tipo de tumor y SNP. Tras el análisis de multivariantes (regresión Cox) no se encontró una influencia, significativa ($p < 0.05$), sobre la función de supervivencia global para ninguna de las variables. (Tabla 20)

Tabla 20 Regresión Cox Supervivencia global

Variables en la ecuación						
	B	SE	Wald	g l	Sig.	Exp(B)
DIAGNÓSTICO	2.674	1.649	2.629	1	0.105	14.503
TUMOR	35.387	140.824	0.063	1	0.802	2335817327352731.000
IL10360	10.603	7.091	2.236	1	0.135	40261.312
IL10362	-5.301	7.638	0.482	1	0.488	0.005
IL10363	-0.080	7.494	0.000	1	0.992	0.923
IL8	9.365	5.885	2.532	1	0.112	11668.181
IL6	-19.555	19.363	1.020	1	0.313	0.000
CD14	4.884	3.616	1.824	1	0.177	132.119
IL1RN	2.006	4.688	0.183	1	0.669	7.436
IRAK1	-5.921	4.372	1.835	1	0.176	0.003
TLR4238	35.844	140.979	0.065	1	0.799	3688567791838036.000
IL1B	16.015	10.377	2.382	1	0.123	9019027.505

8.8.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

Se analizó un total de 84 pacientes de los 101 que participaron debido a las causas anteriormente explicadas. Tras el análisis estadístico se obtuvo una media de supervivencia libre de enfermedad de 40.969 meses (I.C 35.145 - 46.793) así como un percentil 25% de 54 meses percentil 50% de 42 meses y percentil 75% de 35 meses (Tabla 21, ilustración 13).

Tabla 21 Resultados Supervivencia libre de enfermedad

N° total	N° de eventos	Censurado	
		N°	Porcentaje
84	25	59	70.2%

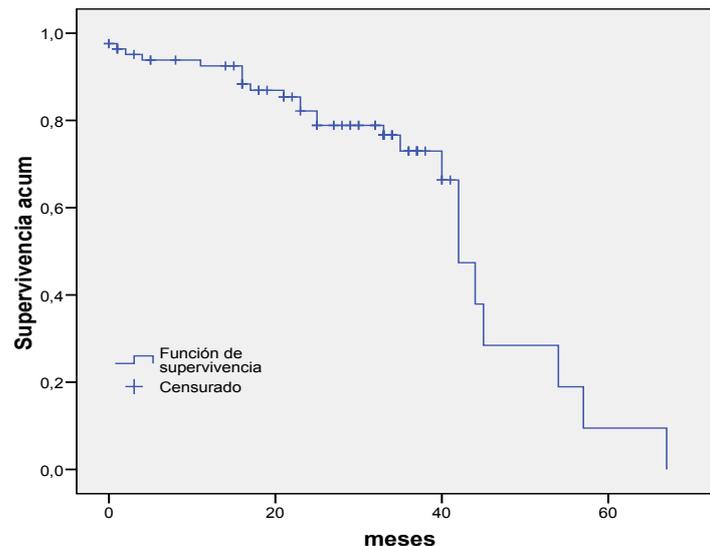
Medias y medianas del tiempo de supervivencia

Media(a)				Mediana			
Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
40.969	2.971	35.145	46.793	42.000	1.805	38.462	45.538

a La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

Percentiles

25,0%		50,0%		75,0%	
Estimación	Error típico	Estimación	Error típico	Estimación	Error típico
54.000	6.110	42.000	1.805	35.000	6.605

Función de supervivencia**Ilustración 13 Gráfico Supervivencia libre de enfermedad****SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD DE ACUERDO AL DIAGNÓSTICO**

Los resultados del análisis estadístico por tipo de tumor reportaron una media de supervivencia libre de enfermedad de 35.776 meses (I.C 32.647 – 38.905) para tumor hematológico y una supervivencia libre de enfermedad

aparentemente menor para el tumor sólido con 33.373 meses (I.C 29.454 - 37.292) (Tabla 22).

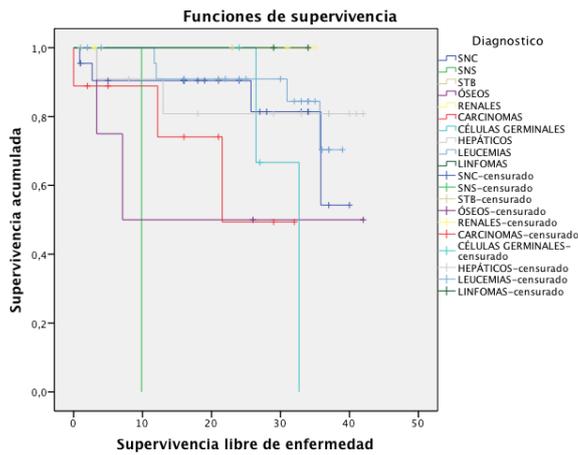
Tabla 22 Supervivencia libre de enfermedad vs diagnóstico

Medias y medianas para el tiempo de supervivencia				
Tipo de Tumor	Media ^a			
	Estimación	Error estándar	Intervalo de confianza de 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
HEMATOLÓGICO	35.776	1.597	32.647	38.905
SÓLIDO	33.373	1.999	29.454	37.292
Global	34.876	1.500	31.936	37.816

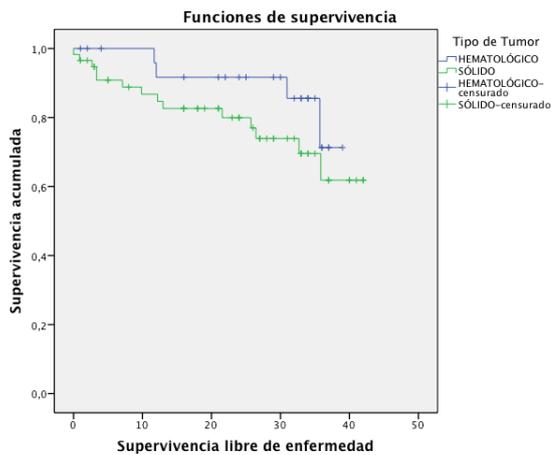
Resumen de procesamiento de casos				
Diagnóstico	N total	N de eventos	Censurado	
			N	Porcentaje
SNC	22	4	18	81.8%
SNS	1	1	0	0.0%
STB	2	0	2	100.0%
ÓSEOS	4	2	2	50.0%
RENALES	5	0	5	100.0%
CARCINOMAS	9	3	6	66.7%
CÉLULAS GEMINALES	4	2	2	50.0%
HEPÁTICOS	11	2	9	81.8%
LEUCEMIAS	25	4	21	84.0%
LINFOMAS	2	0	2	100.0%
Global	85	18	67	78.8%

Sin embargo no se demostraron diferencias en la supervivencia según el tipo de tumor ($p = 0.207$ Log-Rank). En cambio tras el análisis de comparación de funciones de supervivencia entre subtipo de diagnóstico, se obtuvo una diferencia significativa ($p = 0.035$ Log-Rank). (Ilustración 14)

o



Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	17.987	9	0.035



Comparaciones globales			
	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1.595	1	0.207

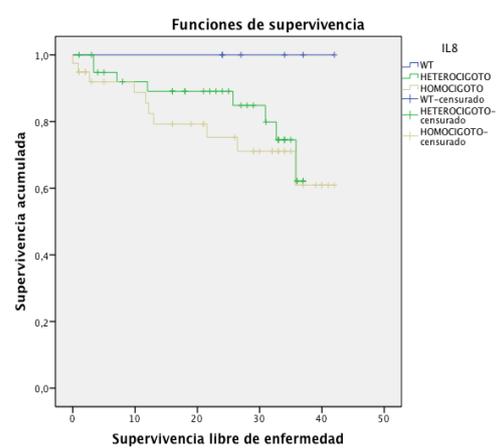
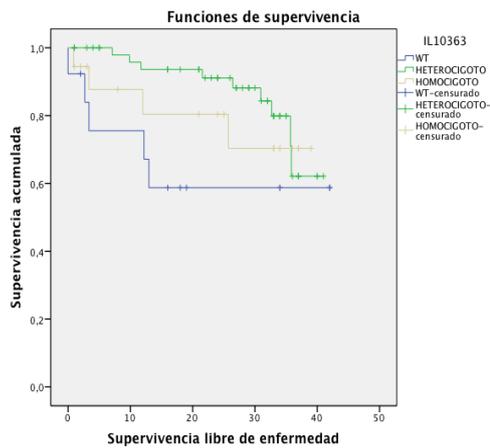
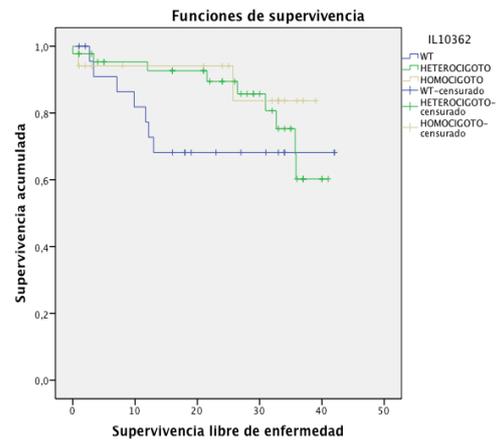
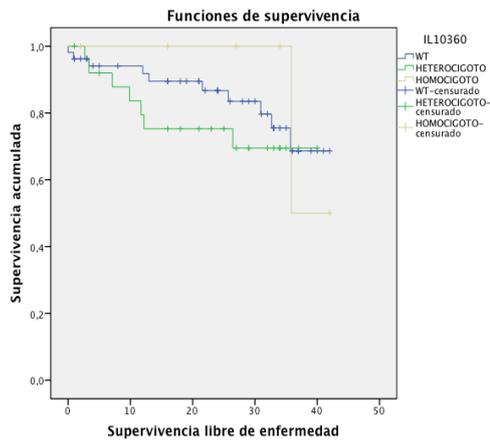
Ilustración 14 Gráfico Supervivencia libre de enfermedad vs diagnóstico

SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD VS POLIMORFISMOS

Al realizar la comparación de curvas de supervivencia no se demostraron diferencias en la supervivencia según el SNP analizado IL10360 ($p = 0.586$ Log-Rank), IL10362 ($p = 0.347$ Log-Rank), IL10363 ($p = 0.136$ Log-Rank), IL8 ($p = 0.286$ Log-Rank), IL6 ($p = 0.387$ Log-Rank), CD14 ($p = 0.672$ Log-Rank), ILRN ($p = 0.210$ Log-Rank), IRAK1 ($p = 0.922$ Log-Rank), TLR4 ($p = 0.263$ Log-Rank) y IL1B ($p = 0.254$ Log-Rank). (Tabla 23). Es importante hacer notar que el número de eventos durante el seguimiento de los pacientes fueron solamente 5, por lo que es probable que se deba a que el tiempo de seguimiento fue insuficiente.

Tabla 23 Supervivencia libre de enfermedad vs SNP's

	WT	Eventos	HET	Eventos	HOM	Eventos	Log Rank
IL10360	53	10	26	7	6	1	0.586
IL10362	24	7	44	9	17	2	0.347
IL10363	13	5	54	9	18	4	0.136
IL8	6	0	40	8	39	10	0.286
IL6	74	17	10	1	1	0	0.387
CD14	19	3	40	9	26	6	0.672
IL1RN	35	4	39	10	11	4	0.210
IRAK1	38	8	23	4	24	6	0.922
TLR4	81	18	4	0	0	0	0.263
IL1B	28	9	47	7	10	2	0.254



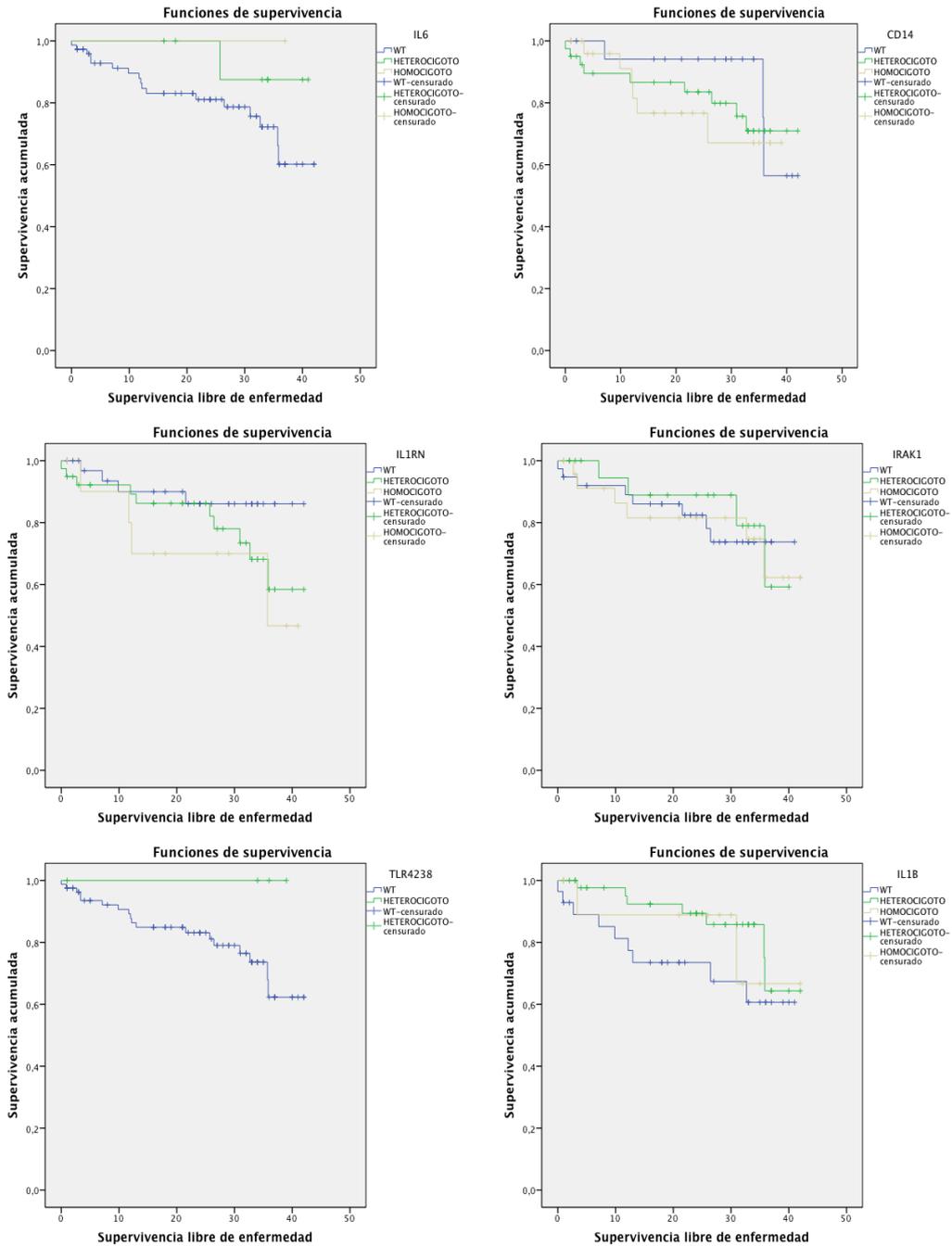


Ilustración 15 Gráfico Supervivencia libre de enfermedad vs SNP's

Las variables pronósticas de supervivencia fueron: diagnóstico, tipo de tumor y SNP. Tras el análisis de multivariantes (regresión Cox) no se encontró una influencia, significativa ($p < 0.05$), sobre la función de supervivencia global para ninguna de las variables (Tabla 24).

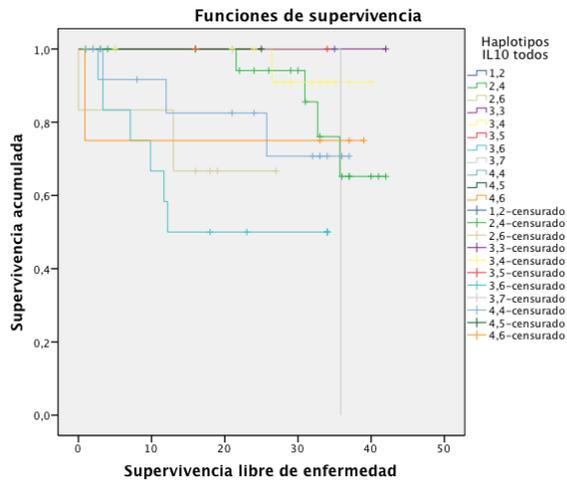
Tabla 24 Regresión Cox Supervivencia libre de enfermedad

Variables en la ecuación						
	B	SE	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
DIAGNÓSTICO	-0.031	0.091	0.114	1	0.735	0.970
TUMOR	0.329	0.783	0.177	1	0.674	1.390
IL10360B	0.566	0.538	1.108	1	0.293	1.762
IL10362B	0.020	0.799	0.001	1	0.980	1.020
IL10363B	-0.775	0.932	0.693	1	0.405	0.460
IL8B	14.389	561.491	0.001	1	0.980	1774966.643
IL6B	-1.627	1.055	2.380	1	0.123	0.196
CD14B	0.385	0.713	0.292	1	0.589	1.470
IL1RNB	0.501	0.615	0.665	1	0.415	1.651
IRAK1B	-0.340	0.522	0.424	1	0.515	0.712
TLR4238B	-14.311	1304.152	0.000	1	0.991	0.000
IL1BB	-0.717	0.521	1.893	1	0.169	0.488

SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD VS HAPLOTIPO IL10

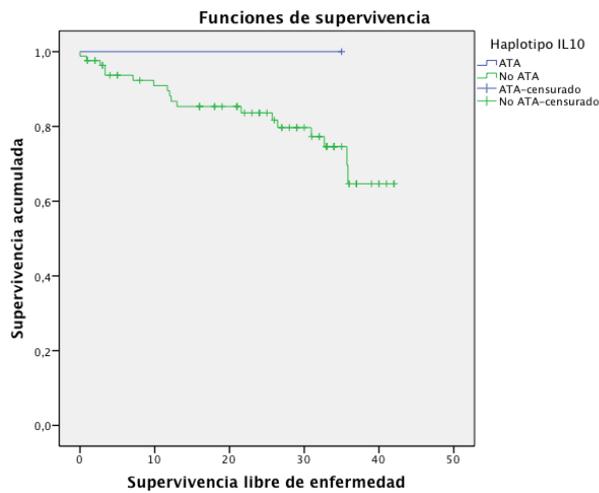
Tras el estudio de interleucina 10 como haplotipo, a pesar de no haber realizado el análisis de asociación de estos SNP's con cáncer pediátrico, debido a que no pudieron comprarse los genotipos entre casos y controles ya que en el caso de los controles los cuales fueron tomados a partir del estudio de mapa de haplotipos realizado por el Instituto Nacional de Medicina Genómica (45), sólo contamos frecuencias totales y no genotipos individuales. Con los datos disponibles, si fue posible realizar el análisis de supervivencia. Sin embargo en los resultados obtenidos al realizar la comparación de curvas de supervivencia no presentaron diferencias según los haplotipos de interleucina 10 realizando las combinaciones ($p= 0.154$ Log-Rank), ni para los haplotipos más comunes reportados como lo son ATA y no ATA ($p= 0.590$ Log-Rank) (Ilustración 16).

o



Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	14.427	10	0.154



Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	0.290	1	0.590

Ilustración 16 Gráfico Supervivencia libre de enfermedad vs Haplotipo IL10

9. DISCUSIÓN

En este estudio se incluyeron 101 casos de niños diagnosticados con cáncer infantil. Tras el análisis descriptivo del grupo en estudio se observó una mayor frecuencia de la enfermedad en el sexo masculino con un 54%. Asimismo los tipos de cáncer con mayor incidencia fueron las leucemias, los tumores del SNC y los tumores hepáticos lo cual concuerda con lo reportado en México y en la literatura (1, 2).

Se estudiaron 10 polimorfismos de genes que codifican citocinas las cuales a su vez participan activamente en la respuesta inmune innata, con el fin de estudiar su asociación con el desarrollo de cáncer pediátrico, se genotipificaron los SNP's de casos y controles, así mismo se evaluó su equilibrio de HDW.

Tras la evaluación del HWE la mayoría de los SNP's analizados entraron en equilibrio tanto para casos como controles (IL8, IL6, IL10-1082, IL10-819, IL1RN, IL1B, CD14 y TLR4), lo que nos indica que entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas no hay diferencia, por lo que podemos suponer que los apareamientos en la población ocurren al azar. A excepción de IL10-592 en el cual el resultado de sus casos tuvo un valor significativo (p -value < 0.05) e IRAK1 el cual fue significativo tanto para casos como para controles (Tabla 11).

Según los lineamientos del equilibrio de HDW las posibles razones por las que no encuentra un equilibrio, puede deberse tanto a las violaciones de las leyes que establece como: errores de genotipificación, los cuales se pueden deber a errores técnicos o por la posibilidad de un sesgo no sistemático por la medición

o

no simultánea de los casos y de los controles, problemas de identificación y codificación e incluso subjetividad en la valoración de las lecturas de los resultados. Si los genotipos de los controles de una población determinada no se ajustan al HWE lo primero que hay que hacer es estar seguros de que no se trata de un error de este tipo. Sin embargo cuando los controles que tienen como función representar a la población general se encuentran en equilibrio de HDW, mientras que el desequilibrio se encuentra en los casos sugiere una asociación entre la variación y la enfermedad (48). En base a esto, tras el análisis de resultados se concluyen las posibles razones de su desequilibrio descartando errores de genotipificación debido a que los demás SNP analizados se ajustan al HWE. En cuanto al SNP IL10-592 en el cual los genotipos correspondientes a los casos no entraron en un equilibrio puede deberse, ya sea a que la población analizada sea pequeña o no lo bastante grande para minimizar el efecto de la deriva genética, que causa un cambio aleatorio en las frecuencias genotípicas, esto es debido al efecto de muestreo ó a la asociación verdadera de la variante con la enfermedad. Finalmente en el caso particular del IRAK1 su desviación tanto en casos como controles, se puede deber a ausencia de diploidia, ya que el gen en consideración se localiza en un cromosoma X, es decir que tiene un número distinto de copias para cada sexo, sin embargo al ajustar este equilibrio a solo mujeres para su evaluación siguió reportando resultados significativos, por lo tanto se puede concluir que existe desviación evidente de HWE.

o

Los polimorfismos que presentaron asociaciones génicas significativas con cáncer pediátrico fueron IL6, IL8 e IL10-592. Se sabe que estos SNP's se localizan en regiones promotoras, lo que permite postular que el mecanismo subyacente implicado, podría estar relacionado con el control de la expresión de estos genes. A continuación se discutirán a detalle los resultados obtenidos en relación con cada una de estas citocinas, así como las bases moleculares de su participación en oncogénesis.

Interleucina 6 (IL-6) -174G/C (rs1800795)

La IL6, es una citocina que constituye uno de los mediadores más importantes de la respuesta inflamatoria aguda, es la principal estimuladora de la producción de la proteína C-reactiva, amiloide sérico A, ceruloplasmina, haptoglobina, hemopexina y ferritina; promueve la diferenciación y maduración de los linfocitos T y B, estimula la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B, inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1. Así mismo se sabe que coestimula el crecimiento de diferentes colonias de precursores hematopoyéticos; promueve el crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos e interviene en la proliferación y maduración de la serie megacariocítica. En este sentido IL-6 presenta tanto acciones proinflamatorias como antiinflamatorias (17, 18).

El gen que codifica para esta proteína se encuentra en el cromosoma 7p21 y se ha identificado el SNP en la región 50 del promotor del gen IL6-174 (G o C) estudios que proponen que este polimorfismo influye en los niveles de

o

expresión de esta citocina, con el consecuente efecto sobre las respuestas inmunológicas mediadas por ésta (17).

Diversos estudios han sido realizados con el fin de estudiar su asociación con el desarrollo de cáncer. Apoyando a nuestros resultados, se ha reportado que los individuos con el alelo G en la posición 174 se caracterizan por producir mayores niveles de IL-6 comparado con aquellos con el genotipo C/C. Gatti L. y cols. 2017 (20) en base a sus resultados en un estudio de 56 pacientes residentes del norte de Brasil mostraron la asociación entre el genotipo GG de IL-6-174 y la presencia de adenocarcinoma gástrico, reportando en su población de riesgo una frecuencias del 75% para los homocigotos (GG), el 23% en heterocigotos (GC), y sólo el 2% era genotipo como alelo CC. Con lo cual sus resultados sugieren que el genotipo GG de IL6 es un factor biológico importante en desarrollo de adenocarcinoma. Así mismo Lagma Y. J. y cols. 2009 (22) Han reportado que los individuos homocigotos G/G producían concentraciones mayores de IL-6 ($5,35 \pm 3.01$ pg / litro) en comparación con aquellos con el genotipo G/C ($3,96 \pm 2,71$ pg / ml) o C/C ($3,52 \pm 2,4$ pg/mL). Reportaron también que en su población de pacientes con neuroblastoma el 57,3% de ellos eran portadores del genotipo G/G, los autores observaron una asociación entre IL6 174 G>C, progresión de la enfermedad y supervivencia. Esta asociación ofrece una relación mecanicista entre el microambiente y el potencial de crecimiento del tumor. Aunado a esto Briseis, Aschebrook Kilfoy, y cols. 2012 (19) reportaron que el genotipo IL6 C/C esta significativamente asociado con una disminución del riesgo de muerte, así como de recaída y de segundas neoplasias en pacientes con linfoma no-Hodgkin (NHL). Los

o

pacientes con niveles séricos elevados de IL6 tienen una tasa de supervivencia general más pobre en comparación con los pacientes con niveles normales.

En el presente estudio este SNP rs1800795 del gen IL 6 -174G/C presentó una asociación estadísticamente significativa con cáncer pediátrico. Principalmente esta asociación se obtuvo con el homocigoto para el alelo menor (G/G), con valor de $p= 0.0037$ con un OR de 2.413 y IC 95% = 1.310-4.445 (Tabla 14).

Con base en lo obtenido, este SNP se asoció como un factor de riesgo a la presencia del genotipo homocigoto para el alelo menor (G/G) en posición -174 con el desarrollo de la enfermedad. Previamente se ha reportado que la presencia de este alelo está relacionado a producción de niveles aumentados de IL-6, por lo que puede postularse que esta variación produciría cambios en la expresión, provocando una desregulación en la síntesis de esta citocina, lo que tendría como consecuencia un aumento de la respuesta inflamatoria, con lo que es posible explicar su asociación al desarrollo tumoral.

Interleucina 8 (IL-8) -251 A/T (rs4073)

La IL-8 es conocida por su actividad quimiotáctica para los eosinófilos y linfocitos, principalmente células T y su capacidad para producir la desgranulación de los neutrófilos. Se ha demostrado que está implicada en una amplia variedad de procesos en la patogénesis de cáncer, incluyendo tumorigénesis, angiogénesis, adhesión, invasión o metástasis. El gen que codifica a dicha proteína se localiza en el cromosoma 4q13- q21, en la región del promotor se ha identificado el SNP -251A/T, el cual ha demostrado que

o

influye en sus niveles de expresión, el alelo A se correlaciona con una elevada producción de dicha proteína (17).

Estudios anteriores sobre la asociación de -251A/T polimorfismo con diferentes tipos de cáncer presenta resultados contradictorios. Lin-Bo Gao, y cols.2010 (23). Al evaluar el efecto de este SNP con la susceptibilidad a cáncer, realizando un meta-análisis de 14,876 casos con diferentes tipos de cáncer y 18,465 controles de 45 estudios de casos y controles, encontraron que el genotipo AA/AT se asoció con un aumento significativo del riesgo de carcinoma nasofaríngeo (OR = 1.48; IC del 95%, 1.16-1.89). Además, se observó que el genotipo AA se asocia con un aumento del riesgo a cáncer en población africana, pero no para la población de Asia o Europa. Del mismo modo, Wang Z. y cols. 2013 (24) realizaron un meta-análisis en el cual investigaron la asociación con el riesgo de cáncer oral, analizando seis estudios publicados con un total de 1,324 casos de cáncer oral y 1,879 controles sanos. Sus resultados mostraron que los genotipos AA y AT se asociaron con un mayor riesgo de cáncer oral (OR = 1.23, IC del 95%: 1.03 a 1.46; $p = 0.025$; OR = 1.25; IC del 95%: 1.07 a 1.47; $p = 0.006$; respectivamente). En el análisis de subgrupos por etnia, obtuvieron asociaciones significativas entre AA y AT y un mayor riesgo de cáncer oral entre las poblaciones caucásicas (OR = 1.29; IC del 95%: 1.06 a 1.57; $p = 0.011$). Sin embargo, no encontraron valores estadísticamente significativos entre las poblaciones asiáticas. En el meta-análisis realizado por Dluzniewski P. y cols. 2012 (28). Se analizaron 13,189 casos y 16,828 controles procedentes de 42 estudios caso-control, sus resultados mostraron que los portadores del alelo A tenían riesgo elevado de

o

cáncer de mama, cáncer gástrico y cáncer nasofaríngeo y un riesgo reducido para el cáncer de próstata, pero no se encontró ninguna evidencia que indique que los portadores de este alelo se asocia a cáncer colorrectal ni pulmonar. Cuando se estratificó por descendencia racial, se encontró que los portadores del alelo A se asociaron con un mayor riesgo de cáncer entre el grupo africano y asiático, pero no en el grupo europeo. Lo que puede indicar que es un factor de riesgo etnia-dependiente para cáncer.

Contrariamente a lo anterior Rafrafi A. y cols. 2013 (38), evaluaron la relación entre IL-8 (-251 A/T) y el riesgo a cáncer de pulmón de células no pequeñas en la población tunecina. Encontraron una asociación significativa para el genotipo TT (OR = 2.55, P = 0.004) entre los pacientes de adenocarcinoma y tipo de adenocarcinoma CPNM (OR = 1.72, P = 0.003). Asimismo, el alelo T fue altamente asociado con tumores de mayor tamaño y estadios avanzados de NSCLC. Al igual que el estudio realizado por Lang Q. y cols. 2006 (39), al evaluar la asociación IL 8 -251 A/T y la supervivencia global del linfoma folicular, encontraron que el genotipo TT se asoció a menor supervivencia, los investigadores proponen que los niveles altos de IL-8 (relacionado con inflamación) pueden desempeñar un papel protector en el linfoma folicular.

Las investigaciones comentadas previamente muestran que se han realizado gran número de estudios de epidemiología molecular para evaluar el papel del SNP IL8-251T/A y su asociación con diferentes tipos de cáncer como el de mama, colorrectal, gástrico, oral, de pulmón, de próstata, entre otros. Los diversos estudios han reportado diferentes frecuencias alélicas del SNP

o

IL8-251T/A de acuerdo las áreas geográficas y las poblaciones étnicas. Además, se ha observado que la asociación del alelo varía de un tipo de cáncer a otro; por lo que el efecto del polimorfismo podría ser tejido específico.

El análisis de los resultados en el presente estudio reportó una asociación estadísticamente significativa del SNP IL-8 -251 A/T (rs4073) del genotipo homocigoto para el alelo (T/T) con cáncer pediátrico con un valor de $p= 0.04327$ y OR de 0.701 con IC 95% de 0.496-0.990 (Tabla 14).

Con base en lo obtenido, este SNP se asoció como un factor de riesgo a la presencia del genotipo homocigoto para el alelo (T/T) en posición -251. Previamente se ha reportado que la presencia de este alelo está relacionado a la producción de niveles disminuidos de IL-8, por lo cual postulamos que los niveles de IL-8 más altos (relacionado con inflamación) puede desempeñar un papel protector en el desarrollo tumoral, esto podría deberse a que IL-8 es conocida por su actividad quimiotáctica celular, principalmente para eosinófilos y linfocitos, así como a su capacidad para producir la desgranulación de neutrófilos.

SNP Interleucina 10 (IL-10) o CSIF (human cytokinesynthesisinhibitory factor) -1082 G/A rs1800896, -819C/T rs1800871, -592 C/A rs1800872.

IL10 es una citocina anti-inflamatoria producida por los macrófagos, células T-helper 2 y linfocitos B. Se ha demostrado que inhibe varias funciones inmunes, tales como; la presentación de antígenos, la producción de citocinas, activación

o

de macrófagos, proliferación de células T e Inhibiendo la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como, IL1, IL2, IL3, IL6, TNF α (18).

IL-10 está codificada por un gen localizado en el cromosoma 1 (1q31-1q32, se sabe que contiene al menos 27 sitios polimórficos. Estos polimorfismos incluyen los SNP's en -1082 (rs1800870), -819 (rs1800871) y -592 (Rs1800872). Estos polimorfismos se localizan en la región promotora del gen de IL10 el alelo G en el SNP -1082 se asocia a un aumento en la expresión y el alelo A en la posición -592 con una disminución en la expresión (17).

Diversos estudios previos se han realizado para la búsqueda de este SNP y su relación con el riesgo al desarrollo del cáncer con resultados contrapuestos. Sicinski. L. y cols. 2006 (49). Al estudiar la asociación de este SNP IL10-592 con cáncer gástrico en 183 casos y 377 controles de población mexicana, reportaron asociación significativa para los sujetos homocigotos para el alelo AA con un mayor riesgo a desarrollar cáncer gástrico (OR 2.20; 95% CI 1.04 a 4.65). Así mismo Chiurillo M.A. 2014 (43). Mediante un meta-análisis donde estudiaron la asociación de este SNP-592 con cáncer gástrico en algunos países de América Latina, encontraron que el SNP's IL-10 -592 C/A se asocia con mayor riesgo de cáncer gástrico (AA y CA) en la población de Costa Rica y Brasil. Otro estudio han reportado una asociación positiva con el SNP -1082 en donde tanto el genotipo GG como AG se han asociado a un mayor riesgo a cáncer oral (41). Asimismo, con un aumento del riesgo de cáncer gástrico (OR 1,2; IC del 95%: 0,6 a 3,2, P = 0,007) (26). También se ha asociado a una menor supervivencia en pacientes con linfoma de células B (OR 1.48; 95% CI, 0.91 a 2.38) (50).

o

En el presente estudio no se encontró una asociación estadísticamente significativa para los SNP's del gen IL-10 en -1082 G/A rs1800896 y -819C/T rs1800871 con cáncer pediátrico ($p=0.5373$, OR de 1.113 con IC 95% de 0.792-1.565 y $p=0.4677$, OR de 0.898 con IC 95% de 0.672-1.200 respectivamente). Sin embargo, si para la variación en IL10-592 C/A (rs1800872) encontrando una asociación significativa positiva para el genotipo homocigoto (A/A) obteniendo un valor de $p=0.0062$ y OR de 0.670 con IC 95% de 0.502-0.894 (Tabla 14), cabe mencionar que esta variante no se encontró en equilibrio de HDW en los casos.

Con base en lo obtenido, el SNP IL10-592 C/A rs1800872 se asocia como un factor de riesgo a la presencia del genotipo homocigoto para el alelo (A/A) en posición -592. Previamente se ha reportado que la presencia de este alelo esta relacionado a producción de niveles disminuidos de IL-10. Debido a que se ha demostrado que esta citocina tiene una propiedad anti-inflamatoria, Inhibiendo la síntesis de citocinas pro-inflamatorias. Podemos postular que los cambios en su expresión se asocian con aumento en la respuesta inflamatoria y con esto su posible asociación al desarrollo tumoral.

Siete de los SNP estudiados: IL1RN, IL1B, CD14, TLR4, IL10-1082, IL10-819 e IRAK1, reportaron resultados no significativos ($P>0.05$), es decir no se relacionaron con la enfermedad, ya que no se encontraron diferencias entre las frecuencias genotípicas entre los casos y los controles, así mismo no se asociaron a las características independientes como subtipo de cáncer, tipo de

o

tumor y sexo. A excepción de IRAK1 en el cual se corroboró su asociación al sexo debido a su localización en el cromosoma X.

Las posibles razones que pudiesen explicar nuestros resultados negativos y el contraste con los estudios realizados previamente, puede deberse a que los estudios de asociación genética presentan algunos desafíos adicionales a los tecnológicos y metodológicos. Entre las posibles causas de tales inconsistencias son los reportes falso positivos o falso negativos que fallan en replicar una asociación válida entre los estudios comparados. Es posible también que la falla de replicación, se deba al débil efecto que tienen las variantes causales en el riesgo de enfermedad. En la mayoría de los estudios de asociación, la variable causal se asocia con un 10-15% de aumento del riesgo de enfermedad, y por lo tanto se requieren tamaños de muestras de miles de pacientes para alcanzar un valor nominal de $p < 0.05$. Por lo que la principal limitación de nuestro estudio puede deberse al tamaño de la muestra, es posible que nuestras asociaciones sean reales pero no reproducibles debido a que el efecto de la variable de riesgo es muy débil. Aunque los resultados que hemos obtenido tienen suficiente poder estadístico, una población mayor permitiría aumentar la potencia del análisis estadístico y así ampliar los resultados obtenidos.

Otro factor que resta poder de detección de la asociación es el estudio de enfermedades complejas como lo es el cáncer, debido a la heterogeneidad de la enfermedad, ya que esta no ha sido bien definida y se asocia a distintas enfermedades subyacentes, así como la influencia de distintos factores

o

ambientales. Este mecanismo contrasta con el modelo de enfermedad mendeliana, en donde generalmente la presencia o ausencia de un alelo causal predice completamente la presencia o ausencia de la enfermedad. Para las enfermedades complejas los alelos de riesgo son menos determinantes, no suelen funcionar individualmente, sino que trabajan en coordinación con otros SNP's para manifestar la enfermedad por lo que el riesgo se mide de manera más probabilística. Finalmente dado que existen diferencias genéticas entre los SNP's en distintos contextos poblacionales este es otro factor importante, ya que la ancestralidad de una población puede tener influencia en el impacto de cada variante génica en el riesgo a la enfermedad (51, 52).

Asociación con supervivencia

Finalmente al realizar el análisis de asociación de los polimorfismos con supervivencia, mediante la técnica Test Log-Rank. Tanto para el subtipo de diagnóstico como para los haplotipos de IL10, no se obtuvo resultado significativo para la supervivencia global, de manera que se puede decir que no existen diferencias en el tiempo de supervivencia entre los grupos (Ilustración11). En cambio para la supervivencia libre de enfermedad según el subtipo de diagnóstico se obtuvo una diferencia significativa (Ilustración 14). Es importante mencionar que estos resultados podrían no ser confiables ya que el tamaño muestral para cada subtipo de cáncer fue muy pequeño. Finalmente las variables identificadas como posibles factores de riesgo (SNP) tras el análisis de multivalentes (regresión Cox) no mostraron una significancia estadística (Tabla 20, 24) lo cual nos dice que no existe una influencia sobre la función de supervivencia tanto global como libre de enfermedad y los SNP estudiados.

o

Existen estudios previos sobre la asociación de la supervivencia con solo algunos de los SNP's estudiados, como el realizado por: Lagmay J. y cols. 2009 (22) y Aschebrook Kilfoy, y cols. 2012 (19) Quienes reportaron asociación de IL6-174 G/G y la disminución de supervivencia en pacientes con neuroblastoma y linfoma no-Hodgkin respectivamente, Lan Q. y cols. 2006 (39) asociaron a IL8-251 T/T con menor supervivencia en pacientes con linfoma folicular, Habermann T.M. y cols. 2008 (50) asociaron a IL10-1082 G/G con una menor supervivencia en pacientes con linfoma de células B. De igual manera mediante estudios *in vitro* Seiffert M. y cols. 2010 (32), reportaron asociación de CD14 con mayor supervivencia en líneas células de leucemia linfocítica crónica y finalmente Srivastava R. y cols. 2012 (29) asociaron a IRAK1 con la supervivencia en líneas celulares de melanoma.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, aunque puede tener limitaciones, nuestro análisis postula una nula asociación de los SNP's con la supervivencia, sin embargo el aumento de las variables como el tamaño de la muestra y la duración del seguimiento serian necesarios para poder confirmar estos resultados.

Finalmente aunque la función precisa de los polimorfismo en el desarrollo del cáncer es desconocido, un mecanismo plausible es que las variaciones de SNP's pueden aumentar la transcripción del gen con esto la producción de la proteína y afectando finalmente su función, atribuyendo eventualmente a la correlación entre el SNP y el riesgo de cáncer.

o

Los datos relativos de estos SNP's y sus asociaciones con diferentes tipos de cáncer pueden ser contradictorios y es difícil concluir algo definitivamente. Tales discrepancias en los resultados de diferentes autores se pueden explicar por las diferencias en averiguación, criterios de inclusión, el diseño del estudio, y las poblaciones. Por ejemplo, por las diferencias en la estratificación, los métodos de diagnóstico, tamaño de la muestra, peculiaridades étnicas así como por diferencias metodológicas.

Sin embargo es importante mencionar que no se han reportado estudios previos al nuestro realizados para la evaluación de estos SNP's para cáncer pediátrico en población mexicana. El estudio de esta población es importante, ya que en edad pediátrica se tienen características específicas, pues debido a su desarrollo, tienen una dinámica constante en su estado de salud y son expuestos de forma longitudinal a influencias de carácter biológico y ambiental. Dichas variables en los adultos se convierten en factores de riesgo o factores protectores y/o promotores, por ello en edad adulta es más complejo analizar su exposición a ellas (5) .

Por lo tanto, nuestro estudio es un aporte importante ya que nuestros resultados evidencian el efecto de 10 polimorfismos simultáneamente evaluados en genes implicados en la respuesta inmune innata, proceso que puede potenciar el riesgo de cáncer, no solo es de aporte en base al tipo de población estudiada sino también, enfatizando la importancia de la evaluación de múltiples polimorfismos asociados a una misma respuesta funcional. Ya que debido a que es un análisis combinado que involucra diversos polimorfismos en

o

genes de citocinas responsables de procesos tanto proinflamatorios como antiinflamatorios, permite una evaluación mas completa de la interacción, por lo tanto la determinación de los perfiles genéticos de asociaciones pueden ser más informativos sobre el proceso de la enfermedad.

Sin embargo es importante tomar en cuenta que, puesto que la acción o efecto de una determinada variante dentro de un gen debe interpretarse en el contexto de una red compleja que incluya además de interacciones con otras variantes y con el medio ambiente la propia complejidad de la ruta biológica en la cual el gen está inmerso. Así mismo estas variaciones pueden ser en sí mismas funcionales y estar relacionadas a la enfermedad, pero en algunos casos, reflejan el mapeo y ubicación de los verdaderos sitios relevantes en base a la cercanía de los posibles verdaderos genes responsables de la patología.

10. CONCLUSIONES

1. En este estudio se analizó la asociación de polimorfismos en genes que participan en la inmunidad innata en 101 casos de niños mexicanos diagnosticados con cáncer pediátrico. Clasificados conforme al subtipo de diagnóstico se incluyó el porcentaje de 27.7% pacientes con Leucemia, 25.5% Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), 12.9% Tumores hepáticos, 10.9% Carcinomas, 5% Sarcomas de tejidos blandos (STB), 5% Tumores renales, 4% Tumores óseos, 4% Tumores germinales, 4% Linfomas y 1% Neuroblastomas.
2. Las principales asociaciones génicas con cáncer pediátrico detectadas entre los polimorfismos analizados y las características clínico-biológicas han sido las correspondientes a polimorfismos ubicados en los genes de interleucina 8 (IL8-251) con un valor de $p= 0.04327$, $OR= 0.701$ (IC 95% = 0.496-0.990), así como interleucina 6 (IL6-174) con valor de $p= 0.0037$, $OR= 2.413$ (IC 95% = 1.310-4.445) y finalmente interleucina 10 (IL10-592) con valor de $p= 0.0062$, $OR= 0.670$ (IC 95% = 0.502-0.894).
3. En relación con estudio de asociación entre los SNP's y su efecto en el tipo de tumor no se observó significancia estadística.
4. Mediante la determinación de la influencia entre el tiempo de supervivencia de la enfermedad y la presencia de los polimorfismos. No se encontró asociación estadísticamente significativa sobre la función de supervivencia tanto global como libre de enfermedad y los SNP

o

estudiados, sin embargo, el tamaño muestral y el tiempo de seguimiento pudieron ser factores que influyen en estos resultados.

11. PERSPECTIVAS

Mediante los resultados obtenidos en el presente trabajo es posible proponer las siguientes perspectivas con el fin de validar la investigación e ir más allá de los resultados preliminares.

1. Realizar la validación de la significancia de los SNP aumentando el número muestral en el análisis con la finalidad de confirmar carácter predictivo en poblaciones más amplias.
2. Es conveniente realizar un estudio de asociación entre los SNP y su efecto en cada subtipo de cáncer pediátrico, con el fin de obtener una mayor información sobre la participación de las interleucinas estudiadas en la particularidad de la fisiopatología de cada subtipo.
3. Realizar el estudio de Interleucina 10 en función de haplotipos y con el fin de comparación con lo confirmado los resultados del análisis individualizado.
4. Realizar un estudio aditivo de los 10 SNP's involucrados con el fin de evaluar las combinaciones génicas y así proporcionar una información

o

más completa que la derivada del análisis individualizado de los polimorfismos.

5. Tras confirmar la asociación tomando en cuenta los puntos anteriores esta podrá corroborarse realizando un análisis funcional estudiando su efecto de manera *in vivo* mediante ratones knockout o por cultivo celular.

12. ANEXOS

ANALISIS PROGRAMA FINNETTI

SNP	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium		Tests for association (C.I.: 95% confidence interval)				
	Controls	Cases	allelefreq. difference	heterozygous	homozygous	allelepositivity	Armitage's trend test
IL8	n11=38 (42.57) n12=140 (130.86) n22=96 (100.57) f_a1=0.39 +/- 0.020 F=- 0.06983 p=0.247692 (Pearson) p=0.246384 (Llr) p=0.311101 (Exact)	n11=8 (9.71) n12=46 (42.59) n22=45 (46.71) f_a1=0.31 +/- 0.032 F=- 0.08017 p=0.425051 (Pearson) p=0.420335 (Llr) p=0.491882 (Exact)	Riskallele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	commonodds ratio
			Odds_ratio=1.427 C.I.=[1.010-2.017] chi2=4.08 p=0.04327 (P)	Odds_ratio=1.561 C.I.=[0.679-3.586] chi2=1.11 p=0.29153	Odds_ratio=2.227 C.I.=[0.961-5.161] chi2=3.60 p=0.05770	Odds_ratio=1.832 C.I.=[0.823-4.076] chi2=2.25 p=0.13333	Odds_ratio=1.479 chi2=4.38 p=0.03645
			Riskallele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	commonodds ratio
			Odds_ratio=0.701 C.I.=[0.496-0.990] chi2=4.08 p=0.04327 (P)	Odds_ratio=0.701 C.I.=[0.431-1.140] chi2=2.06 p=0.15114	Odds_ratio=0.449 C.I.=[0.194-1.041] chi2=3.60 p=0.05770	Odds_ratio=0.647 C.I.=[0.406-1.032] chi2=3.36 p=0.06692	Odds_ratio=0.677 chi2=4.38 p=0.03645
IL6	n11=201 (201.55) n12=68 (66.90) n22=5 (5.55) f_a1=0.86 +/- 0.015 F=- 0.01648 p=0.785067 (Pearson) p=0.782535 (Llr) p=1.000000 (Exact)	n11=89 (88.42) n12=11 (12.16) n22=1 (0.42) f_a1=0.94 +/- 0.018 F=0.095 p=0.336441 (Pearson) p=0.403294 (Llr) p=0.337613 (Exact)	Riskallele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	commonodds ratio
			Odds_ratio=0.414 C.I.=[0.225-0.764] chi2=8.42 p=0.00371 (P)	Odds_ratio=0.365 C.I.=[0.184-0.724] chi2=8.83 p=0.00296	Odds_ratio=0.452 C.I.=[0.052-3.922] chi2=0.55 p=0.45984	Odds_ratio=0.371 C.I.=[0.192-0.718] chi2=9.17 p=0.00246	Odds_ratio=0.451 chi2=8.32 p=0.00392
			Riskallele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	commonodds ratio
			Odds_ratio=2.413 C.I.=[1.310-4.445] chi2=8.42 p=0.00371 (P)	Odds_ratio=0.809 C.I.=[0.086-7.594] chi2=0.03 p=0.85245	Odds_ratio=2.214 C.I.=[0.255-19.226] chi2=0.55 p=0.45984	Odds_ratio=1.859 C.I.=[0.215-16.106] chi2=0.33 p=0.56767	Odds_ratio=2.129 chi2=8.32 p=0.00392
CD14	n11=61 (63.11) n12=141 (136.78) n22=72 (74.11) f_a1=0.48 +/- 0.021 F=- 0.03086	n11=22 (21.41) n12=49 (50.18) n22=30 (29.41) f_a1=0.46 +/- 0.035 F=0.023 58	Riskallele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	commonodds ratio
			Odds_ratio=1.082 C.I.=[0.783-1.495] chi2=0.23 p=0.63467 (P)	Odds_ratio=0.964 C.I.=[0.536-1.731] chi2=0.02 p=0.90120	Odds_ratio=1.155 C.I.=[0.605-2.207] chi2=0.19 p=0.66191	Odds_ratio=1.028 C.I.=[0.592-1.785] chi2=0.01 p=0.92078	Odds_ratio=1.079 chi2=0.23 p=0.63194
			Riskallele 1				

	p=0.6094 92 (Pearson) p=0.6094 51 (Llr) p=0.7163 88 (Exact)	p=0.8126 99 (Pearson) p=0.8127 08 (Llr) p=0.8419 98 (Exact)	[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	commonodds ratio
			Odds_ratio=0.925 C.I.=[0.669-1.278] chi2=0.23 p=0.63467 (P)	Odds_ratio=0.834 C.I.=[0.488-1.425] chi2=0.44 p=0.50651	Odds_ratio=0.866 C.I.=[0.453-1.654] chi2=0.19 p=0.66191	Odds_ratio=0.844 C.I.=[0.509-1.397] chi2=0.44 p=0.50841	Odds_ratio=0.927 chi2=0.23 p=0.63194
ILRN	n11=122 (122.89) n12=123 (121.22) n22=29 (29.89) f_a1=0.6 7 +/- 0.020 F=- 0.01471 50 p=0.8076 (Pearson) p=0.8074 02 (Llr) p=0.8915 98 (Exact)	n11=45 (43.78) n12=43 (45.43) n22=13 (11.78) f_a1=0.6 6 +/- 0.034 F=0.053 83 (Pearson) p=0.5907 85 (Llr) p=0.6578 89 (Exact)	Riskallele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	commonodds ratio
			Odds_ratio=1.052 C.I.=[0.748-1.479] chi2=0.08 p=0.77104 (P)	Odds_ratio=0.948 C.I.=[0.582-1.543] chi2=0.05 p=0.82921	Odds_ratio=1.215 C.I.=[0.581-2.542] chi2=0.27 p=0.60424	Odds_ratio=0.999 C.I.=[0.631-1.581] chi2=0.00 p=0.99601	Odds_ratio=1.073 chi2=0.08 p=0.77148
			Riskallele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	commonodds ratio
			Odds_ratio=0.951 C.I.=[0.676-1.337] chi2=0.08 p=0.77104 (P)	Odds_ratio=0.780 C.I.=[0.372-1.636] chi2=0.43 p=0.50990	Odds_ratio=0.823 C.I.=[0.393-1.721] chi2=0.27 p=0.60424	Odds_ratio=0.801 C.I.=[0.399-1.610] chi2=0.39 p=0.53324	Odds_ratio=0.934 chi2=0.08 p=0.77148
IRAQ1	n11=118 (84.32) n12=68 (135.36) n22=88 (54.32) f_a1=0.5 5 +/- 0.026 F=0.497 63 p=1.763e-16 (Pearson) p=4.396e-17 (Llr) p=5.697e-17 (Exact)	n11=47 (34.47) n12=24 (49.07) n22=30 (17.47) f_a1=0.5 8 +/- 0.043 F=0.510 90 p=2.830e-07 (Pearson) p=1.753e-07 (Llr) p=2.140e-07 (Exact)	Riskallele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	commonodds ratio
			Odds_ratio=0.887 C.I.=[0.640-1.229] chi2=0.52 p=0.47130 (P)	Odds_ratio=0.886 C.I.=[0.499-1.575] chi2=0.17 p=0.68024	Odds_ratio=0.856 C.I.=[0.501-1.461] chi2=0.33 p=0.56832	Odds_ratio=0.869 C.I.=[0.550-1.374] chi2=0.36 p=0.54828	Odds_ratio=0.924 chi2=0.35 p=0.55661
			Riskallele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	commonodds ratio
			Odds_ratio=1.128 C.I.=[0.813-1.563] chi2=0.52 p=0.47130 (P)	Odds_ratio=1.035 C.I.=[0.555-1.931] chi2=0.01 p=0.91312	Odds_ratio=1.168 C.I.=[0.684-1.994] chi2=0.33 p=0.56832	Odds_ratio=1.120 C.I.=[0.682-1.840] chi2=0.20 p=0.65522	Odds_ratio=1.082 chi2=0.35 p=0.55661
TLR4238	n11=261 (260.18) n12=12 (13.64) n22=1 (0.18) f_a1=0.9 7 +/- 0.007 F=0.020 39 p=0.0562 91 (Pearson) p=0.1563	n11=94 (94.12) n12=7 (6.76) n22=0 (0.12) f_a1=0.9 7 +/- 0.013 F=- 0.03590 75 (Pearson) p=0.6161	Riskallele 2				
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]	commonodds ratio
			Odds_ratio=1.369 C.I.=[0.545-3.443] chi2=0.45 p=0.50249 (P)	Odds_ratio=1.620 C.I.=[0.619-4.236] chi2=0.98 p=0.32157	Odds_ratio=0.922 C.I.=[0.037-22.839] chi2=0.36 p=0.54862	Odds_ratio=1.495 C.I.=[0.579-3.861] chi2=0.70 p=0.40326	Odds_ratio=1.451 chi2=0.42 p=0.51664
			Riskallele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	commonodds ratio
			Odds_ratio=0.730	Odds_ratio=1.800	Odds_ratio=1.084	Odds_ratio=1.113	Odds_ratio=0.905

	65 (Llr) p=0.1565 63 (Exact)	36 (Llr) p=1.0000 00 (Exact)	C.I.=[0.290- 1.836] chi2=0.45 p=0.50249 (P)	C.I.=[0.065- 50.097] chi2=0.57 p=0.45153	C.I.=[0.044- 26.843] chi2=0.36 p=0.54862	C.I.=[0.045- 27.552] chi2=0.37 p=0.54322	chi2=0.42 p=0.51664		
IL1B	n11=92 (91.11) n12=132 (133.78) n22=50 (49.11) f_a1=0.5 8 +/- 0.021 F=0.013 31 p=0.8255 84 (Pearson) p=0.8256 18 (Llr) p=0.8057 46 (Exact)	n11=32 (36.24) n12=57 (48.52) n22=12 (16.24) f_a1=0.6 0 +/- 0.031 F=- 0.17478 p=0.0790 03 (Pearson) p=0.0765 04 (Llr) p=0.1001 32 (Exact)	Riskallele 2					commonodds ratio	
			[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]			
			Odds_ratio=0.912 C.I.=[0.657- 1.266] chi2=0.30 p=0.58159 (P)	Odds_ratio=1.241 C.I.=[0.747- 2.064] chi2=0.70 p=0.40380	Odds_ratio=0.690 C.I.=[0.327- 1.457] chi2=0.95 p=0.32905	Odds_ratio=1.090 C.I.=[0.669- 1.776] chi2=0.12 p=0.72953	Odds_ratio=0.876 chi2=0.32 p=0.57456		
			Riskallele 1					commonodds ratio	
[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]						
	n11=588 (592.51) n12=409 (399.99) n22=63 (67.51) f_a1=0.7 5 +/- 0.009 F=- 0.02253 p=0.4632 36 (Pearson) p=0.4609 58 (Llr) p=0.5149 27 (Exact)	n11=60 (59.47) n12=35 (36.06) n22=6 (5.47) f_a1=0.7 7 +/- 0.030 F=0.029 51 p=0.7667 73 (Pearson) p=0.7684 58 (Llr) p=0.7812 33 (Exact)	Riskallele 2					commonodds ratio	
[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]						
IL101082	n11=588 (592.51) n12=409 (399.99) n22=63 (67.51) f_a1=0.7 5 +/- 0.009 F=- 0.02253 p=0.4632 36 (Pearson) p=0.4609 58 (Llr) p=0.5149 27 (Exact)	n11=60 (59.47) n12=35 (36.06) n22=6 (5.47) f_a1=0.7 7 +/- 0.030 F=0.029 51 p=0.7667 73 (Pearson) p=0.7684 58 (Llr) p=0.7812 33 (Exact)	Odds_ratio=0.898 C.I.=[0.639- 1.263] chi2=0.38 p=0.53733 (P)	Odds_ratio=0.839 C.I.=[0.543- 1.296] chi2=0.63 p=0.42794	Odds_ratio=0.933 C.I.=[0.388- 2.247] chi2=0.02 p=0.87765	Odds_ratio=0.851 C.I.=[0.562- 1.289] chi2=0.58 p=0.44680	Odds_ratio=0.919 chi2=0.39 p=0.53362		
			Riskallele 1					commonodds ratio	
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]			
				n11=359 (358.23) n12=526 (527.55) n22=195 (194.23) f_a1=0.5 8 +/- 0.011 F=0.002 93 p=0.9231 70 (Pearson) p=0.9231 74 (Llr) p=0.9503 24 (Exact)	n11=28 (30.50) n12=55 (50.00) n22=18 (20.50) f_a1=0.5 5 +/- 0.033 F=- 0.09989 p=0.3154 30 (Pearson) p=0.3146 71 (Llr) p=0.4210 57 (Exact)	Riskallele 2			
[1]<->[2]	[11]<->[12]	[11+]<->[22]	[11]<->[12+22]						
IL10819	n11=359 (358.23) n12=526 (527.55) n22=195 (194.23) f_a1=0.5 8 +/- 0.011 F=0.002 93 p=0.9231 70 (Pearson) p=0.9231 74 (Llr) p=0.9503 24 (Exact)	n11=28 (30.50) n12=55 (50.00) n22=18 (20.50) f_a1=0.5 5 +/- 0.033 F=- 0.09989 p=0.3154 30 (Pearson) p=0.3146 71 (Llr) p=0.4210 57 (Exact)	Odds_ratio=1.113 C.I.=[0.833- 1.488] chi2=0.53 p=0.46777 (P)	Odds_ratio=1.341 C.I.=[0.834- 2.154] chi2=1.48 p=0.22452	Odds_ratio=1.184 C.I.=[0.638- 2.194] chi2=0.29 p=0.59230	Odds_ratio=1.298 C.I.=[0.825- 2.043] chi2=1.28 p=0.25855	Odds_ratio=1.104 chi2=0.53 p=0.46648		
			Riskallele 1					commonodds ratio	
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]			
				n11=359 (358.23) n12=526 (527.55) n22=195 (194.23) f_a1=0.5 8 +/- 0.011 F=0.002 93 p=0.9231 70 (Pearson) p=0.9231 74 (Llr) p=0.9503 24 (Exact)	n11=28 (30.50) n12=55 (50.00) n22=18 (20.50) f_a1=0.5 5 +/- 0.033 F=- 0.09989 p=0.3154 30 (Pearson) p=0.3146 71 (Llr) p=0.4210 57 (Exact)	Odds_ratio=0.898 C.I.=[0.672- 1.200] chi2=0.53 p=0.46777 (P)	Odds_ratio=1.133 C.I.=[0.649- 1.977] chi2=0.19 p=0.66075	Odds_ratio=0.845 C.I.=[0.456- 1.566] chi2=0.29 p=0.59230	Odds_ratio=1.016 C.I.=[0.596- 1.731] chi2=0.00 p=0.95340

13. REFERENCIAS

1. Ramírez A. Cáncer infantil en México. Secretaria de Salud; 2011; Available from: <http://censia.salud.gob.mx/contenidos/cancer/infantilmexico.html>.
2. DGE. Perfil epidemiológico de cáncer en niños y adolescentes en México. Secretaria de Salud; 2011. p. 157.
3. Ramírez A. Cáncer Infantil a nivel mundial. Secretaria de Salud; 2012; Available from: <http://censia.salud.gob.mx/contenidos/cancer/nivelmundial.html>.
4. Information NCB. A Snapshot of Pediatric Cancers: Incidence and Mortality. National Cancer Institute; 2013; Available from: <http://www.cancer.gov>.
5. Navajasa A, Perisb R. Tumores de la infancia: consideraciones epidemiológicas y terapéuticas. JANO. 2007(1668):29-37.
6. Ross JA. Genetics and childhood cancer. Commentary on: inherited cancer in children: practical/ethical problems and challenges. Eur J Cancer. 2004;40(16):2471-2. Epub 2004/11/03.
7. Pacheco M, Madero L. Oncología pediátrica. Psicooncología. 2003(1):107-16.
8. Pakakasama S, Tomlinson GE. Genetic predisposition and screening in pediatric cancer. Pediatric clinics of North America. 2002;49(6):1393-413. Epub 2003/02/13.
9. Tischkowitz M, Rosser E. Inherited cancer in children: practical/ethical problems and challenges. Eur J Cancer. 2004;40(16):2459-70. Epub 2004/11/03.
10. Abbas A. K. LAH. Inmunología Celular y Molecular. 7 ed. España: Elsevier; 2004.
11. Hold GL, Omar EM. Genetic aspects of inflammation and cancer. The Biochemical journal. 2008;410(2):225-35. Epub 2008/02/08.
12. Grivennikov SI, Karin M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. Current opinion in genetics & development. 2010;20(1):65-71. Epub 2009/12/29.
13. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell. 2010;140(6):883-99. Epub 2010/03/23.
14. Caratachea CMA. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. Revista INER. 2007;20(3):213-21.
15. Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso JM. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rsNP) y de los SNP-ARN estructurales (srNP) en enfermedades complejas. Órgano Oficial de la Academia Nacional de Medicina de México, AC. 2013;149:220-8.
16. Pierce BA. Genética: Un enfoque conceptual: Editorial Medica Panamericana Sa de; 2009.
17. Information NCB. Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>.
18. Plataniias LC. Cytokines and Cancer: Springer US; 2006.
19. Aschebrook-Kilfoy B, Zheng T, Foss F, Ma S, Han X, Lan Q, et al. Polymorphisms in immune function genes and non-Hodgkin lymphoma survival. Journal of cancer survivorship : research and practice. 2012;6(1):102-14. Epub 2011/11/25.
20. Gatti LL, Burbano RR, Zambaldi-Tunes M, de-Labio RW, de Assumpcao PP, de Arruda Cardoso-Smith M, et al. Interleukin-6 polymorphisms, Helicobacter pylori infection in adult Brazilian patients with chronic gastritis and gastric adenocarcinoma. Archives of medical research. 2007;38(5):551-5. Epub 2007/06/15.
21. Hefler LA, Grimm C, Lantzsch T, Lampe D, Leodolter S, Koelbl H, et al. Interleukin-1 and interleukin-6 gene polymorphisms and the risk of breast cancer in caucasian women. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2005;11(16):5718-21. Epub 2005/08/24.

22. Lagmay JP, London WB, Gross TG, Termuhlen A, Sullivan N, Axel A, et al. Prognostic significance of interleukin-6 single nucleotide polymorphism genotypes in neuroblastoma: rs1800795 (promoter) and rs8192284 (receptor). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(16):5234-9. Epub 2009/08/13.
23. Gao LB, Pan XM, Jia J, Liang WB, Rao L, Xue H, et al. IL-8 -251A/T polymorphism is associated with decreased cancer risk among population-based studies: evidence from a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2010;46(8):1333-43. Epub 2010/04/20.
24. Wang Z, Wang C, Zhao Z, Liu F, Guan X, Lin X, et al. Association between -251A>T polymorphism in the interleukin-8 gene and oral cancer risk: a meta-analysis. *Gene*. 2013;522(2):168-76. Epub 2013/04/03.
25. Cerhan JR, Wang S, Maurer MJ, Ansell SM, Geyer SM, Cozen W, et al. Prognostic significance of host immune gene polymorphisms in follicular lymphoma survival. *Blood*. 2007;109(12):5439-46. Epub 2007/03/01.
26. Liu J, Song B, Wang JL, Li ZJ, Li WH, Wang ZH. Polymorphisms of interleukin-10 promoter are not associated with prognosis of advanced gastric cancer. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2011;17(10):1362-7. Epub 2011/04/02.
27. Zheng L, Yin J, Wang L, Wang X, Shi Y, Shao A, et al. Interleukin 1B rs16944 G>A polymorphism was associated with a decreased risk of esophageal cancer in a Chinese population. *Clinical biochemistry*. 2013;46(15):1469-73. Epub 2013/06/04.
28. Dluzniewski PJ, Wang MH, Zheng SL, De Marzo AM, Drake CG, Fedor HL, et al. Variation in IL10 and other genes involved in the immune response and in oxidation and prostate cancer recurrence. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2012;21(10):1774-82. Epub 2012/08/04.
29. Srivastava R, Geng D, Liu Y, Zheng L, Li Z, Joseph MA, et al. Augmentation of therapeutic responses in melanoma by inhibition of IRAK-1,-4. *Cancer research*. 2012;72(23):6209-16. Epub 2012/10/09.
30. Stark JR, Wiklund F, Gronberg H, Schumacher F, Sinnott JA, Stampfer MJ, et al. Toll-like receptor signaling pathway variants and prostate cancer mortality. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(6):1859-63. Epub 2009/06/10.
31. Burada F, Dumitrescu T, Nicoli R, Ciurea ME, Angelescu C, Mixich F, et al. IL-1RN +2018T>C polymorphism is correlated with colorectal cancer. *Molecular biology reports*. 2013;40(4):2851-7. Epub 2012/11/30.
32. Seiffert M, Schulz A, Ohl S, Döhner H, Stilgenbauer S, Lichter P. Soluble CD14 is a novel monocyte-derived survival factor for chronic lymphocytic leukemia cells, which is induced by CLL cells in vitro and present at abnormally high levels in vivo. *Blood*. 2010;116(20):4223-30.
33. Mason TE, Ricks-Santi L, Chen W, Apprey V, Joykutty J, Ahaghotu C, et al. Association of CD14 variant with prostate cancer in African American men. *The Prostate*. 2010;70(3):262-9. Epub 2009/10/16.
34. Choi Y, Lee JH, Kim SD, Kim DY, Seol M, Kang YA, et al. Prognostic implications of CD14 positivity in acute myeloid leukemia arising from myelodysplastic syndrome. *International journal of hematology*. 2013;97(2):246-55. Epub 2013/02/02.
35. Kutikhin AG. Impact of Toll-like receptor 4 polymorphisms on risk of cancer. *Human immunology*. 2011;72(2):193-206. Epub 2010/11/18.
36. Zhang K, Zhou B, Wang Y, Rao L, Zhang L. The TLR4 gene polymorphisms and susceptibility to cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2013;49(4):946-54. Epub 2012/10/23.
37. de Oliveira JG, Rossi AF, Nizato DM, Miyasaki K, Silva AE. Profiles of gene polymorphisms in cytokines and Toll-like receptors with higher risk for gastric cancer. *Digestive diseases and sciences*. 2013;58(4):978-88. Epub 2012/10/23.

38. Rafrafi A, Chahed B, Kaabachi S, Kaabachi W, Maalmi H, Hamzaoui K, et al. Association of IL-8 gene polymorphisms with non small cell lung cancer in Tunisia: A case control study. *Human immunology*. 2013;74(10):1368-74. Epub 2013/07/09.
39. Lan Q, Zheng T, Rothman N, Zhang Y, Wang SS, Shen M, et al. Cytokine polymorphisms in the Th1/Th2 pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;107(10):4101-8. Epub 2006/02/02.
40. Campa D, Hashibe M, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Mates IN, Janout V, et al. Association of common polymorphisms in inflammatory genes with risk of developing cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer causes & control : CCC*. 2007;18(4):449-55. Epub 2007/03/16.
41. Yao JG, Gao LB, Liu YG, Li J, Pang GF. Genetic variation in interleukin-10 gene and risk of oral cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2008;388(1-2):84-8. Epub 2007/11/06.
42. Schoof N, von Bonin F, König IR, Mossner R, Krüger U, Reich K, et al. Distal and proximal interleukin (IL)-10 promoter polymorphisms associated with risk of cutaneous melanoma development: a case-control study. *Genes and immunity*. 2009;10(6):586-90. Epub 2009/05/22.
43. Chiurillo MA. Role of gene polymorphisms in gastric cancer and its precursor lesions: current knowledge and perspectives in Latin American countries. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2014;20(16):4503-15. Epub 2014/05/02.
44. Li K, Dan Z, Hu X, Ouzhu M, Ciren Y, Wang Z, et al. CD14 overexpression upregulates TNF-alpha-mediated inflammatory responses and suppresses the malignancy of gastric carcinoma cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013;376(1-2):137-43. Epub 2013/01/23.
45. Silva Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, Fernandez-Lopez JC, Uribe-Figueroa L, Contreras A, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(21):8611-6. Epub 2009/05/13.
46. Lodish H. *Biología celular y molecular: Médica Panamericana*; 2005.
47. Dorak MT. *Real-time PCR: Taylor & Francis*; 2007.
48. Oliva R. *Genética médica: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona*; 2004.
49. Sicinschi LA, Lopez-Carrillo L, Camargo MC, Correa P, Sierra RA, Henry RR, et al. Gastric cancer risk in a Mexican population: role of *Helicobacter pylori* CagA positive infection and polymorphisms in interleukin-1 and -10 genes. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2006;118(3):649-57. Epub 2005/08/23.
50. Habermann TM, Wang SS, Maurer MJ, Morton LM, Lynch CF, Ansell SM, et al. Host immune gene polymorphisms in combination with clinical and demographic factors predict late survival in diffuse large B-cell lymphoma patients in the pre-rituximab era. *Blood*. 2008;112(7):2694-702. Epub 2008/07/18.
51. Sevilla SD. *Metodología de los estudios de asociación genética. Insuficiencia cardíaca*. 2007;2(3):111-4.
52. Salas A, Carracedo A. *Estudios de asociación en enfermedades complejas: problemas estadísticos relacionados con el análisis de polimorfismos genéticos. Revista clinica española*. 2007;207(11):563-5.