



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO, FEDERICO GÓMEZ

Asociación de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A sIL-6R en
pacientes pediátricos con diagnóstico de neuroblastoma en el
Hospital Infantil de México Federico Gómez

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN MEDICINA

ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

DRA. ANDREA GARCÍA OROPEZA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. GABRIELA HERNÁNDEZ PLIEGO

ASESORES EN BIOLOGÍA MOLECULAR:

M. EN C. ARTURO RAMÍREZ PACHECO.
M. EN C. SILVIA SELENE MORENO GUERRERO

MÉXICO, D.F.



FEBRERO, 2017

CIUDAD DE MÉXICO



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

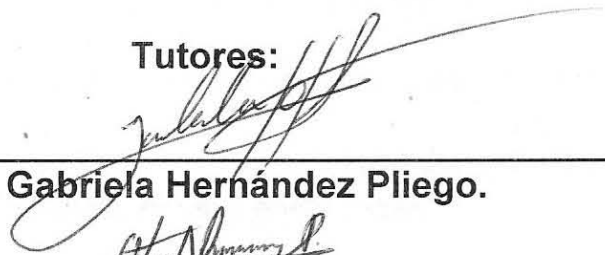
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

HOJA DE FIRMAS

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

Tutores:



Dra. Gabriela Hernández Pliego.



M. en C. Arturo Ramírez Pacheco.



M. en C. Silvia Selene Moreno Guerrero.

Medico adscrito al departamento:

Dra. Gabriela Hernández Pliego.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por ser mi inspiración para superarme, por siempre motivarme, gracias por su tiempo, comprensión, paciencia, su amor infinito, por esforzarse para darme las herramientas, construirme una vida mejor y hacer posible mis sueños.

A Mariana mi hermana por ser mi compañera, consejera, amiga, una inspiración, por cuidarme y preocuparse por mi bienestar.

A Miguel por confiar siempre en mí, por su amor y apoyo incondicional.

A la Dra. Gabriela Hernandez Pliego por su confianza depositada en mí, por su paciencia, por sus enseñanzas.

A mis maestros de Oncología Pediátrica por sus enseñanzas, por exigirme a ser mejor médico cada día, por transmitirme sus conocimientos, sus experiencias, sus consejos, gracias por transmitirme el amor a esta carrera y por depositar en mi su confianza.

A mis compañeros Residentes por su apoyo, por su amistad, por ser una familia durante este tiempo de formación académica.

Un agradecimiento especial a Selene y Arturo, mis Maestros en Ciencias por abrirme un panorama a la investigación, por su dedicación y compromiso con su trabajo. Sin ellos no habría sido posible realizar este trabajo.

A todo el equipo de Enfermería, Laboratorio de Oncología, Inmunofenotipo, Biología Molecular, gracias por su amistad, por sus enseñanzas y por transmitir el compromiso que tienen con su trabajo.

Al Hospital Infantil de México por abrirme sus puertas, por convertirse en mi casa en estos años de vida profesional, por permitirme formar parte de su historia y sentirme orgullosa de portar su escudo.

A todos los niños y mamás del servicio de Oncología por ser mis maestros y mi inspiración día con día, por sus sonrisas, tiempo, amistad y confianza en mí.

INDICE

RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
MARCO TEÓRICO.....	7
Características de Neuroblastoma.....	7
Epidemiología.....	7
Patogénesis.....	8
Manifestaciones clínicas.....	8
Diagnóstico.....	8
Estadificación.....	9
Factores pronósticos.....	9
Tratamiento.....	10
ANTECEDENTES.....	10
Inflamación y cáncer.....	10
Polimorfismo -174 (G>C) del gen IL-6.....	12
Polimorfismo D385A del gen sIL-6R.....	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	15
OBJETIVOS.....	16
Objetivo General y Especificos.....	16
HIPÓTESIS.....	16
Hipótesis verdadera y nula.....	16
MÉTODOS.....	17
Tipo de estudio y Diseño.....	17
Criterios de Inclusion, Exclusion y Eliminación.....	17
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	20
PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
DESCRIPCIÓN DE VARIABLES.....	21
RESULTADOS.....	23
Descripción de la población.....	28
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIÓN.....	32
LIMITACIÓN DEL ESTUDIO.....	32
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXOS.....	38
Índice de Figuras.....	I
Figura 1: Electroforesis de PCR para IL-6 y IL-6R.....	24
Figura 2: Digestión del producto de PCR del gen IL-6.....	25
Figura 3: Gel de electroforesis de la restricción del producto del gen IL-6R.....	25
Índice de Tablas.....	II
Tabla 1: Secuencias de los iniciadores.....	19
Tabla 2: Técnica PCR-RFLP para el SNP-174(G>C) del gen IL-6.....	23
Tabla 3: Técnica PCR-RFLP para el SNP de D358A del gen IL-6R.....	23
Tabla 4: Frecuencias por genotipo del SNP -174 (G>C) del gen IL-6.....	26
Tabla 5: Frecuencias por alelo del SNP de D358A del gen IL-6R.....	26
Tabla 6: Frecuencias por genotipo del SNP D358A del gen IL-6R.....	27
Tabla 7: Frecuencias por alelo del SNP D358A del gen IL-6R.....	27
Tabla 8: Descripción de la población del estudio.....	28
Índice de Anexos.....	III
Anexo 1. Carta de consentimiento informado.....	38
Anexo 2. Carta de asentimiento informado.....	39
Anexo 3. La estadificación de acuerdo con los criterios del INSS (1993).....	42
Anexo 4. Clasificación de la INPC de acuerdo con el método de Shimada.....	42

RESUMEN:

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

Antecedentes: El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia se caracteriza por una evolución clínica heterogénea que va desde una progresión rápida a una regresión tumoral espontánea. Sin embargo, existen grupos de tumores neuroblásticos altamente malignos, agresivos y con mala respuesta a los esquemas terapéuticos. Estudios previos de la génesis del NB involucran diversas alteraciones: genéticas como polimorfismos en citocinas entre ellas la IL-6 y el sIL-6R las cuales podrían estar asociadas a procesos inflamatorios de riesgo y pronóstico del NB. También los polimorfismos de estas citocinas incluido el receptor de IL-6, se han sugerido como factores de riesgo en el control del NB. IL-6 puede activar a las proteínas del complejo JAK (Janus cinasas) produciendo la fosforilación y activación de factores de transcripción STAT, que regulan la proliferación celular y apoptosis. Se ha sugerido a la IL-6 con una doble función al inhibir la angiogénesis del NB y limitar el tamaño del tumor. Sin embargo, otros estudios sugieren a esta citocina como factor estimulante actuando sobre el microambiente celular promoviendo la metástasis y la progresión del NB. La significancia de evaluar la asociación de dichos factores permitirá caracterizar y comprender las bases biológicas del NB, e identificar posibles biomarcadores de pronóstico; así como el éxito o fracaso del tratamiento. Se propone un estudio de cohorte prospectiva en pacientes pediátricos con diagnóstico de NB, en la que se evaluará el papel pronóstico de los polimorfismos del gen IL-6 y IL-6R.

Justificación: El neuroblastoma tumor sólido extracraneal mas frecuente en la infancia. En el insituto contamos con una población importante de pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma, en los cuales podemos identificar cuales son los biomarcadores que influyen en el pronóstico, asi como en la respuesta al tratamiento.

Objetivo: Identificar y determinar el papel pronóstico de los polimorfismos -174 (G>C) de IL-6 y D358A del gen IL-6R en pacientes pediátricos con Neuroblastoma.

Hipotesis: Existen biomarcadores inmunologicos y moleculares que se asocian con el pronóstico en pacientes pediátricos con Neuroblastoma

Material y Metodos: Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 8 pacientes con diagnóstico de Neuroblastoma, se realizo la extracción de ADN por método de columna y se analizaron los SNP's -174 (G>C) de IL-6 y D358A del gen IL-6R por medio de PCR-RFLP. **Plan de analisis:** Se realizo un análisis descriptivo mediante la determinación de frecuencias.

Resultados: Genotipo de IL-6 SNP -174 (G>C), se determinó en 8 pacientes con NB y 18 pacientes sanos. El genotipo GG se encontró en 50% con NB y 22.2% sanos. Genotipo GC se encontró en 50% con NB y 33.3% sanos. El genotipo CC no se encontró en NB y 44.5% sanos. Frecuencias alélicas en NB 75% G y 25% C. Sanos 38.9% G, 61.1% C. Genotipo IL-6R SNP D358A, en 8 pacientes con NB y 18 sanos. Genotipo AA no en pacientes NB, si en 50% sanos. El genotipo AC con NB 62.5% y sanos 44.4%. El genotipo CC en 37.5% NB y 5.6% sano. Frecuencias alélicas en NB 31.25% para alelo A y 68.75% para C. En sanos frecuencia del 72.2% para A y 27.8% para C.

Conclusiones: El alelo G del SNP -174 IL-6 (G>C) se presento con mayor frecuencia en pacientes con Neuroblastoma que en individuos sanos. El alelo C del SNP D358A IL-6R se presento con mayor frecuencia en pacientes con Neuroblastoma que en individuos sanos. Probablemente el alelo G del SNP 174 IL-6 (G>C) y el alelo C del SNP D358A IL-6R pueden tener un rol importante en el desarrollo y progresión del NB, como posibles biomarcadores de mal pronostico. Es necesario incluir una mayor cantidad de pacientes para determinar el impacto pronostico de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6R.

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

INTRODUCCION:

El cáncer pediátrico es relativamente infrecuente, en los EUA se estima una tasa media de incidencia anual de 18.8 casos por 100,000 individuos por año, para todos los cánceres infantiles en menores de 20 años. La probabilidad de que un joven alcance la edad adulta después de haber sido diagnosticado con cáncer en su infancia es de aproximadamente 1 en 300 para hombres y 1 a 333 en mujeres.

En la mayor parte del mundo, el cáncer representa la segunda causa de mortalidad en los niños de 5 a 14 años de edad, sólo superada por los accidentes. En el año 2006 se registraron en los Estados Unidos alrededor de 1,300 muertes relacionadas con cáncer en niños menores de 15 años. Se estima que en individuos de 15 a 19 años la contribución relativa del cáncer a la mortalidad global es inferior a la de los niños más pequeños y en 2006 se produjeron alrededor de 700 muertes por cáncer en este grupo de edad.⁽¹⁾

En México, el cáncer en niños pasó del decimotercer lugar como causa de muerte en 1971, al segundo lugar entre la población de 1 a 14 años a partir del año 2001.

La neoplasia maligna más común en niños de 0 a 14 años, es la leucemia linfoblástica aguda (LLA), que representa el 25.4% de todos los diagnósticos de cáncer. La leucemia mieloide aguda (LMA) es el segundo tipo de leucemia más frecuente. Los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) representan el 20.6% de los diagnósticos de cáncer. Dentro de los tumores sólidos extracraneales, los más frecuentes en el grupo de 0 a 14 años son el Neuroblastoma (7.0%), seguido por el tumor de Wilms (5.4%) y el linfoma no Hodgkin (LNH) (5.9%). Otros diagnósticos que individualmente representan un 2% a 4% de las neoplasias malignas de la edad pediátrica son la enfermedad de Hodgkin, el Rbdomiosarcoma, los sarcomas de partes blandas no Rbdomiosarcoma, los tumores de células germinales, el Retinoblastoma y el Osteosarcoma . El Hospital Infantil de México recibe un promedio de 250 casos nuevos de cáncer por año, de los cuales, las leucemias agudas linfoblástica⁽²⁾ representan el 34%, seguidas de los Tumores del SNC y linfomas.

MARCO TEÓRICO.

Características generales del Neuroblastoma:

El neuroblastoma (NB) es el tumor maligno extracraneal más frecuente en la edad pediátrica, derivado de las células primordiales de la cresta neural. Este origen así como los patrones de migración de los neuroblastos durante el desarrollo fetal, explican los múltiples sitios anatómicos donde puede presentarse el tumor primario, variando su localización y presentación clínica. El NB puede presentar características biológicas y clínicas diversas, que van desde la regresión espontánea; a la enfermedad metastásica diseminada.⁽⁴⁾

En general los Tumores Neuroblásticos comprenden una gran variedad de patrones histológicos que se caracterizan por tener distintos grados de maduración y diferenciación neuronal con potencial de crecimiento muy variable.⁽⁵⁾

La supervivencia de los pacientes que desarrollan NB, después del primer año de vida o presentan tumores metastásicos; no ha mejorado en comparación a otras neoplasias malignas (por ejemplo, leucemias) y aun continua siendo un gran reto en la oncología pediátrica⁽⁶⁾. Se han logrado identificar factores pronósticos basados en hallazgos clínicos. Sin embargo, en la actualidad son necesarios estudios genéticos, moleculares y biológicos del NB para mejorar la comprensión clínica, terapéutica y pronóstico de este tumor.⁽⁷⁾

Epidemiología:

El Neuroblastoma es un tumor de la edad pediátrica, en el que el 97% de los pacientes es diagnosticado antes de los 10 años de edad. El diagnóstico de NB en edad promedio es de 22 meses y se presenta en la misma proporción en niños que en niñas. El NB puede originarse en cualquier sitio a lo largo del sistema nervioso simpático, la localización es variada y cambia con la edad.⁽⁶⁾

Representa 8-10% de todas las neoplasias infantiles su prevalencia es de 1 caso por cada 7000 nacidos vivos. En Estados Unidos se presentan 800 casos de NB por año y su incidencia es de 10.4 casos por millón/año en la raza blanca y de 8.3 casos por millón/año en la raza negra en menores de 15 años.^(8, 9, 10, 11)

En México se ha informado una frecuencia e incidencia de 2.7 y 3.6 % por un millón de niños/año, respectivamente. La incidencia del Neuroblastoma en los niños mexicanos es baja posiblemente debido a la dificultad para su diagnóstico. El 80% de los casos se diagnostica en estadios avanzados de la enfermedad (III y IV).⁽¹²⁾

Patogénesis molecular del NB:

Las alteraciones citogenéticas y la genética molecular en NB son las siguientes:

1.-Ploidia: La mayoría de los NB tienen cariotipos diploides, lo cuales son más frecuentes en niños mayores y con características de mal pronóstico. Algunos tumores localizados tienen cariotipos triploides o hiperdiploides que se asocian a factores de buen pronóstico. ^(13, 14, 15)

2.-Gen N-myc: Es un factor transcripcional de genes que participan en regular los mecanismos de proliferación y diferenciación neuronal, se encuentra hasta en un 22% de los NB. La amplificación de este gen se asocia a estadios avanzados de la enfermedad y mal pronóstico ⁽¹⁶⁾

3.- Ganancia del brazo largo del cromosoma 17: Se presenta hasta en 50% de los casos con NB ⁽¹⁷⁾

4.-Delección o pérdida alélica de brazo corto del cromosoma 1: Esta alteración citogenética se encuentra en 70-80% de los NB con cariotipos diploides, y en general se asocia a estadios avanzados y amplificación de N-myc, confiriendo un mal pronóstico. ⁽¹⁸⁾

5.- Otras alteraciones citogenéticas: Pérdida del brazo largo del cromosoma 11 y del cromosoma 2. ⁽¹⁹⁾

6.-Alteraciones en la expresión génica de receptores de neurotrofina: TrKA, TrKB y TrKC ^(20, 21, 22). Todas estas alteraciones genéticas pueden influir el inicio y progresión del Neuroblastoma.

Manifestaciones clínicas:

La sintomatología del NB depende del tamaño, localización del tumor, presencia de enfermedad metastásica; signos y síntomas característicos de síndromes paraneoplásicos, un 25% de los pacientes pueden estar asintomáticos. En alrededor de 1% de los pacientes no es posible identificar el sitio primario. La enfermedad metastásica está presente al diagnóstico en 43% de los casos; está es resultado de la diseminación linfática y hematogena. La afección ganglionar se presenta alrededor del 30-35% de los pacientes y la diseminación hematogena más frecuente es a médula ósea, hueso, hígado y la piel. En enfermedad recurrente o terminal se presenta metástasis a pulmón, sistema nervioso central, bazo, páncreas, tiroides. ⁽⁵⁾

Diagnóstico:

La evaluación de los tumores neuroblásticos se establece mediante la presencia de tejido tumoral por estudios histológicos. Sin embargo, el consenso internacional acepta un diagnóstico realizado mediante el hallazgo de células tumorales en el aspirado de médula ósea, asociado al aumento de niveles en orina y suero de catecolaminas o metabolitos de catecolaminas (por ejemplo, dopamina, ácido homovanílico y vanililmanadélico) y análisis radiológico ⁽²³⁾.

Estadificación del NB.

La estadificación de este tumor es compleja por tal motivo la intención de uniformar tanto el diagnóstico como los resultados de los diferentes estudios realizados en pacientes con NB se ha decidido utilizar la estadificación revisada por el sistema de estadificación internacional del NB, basada en la evaluación clínica, radiográfica y quirúrgica. ^(5, 6)

El NB es clasificado en niveles de bajo, intermedio, y alto riesgo basado en factores clínicos y biológicos que se ha observado que pueden predecir pronóstico y riesgo de recurrencia.

Factores Pronósticos:

En la actualidad algunos de los factores pronósticos más importantes al NB incluyen:

Edad al Diagnóstico: Esta característica, es uno de los primeros indicadores pronóstico, presentan un mejor pronóstico los pacientes menores de 1 año a diferencia de los pacientes mayores de 2 años. Los niños mayores a 18 meses y adolescentes presentan un peor resultado global.

Estadio de enfermedad: La sobrevida libre de enfermedad a 3 años en pacientes con etapas 1,2 y 4S es de 75-70%, mientras que en las etapas 3 y 4 depende de la edad; pacientes con etapa 3 menores de 1 año de edad, tienen entre 80-90% de posibilidades de curación y con etapa 4 las posibilidades son de 60-75%.

Amplificación del N-myc: Más de 10 copias se presenta en 25% de NB primarios; se asocia a estadios avanzados en un 30-40% con rápida progresión y pobre pronóstico; En estadios bajos y en etapas 4S se presenta en el 5-10%.

Índice de DNA: Es muy importante en menores de 2 años de edad al diagnóstico con enfermedad diseminada, especialmente en el estadio 4S. Tumores hiperdiploides (índice de ADN>1) son asociados con mal pronóstico en comparación con aquellos tumores diploides (índice de ADN=1).

Histología: Considera el grado de diferenciación neuroblástica, el grado de proliferación celular (MKI, índice mitosis-cardiorrexis), grado de componente estromal, grado de calcificación. Formas diferenciadas de los tumores neuroblásticos, GNB y GN, son tumores benignos con un pronóstico favorable y sólo requieren tratamiento quirúrgico. El NB en pacientes menores de un año y medio tienen mejor pronóstico en comparación con los niños mayores. Los niños de menor edad presentan tumores benignos localizados. ^(23, 24)

Tratamiento:

El tratamiento del NB comprende las 3 estrategias terapéuticas principales en el manejo del paciente pediátrico con cáncer, que son la cirugía, quimioterapia y radioterapia. La función de cada una de ellas está determinada por la historia natural de cada uno de los casos considerando la etapa, la edad y las características biológicas. En la actualidad se considera que esas 3 estrategias deben ser complementadas con inmunoterapia, medicina nuclear y trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en etapas avanzadas del tumor o en caso de recaída. En el Hospital Infantil de México "Federico Gómez" (HIMFG) se emplea un esquema de quimioterapia basado en los esquemas del POG 8104 y 8441, para etapas 1-2 y 3-4, respectivamente. ⁽⁶⁾

Por otra parte estudios recientes proponen un papel importante del status inmunológico del hospedero y el desarrollo de procesos inflamatorios crónicos asociados a la malignidad.

ANTECEDENTES.

Inflamación y cáncer:

El binomio entre inflamación persistente y cáncer se ha propuesto como promoción de progresión de tumores. ^(27, 36). Es de conocimiento general que la respuesta inflamatoria típica involucra una serie de reacciones de los vasos sanguíneos que conducen a la acumulación de fluidos y células inmunitarias (leucocitos) a tejidos extravasculares. La vía inflamatoria ésta integrada por cuatro componentes esenciales: 1) Los inductores, 2) tipos de sensores, 3) síntesis de diversos mediadores inflamatorios y 4) las acciones de las moléculas efectoras sobre los órganos blancos. ^(25, 26). Entre los mediadores inflamatorios, las citocinas tienen un papel importante tanto en activación de inflamación, regulación inmunitaria y homeostasis del hospedero ⁽²⁶⁾. El control de la inflamación depende del fino balance de citocinas pro y anti-inflamatorias (IL-1, TNF- α , IL-12, IL-8, IL-6 vs IL-4, IL-10, TGF- β). En particular, la interleucina 6 (IL-6) es una citocina pro-inflamatoria, considerada también de respuesta inmune humoral. Esta citocina inicialmente descrita como factor de activación a células T, diferenciación de células B e importante regulador de la síntesis de proteínas de fase aguda. ⁽³¹⁾. También esta citocina es conocida como factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). IL-6 ésta involucrada en varios procesos biológicos como alteraciones del sistema inmunitario y cánceres. Así mismo, como la mayoría de citocinas tiene característica pleiotrópica (múltiples blancos celulares a la acción de la citocina). Además IL-6, también tiene acción paracrina de hormona afectando a enfermedades vasculares, metabolismo de lípidos, resistencia a la insulina, actividades mitocondriales e interacción con otros sistemas; principalmente sistema nervioso central. ⁽³⁴⁾. La actividad biológica de IL-6 se produce por unión de esta citocina a su molécula receptora (RIL-6) y la

expresión del RIL-6 puede localizarse como molécula de anclaje a la membrana celular o en forma solubilizada (sIL-6R).⁽⁴⁵⁾ Por tanto, IL-6 puede unirse en circulación, así también en la membrana celular. El receptor de IL-6 está formado de dos subunidades (RIL-6 y gp 130) ambas subunidades se solubilizan después de la unión a la citocina, así el sIL-6R actúa como agonista de la IL-6 mientras la gp130 soluble tiene efecto antagonista; por tanto reduce la biodisponibilidad de la citocina. El RIL-6 es principalmente expresado por hepatocitos neutrófilos, monocitos/macrófagos⁽⁴⁰⁾ en el caso del sIL-6R este es producido por dos mecanismos independientes limitados por la proteólisis de la proteína de membrana y la translación de un RNAm generado por splicing alternativo⁽³⁷⁾. La IL-6 también tiene propiedades anti-inflamatorias, esta función predominantemente se presenta cuando se une al receptor gp 130 (esta predominancia similar a otras citocinas). Las principales células inmunitarias productoras de IL-6 incluyen a macrófagos activados, monocitos, de otras células (fibroblastos y células del endotelio vascular). La prolongación de activación inflamatoria, es un importante factor de riesgo, a la conversión de malignidad, invasión, metástasis y resistencia de terapia oncológica.⁽²⁹⁾ En la inflamación, IL-6 tiende a efectos transitorios entre inmunidad innata y adquirida; esta citocina también regula inflamación crónica, la cual puede condicionar un microambiente celular en beneficio al crecimiento de células tumorales. Las concentraciones de esta citocina son elevadas en varios tipos de cáncer (de pulmón, glándula mamaria, colon y neuroblastoma).^(39, 29) En adultos sanos, las concentraciones por arriba de 10pg/ml son consideradas anormalmente elevadas y están evidenciadas en enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y cáncer. En pacientes de neuroblastoma recurrente fase 4 se observan también niveles elevados de IL-6. Además, la acción paracrina de IL-6 e IL-10 en el tumor por activación de las células inflamatorias; sugiere un papel importante de estas citocinas en la progresión de neuroblastoma⁽³³⁾. El principal mecanismo de señalización de IL-6 involucra la activación del factor de transcripción STAT (traductor de señal y activador de transcripción 3)^(35, 37) y su subsecuente regulación de transcripción del gen de regulación por la proteína de SOCS3 (señal supresora de citocinas 3), este es el más potente inhibidor negativo de la señalización de IL-6⁽⁴³⁾. Así mismo, IL-6 derivada de células del estroma de medula ósea promueven crecimiento y la viabilidad de neuroblastomas provenientes de líneas celulares a través de vías de señalización con participación de proteínas de fosforilación ERk1/2 y proteína STAT-3 y también median actividad promotora de crecimiento en modelos experimentales de neuroblastoma⁽⁴²⁾. Otras investigaciones, demuestran niveles elevados del receptor soluble de IL-6 en correlación a la presencia de metástasis en modelos de neuroblastoma⁽⁴⁴⁾. En el pronóstico y severidad del neuroblastoma se ha enfatizado a la IL-6 y a su receptor, como marcadores de severidad. Estudios previos, demuestran correlación entre concentraciones elevadas de IL-6 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes y alto riesgo de neuroblastoma.⁽³²⁾ No obstante estas evidencias, otros estudios cuestionan los resultados del complejo IL-6/sRIL-6 en la progresión del NB. El discernir la asociación del complejo IL-6 y el de otras citocinas (IL-8, TNF- α , IL-12, TGF- β , e

1L-10) en el nivel de severidad del neuroblastoma en niños combinado a otros factores de riesgo entre ellos el polimorfismo de estas citocinas pro y anti inflamatorias contribuirá al control clínico de la enfermedad con posibilidades de mejorar el pronóstico de este tipo de cáncer. En la actualidad los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) han sido implicados en diferentes patologías incluidos diversos tipos de cáncer.

Polimorfismo -174 G>C del gen IL-6

El gen de la IL-6 humana está localizado en el cromosoma 7p21, de aproximadamente 5 Kb conformado de cuatro intrones y cinco exones de longitud variable, una región promotora, tres sitios de iniciación de la transcripción y algunos polimorfismos ⁽⁴⁵⁾. Las diferencias entre individuos tanto en la respuesta a las citocinas como en la presentación clínica del NB pueden ser debidos a variantes genéticas, el SNP -174 G>C rs1800795 que se encuentra en la región promotora del gen *IL-6* puede ser un factor pronostico en pacientes con neuroblastoma de alto riesgo ⁽⁴³⁾. La transición de Guanina por Citosina de este SNP afecta la transcripción del gen y está relacionada con las concentraciones en plasma de IL-6, esto puede ser debido a que este SNP está localizado en una región cercana a importantes sitios de unión a proteínas nucleares en el promotor del gen IL-6. ⁽³²⁾ DeMichele describió una correlación directa entre el SNP -174 (G>C) y el resultado clínico en cáncer de mama. Así mismo mujeres con cáncer de mama sensible a hormonas y homocigotos (GG) para el SNP -174 (G>C) mostraron tasas significativamente más bajas de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global ⁽⁴⁷⁾. Lagmay y cols, reportaron alta tasa de supervivencia en pacientes con uno o más alelos C en comparación con aquellos pacientes homocigotos para el alelo G ⁽⁴³⁾. Por otra parte, Totaro y cols reportaron la variante -174C presenta un incremento significativo en la actividad transcripcional comparada con el alelo G, también encontraron niveles elevados de IL-6 asociados con mal resultado en niños con Neuroblastoma. Además relacionaron al SNP IL-6-174 G>C con la disminución en el tiempo de supervivencia, sugiriendo que este polimorfismo puede ser muy importante como marcador pronóstico para neuroblastoma en población italiana ⁽³⁰⁾.

Polimorfismo D358A del gen *sIL-6R*

Como fue citado anteriormente la IL-6 tiene un receptor específico que se puede encontrar ya sea en la membrana celular o en una forma soluble (sIL6R). La IL-6 se une a estos receptores formando un complejo que se asocia a la proteína transmembranal gp130. Este complejo, activa JAK2, que a su vez activa múltiples vías, STAT1 y STAT3. Esta última se ha demostrado que desempeña un papel en el retraso de la iniciación de la respuesta inflamatoria a medida que se desarrolla el cáncer ⁽³⁷⁾.

El polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) no sinónimo D358A (asp358ala) rs8192284 incluye el cambio de una Adenina por Citosina en la posición 48892

exón 9 del gen sIL-6R, el cual resulta en una sustitución de Aspartato por Alanina en la posición 358 de la proteína.⁽⁴⁸⁾ Gu y colaboradores utilizaron herramientas bioinformáticas (BLOSUM62 y PolyPhen) para predecir la función de diversos SNP's en el gen IL-6R, sugiriendo que el polimorfismo D358A (rs8192284) puede afectar la estructura de la proteína.⁽⁴⁹⁾ Confirmando lo reportado con anterioridad en un estudio *in vitro* de células humanas, donde sugieren el SNP D358A rs8192284 se encuentra en una posición importante cerca de la región transmembranal de la proteína, y esta sustitución de aminoácidos de Aspartato por Alanina podrían alterar el desprendimiento de la membrana IL-6R a la forma soluble de sIL-6R.⁽⁵⁰⁾ Además se ha reportado que este polimorfismo puede a su vez influenciar los niveles de sIL-6R en suero, el alelo C variante de este SNP se ha sido asociado con niveles elevados de sIL-6R en población japonesa y caucásica.^(48, 51) Ferreira y cols. determinaron que el alelo 358ala se asocia con un incremento de aproximadamente 35% de las concentraciones circulantes de sIL-6R y demostraron que la variante 358Ala de este SNP aumenta la transcripción de la isoforma soluble del receptor de IL-6 (sIL-6R) siendo un determinante genético importante en diversas enfermedades.⁽⁵²⁾ por otro lado el SNP D358A (asp358ala) del IL-6R no mostró ninguna asociación entre el neuroblastoma de alto riesgo y la progresión de la enfermedad o la supervivencia ⁽⁴³⁾. Por tanto, el valor pronóstico de los niveles de sIL-6R no ha sido bien establecido. Datos previos han investigado en pacientes con cáncer de próstata señalan niveles elevados del sIL-6R como factor de mal pronóstico ⁽⁵³⁾. Datos en Neuroblastoma reportan reportan disminución de los niveles de sIL-6R en sangre periférica asociado con la presencia de enfermedad metastásica ⁽⁴¹⁾.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El neuroblastoma (NB) es el tumor maligno extracraneal más frecuente en la edad pediátrica. La regresión espontánea y la maduración de dichos tumores está ampliamente documentada, pero no de todo clara como fenómeno biológico. Además el NB puede presentar características biológicas y clínicas diversas como la regresión espontánea en algunos casos y la existencia de un grupo de tumores neuroblásticos altamente malignos y agresivos y con mala respuesta a los esquemas terapéuticos.

Los avances en cuanto a la mejoría de la supervivencia de los pacientes con NB no han sido tan significativos como en otras neoplasias; sobre todo en aquellos pacientes que desarrollan NB después del primer año de vida o tienen tumores metastásicos. Sin embargo algunos reportes sugieren que la tumorigenesis del NB puede ser el resultado de diferentes alteraciones o variantes genéticas, las cuales pueden también influir en el resultado clínico de la enfermedad.

El uso de herramientas moleculares que permitan caracterizar y comprender las bases genéticas del NB, permitirán predecir el fracaso del tratamiento. Estos

biomarcadores pueden ser integrados a las pruebas de diagnóstico y ser de utilidad como blancos moleculares para el desarrollo de nuevas terapias.

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

Los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6 que regulan la expresión de IL-6 y el nivel del receptor soluble de IL-6 (sIL-6R) respectivamente pueden tener relación con el resultado clínico en pacientes con neuroblastoma.

En algunos estudios previos con el SNP -174 IL-6 (G>C) se ha asociado esta variante genética con el resultado clínico en pacientes con NB sin embargo han reportado también resultados contradictorios en cuanto al genotipo asociado ya que Lagmay y cols. reportan el genotipo GG como un marcador de mal pronóstico clínico y por su parte Totaro y cols. en población italiana encontraron el genotipo CC asociado a un mal resultado clínico. Estas contradicciones pueden ser debidas a las diferencias genéticas que existen entre poblaciones.

Debido a los pocos estudios previos, a las contradicciones encontradas y a que no se cuenta con frecuencias reportadas de dichos SNP's en nuestra población es importante analizar si los niveles de IL-6 y el sIL-6R y los resultados clínicos pueden deberse a los polimorfismos genéticos -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6 en pacientes mexicanos con Neuroblastoma.

Hasta el momento no hay estudios en población pediátrica mexicana que evalúen el impacto de polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6 con el pronóstico y respuesta a tratamiento en pacientes con Neuroblastoma. En el HIMFG tres cuartas partes de los pacientes con NB se presentan con enfermedad metastásica y los factores pronósticos se basan hasta el momento en características clínicas, por esto es importante analizar factores genéticos que nos permitan caracterizar de la mejor manera a todos los pacientes, para en un futuro lograr que todos ellos tengan acceso a la mejor opción de tratamiento.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la asociación de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A sIL-6R en pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma en el Hospital Infantil de México Federico Gómez?

JUSTIFICACIÓN

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal mas frecuente en la infancia. En el insituto contamos con una población importante de pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma, en los cuales podemos identificar cuales son los biomarcadores que influyen en el pronóstico, asi como en la respuesta al tratamiento.

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

Los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6 que regulan la expresión de IL-6 y el nivel del receptor soluble de IL-6 (sIL-6R) respectivamente pueden tener relación con el resultado clínico en pacientes con neuroblastoma.

En algunos estudios previos con el SNP -174 IL-6 (G>C) se ha asociado esta variante genética con el resultado clínico en pacientes con NB sin embargo han reportado también resultados contradictorios en cuanto al genotipo asociado ya que Lagmay y cols. reportan el genotipo GG como un marcador de mal pronóstico clínico y por su parte Totaro y cols. en población italiana encontraron el genotipo CC asociado a un mal resultado clínico. Estas contradicciones pueden ser debidas a las diferencias genéticas que existen entre poblaciones.

Debido a los pocos estudios previos, a las contradicciones encontradas y a que no se cuenta con frecuencias reportadas de dichos SNP's en nuestra población es importante analizar si los niveles de IL-6 y el SIL-6R y los resultados clínicos pueden deberse a los polimorfismos genéticos -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6 en pacientes mexicanos con Neuroblastoma.

Hasta el momento no hay estudios en población pediátrica mexicana que evalúen el impacto de polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6 con el pronóstico y respuesta a tratamiento en pacientes con Neuroblastoma. En el HIMFG tres cuartas partes de los pacientes con NB se presentan con enfermedad metastásica y los factores pronósticos se basan hasta el momento en características clínicas, por esto es importante analizar factores genéticos

que nos permitan caracterizar de la mejor manera a todos los pacientes, para en un futuro lograr que todos ellos tengan acceso a la mejor opción de tratamiento.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Determinar la asociación de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A sIL-6R y su importancia como factor pronóstico en pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Objetivos Específicos.

1. Estandarización de la técnica PCR-RFLP para la determinación de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A sIL-6R.
2. Determinar las frecuencias de los polimorfismos genéticos en pacientes con Neuroblastoma.
3. Determinar las frecuencias de los polimorfismos genéticos en un grupo de individuos sanos.

HIPOTESIS

Hipotesis verdadera.

Los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6 impactarán negativamente el pronóstico de los pacientes con Neuroblastoma, asociándose con falla a tratamiento y recaída.

Hipotesis nula.

Los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6 no se asociaran con la falla a tratamiento o recaída, y mal pronóstico en pacientes con Neuroblastoma.

METODOS:

Tipo de Estudio

1. De cohorte
2. Descriptivo
3. Prospectivo

Diseño

Definición Del Universo.

Pacientes pediátricos con Neuroblastoma que sean diagnosticados y tratados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Criterios de Inclusión.

- Pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma.
- Pacientes sin ningún tratamiento previo.
- Que acepten participar en el estudio previa firma de consentimiento informado y/o asentimiento (Anexo1).

Criterios de Exclusión:

- Inmunodeficiencias congénitas o adquiridas.

Criterios de Eliminación:

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

Métodos de Selección de la Muestra.

Mediante la revisión del censo de paciente pediátricos del servicio de Oncología Pediátrica del Hospital Infantil de México, Federico Gómez, que hayan sido diagnosticados y tratados por Neuroblastoma en el mismo hospital.

MATERIAL Y MÉTODOS

1) Diagnóstico Neuroblastoma

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

2) Obtención de las muestras

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

3) Metodología Experimental

Análisis de los polimorfismos genéticos de -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6R

Extracción de ADN:

El ADN se obtuvo por el método de columna de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial (Qiagen, QIAamp DNA blood, midi kit). En resumen, las células se lisaron incubándolas con solución de lisis, el producto de la lisis se incubó con proteinasa K (200ug/uL). Posteriormente se adicionó etanol absoluto volumen a volumen, se homogeneizó y se pasó a través de la columna, se realizaron dos lavados con las soluciones "AW1" y "AW2". Finalmente se colocó la solución de elusión en la columna y por centrifugación se obtuvo el DNA el cual fue almacenado a -20°C hasta ser utilizado para la genotipificación.

Estandarización de la técnica de PCR-RFLP

Para la estandarización de la técnica se utilizó un grupo de muestras de individuos sanos voluntarios de entre 4 y 15 años de edad. Se realizaron curvas de concentración de MgCl₂, oligonucleótidos, dNTP's y taq polimerasa, además de curvas de temperatura de alineamiento tomando en cuenta la T_m de los iniciadores de cada uno de los genes a analizar. Para la restricción enzimática se realizaron curvas de concentración de enzima de restricción y tiempo de digestión.

Genotipificación del gen *IL-6* y *RIL-6*

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

Estos análisis utilizaron pares de iniciadores que incluyen secuencias intrónicas y exónicas para asegurar la amplificación de cada uno de los genes a estudiar y no de un pseudogen Tabla 1.

Polimorfismo	Secuencia de Iniciador	Producto de amplificación
-174 IL-6 (G>C)	F: 5' ATG CCA AGT GCT GAG TCA CTA 3' R: 5' TCG AGG GCA GAA TGA GCC TC 3'	305 pb
D358A sIL-6R	F: 5' GGC GCT CAG AAA CCC TGA GCT 3' R: 5' TGT GTG TGT TGT GGT GTG TGC 3'	524 pb

Tabla 1: Secuencias de los iniciadores

El DNA genómico se amplificó con los oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes, dNTP's, regulador 1X (20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄) y Taq ADN polimerasa. El producto de PCR se visualizó en un gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio. Después de la amplificación se realizó una restricción enzimática del producto de PCR mediante una endonucleasa de restricción específica para cada polimorfismo a estudiar.

Durante la estandarización de las técnicas de PCR se identificaron muestras de pacientes positivos para cada uno de los polimorfismos y estos fueron utilizados como controles en la genotipificación.

Recursos Humanos

- 1 Investigador principal
- 1 Asesores clínicos
- 2 Asesor metodológicos

Recursos Materiales

- Computadora con Word y Excel
- Programa estadístico
- Impresora
- Internet
- Libros, artículos
- Papelería
- Expedientes clínicos
- Kits de extracción de AND y genotipificación

CONSIDERACIONES ÉTICAS

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

Es un estudio con riesgo mínimo debido a que en una sola ocasión se tomarán 2 o 3 ml de sangre periférica de pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma. Esta toma no altera el tratamiento. Además dichas muestras serán obtenidas de los sobrantes de las muestras utilizadas para las pruebas rutinarias como parte del diagnóstico y seguimiento de la enfermedad del paciente, es decir no se realizara una toma de muestra exclusivamente para el desarrollo del protocolo.

La participación en este protocolo es voluntaria, por lo que se entregará a los padres la carta de consentimiento informado en donde estarán contenidos de manera explícita y en lenguaje sencillo el objetivo del estudio, la metodología de la investigación y la confidencialidad de los resultados. Cada uno de los pacientes que se incluyan en el estudio deberán contar con la carta de consentimiento informado, firmado previamente por padre o tutor, y además la carta de asentimiento en aquellos pacientes mayores de 8 años. (Ver anexo 1 y 2).

PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se realizo estadística edscriptiva realizando calculo de frecuencias de caracteriticas clínicas, genotipos y por alelo para cada polimorfismos.

DEFINICIÓN DE VARIABLE

Variable dependiente:

- Neuroblastoma

Variable independiente:

- Genotipo de los SNP analizados para cada citocina (-174 IL-6 (G>C) , D358A IL-6R)

Variables confusoras

- Demográficas:

Edad del paciente

Sexo

Nivel socioeconómico.

DEFINICIÓN CONCEPTUAL:

- Neuroblastoma. Es un tumor maligno extracraneal derivado de las células primordiales de la cresta neural.
- Genotipo: Información de características genéticas que tenemos los seres humanos. Formado para cada gen por dos alelos (silvestre y variante).
- Edad: Término que se utiliza para hacer mención al tiempo que ha vivido un ser vivo desde su nacimiento.
- Sexo: Se refiere a las características biológicas que definen a un ser humano como hombre o mujer.

DEFINICIÓN OPERACIONAL:

- El Neuroblastoma estará determinado por características clínicas e histopatológicas.
- El genotipo será determinado mediante PCR-RFLP, se obtendrá tres categorías. Homocigoto silvestre, Heterocigoto y Homocigoto.
- Edad: Número de años cumplidos
- Sexo: Hombre o Mujer

TIPO DE VARIABLE:

- Neuroblastoma: Es una variable cualitativa nominal dicotómica.
- Escala de medición: Si o No.
- Genotipo: Es una variable cualitativa nominal policotómica.

ESCALA DE MEDICIÓN:

- Categorica (Homocigoto silvestre, Heterocigoto y Homocigoto variable)
- Edad: Es una variable cuantitativa discreta.
- Escala de medición: meses
- Sexo: Es una variable cualitativa nominal dicotómica.
- Escala de medición : categorica (Hombre o mujer)

RESULTADOS:

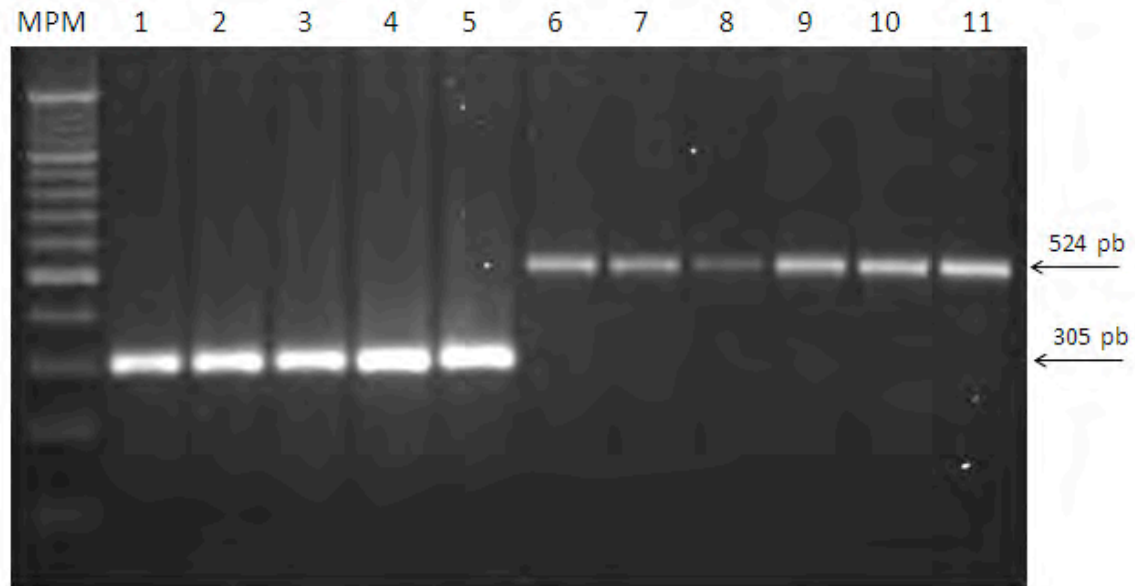
Para la estandarización de la Técnica PCR-RFLP para el SNP-174(G>C) del gen IL-6, se hicieron curvas de temperatura de alineamiento, tomando en cuenta la temperatura medio de los iniciadores, se probaron las siguientes temperaturas 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C y 65°C. La temperatura optima de alineamiento fue de 64 °C en donde se obtuvo un producto amplificación sin bandas inespecíficas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (tabla 2):

Desnaturalización inicial	95oC	3minutos
35 ciclos	95oC	60 seg
	64oC	60 seg
	72oC	60 seg
Extensión final	72oC	8 min
Producto de PCR	305 pb	

Para la estandarización de la Técnica PCR-RFLP para el SNP de D358A del gen IL-6R, se hicieron curvas de temperatura de alineamiento, tomando en cuenta la temperatura medio de los iniciadores, se probaron las siguientes temperaturas 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C y 65°C. La temperatura optima de alineamiento fue de 65 °C en donde se obtuvo un producto amplificación sin bandas inespecíficas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (tabla 3):

Desnaturalización inicial	95oC	3minutos
35 ciclos	95oC	60 seg
	65oC	60 seg
	72oC	60 seg
Extensión final	72oC	8 min
Producto de PCR	524 pb	

En la figura 1 se observa una electroforesis con los productos de PCR para ambos genes IL-6 y IL-6R. En la figura 2 se observa la digestión del producto de PCR del gen IL-6 con la enzima de restricción Nla III, para la determinación del genotipo del SNP -174 G>C. En la figura 3 se presenta el gel de exlectroforesis de la restricción del producto de PCR del gen IL-6R con la enzima Hind III para la determinación del genotipo D358A.



MPM= Marcador de peso molecular de 100 pb
1 al 5 producto de PCR del gen IL-6
6 al 11 producto de PCR del gen IL-6R

Figura 1 : Se muestran productos de PCR para el gen IL-6 de 305 pares de bases (carril 1 al 5) y productos de PCR para el gen IL-6R de 524 pares de bases (carril 6 al 11).

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

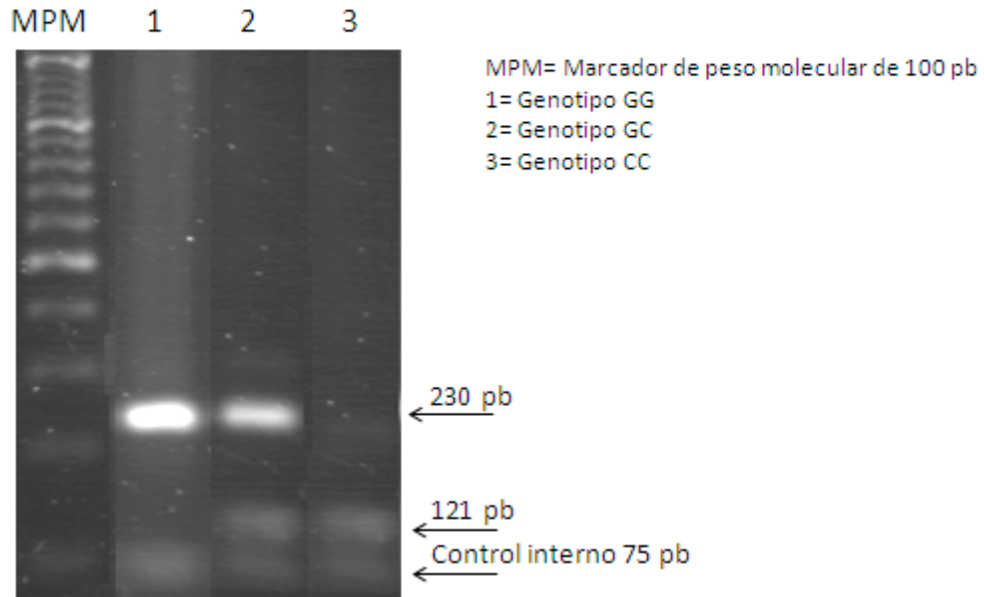


Figura 2: Se muestran la digestión del gen *IL-6* con la enzima *Nla III* para la determinación del SNP -174 *IL-6* (G>C), se observa el genotipo GG en el carril 1 (230 pb, 75 pb), genotipo GC en el carril 2 (230 pb, 121 pb y 75 pb) y el genotipo CC en el carril 3 (121 pb y 75 pb).

Digestión del gen *IL-6R* con la enzima *Hind III*

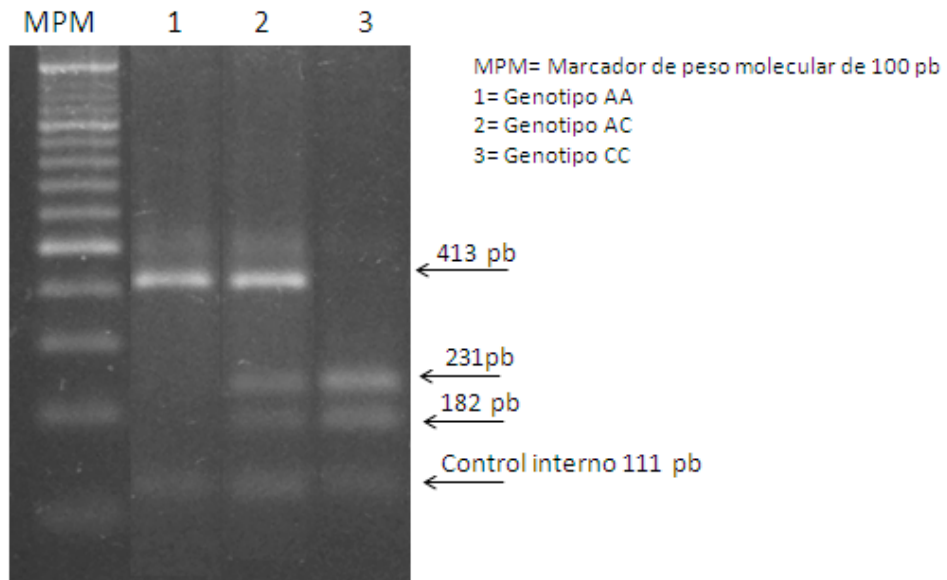


Figura 3: Se muestran la digestión del gen *IL-6R* con la enzima *Hind III* para la determinación del SNP D358A *IL-6R*, se observa el genotipo AA en el carril 1 (413 pb, 111 pb), genotipo AC en el carril 2 (413 pb, 231 pb, 184 pb y 111 pb) y el genotipo CC en el carril 3 (231 pb, 182pb y 111 pb).

GENOTIPIFICACIÓN DE LOS PACIENTES

El genotipo del gen IL-6 (SNP -174 (G>C)), hasta el momento ha sido determinado en 8 pacientes con Neuroblastoma y 18 pacientes sanos. (Figura 1 y 2). :

- El genotipo homocigoto silvestre (GG) se encontró en cuatro pacientes (50%) con Neuroblastoma y en 4 pacientes sanos (22.2%). El genotipo heterocigoto (GC) se encontró en 4 pacientes con Neuroblastoma (50%) y en 6 de los pacientes sanos (33.3%). El genotipo homocigoto variante (CC) no se encontró en pacientes enfermos y se observó en 8 individuos sanos (44.5%). (figura 1,2 y Tabla 4).
- Las frecuencias alélicas en pacientes con Neuroblastoma fue del 75% para el alelo G y 25% para el alelo C. En los pacientes sanos las frecuencias alélicas fue del 38.9% para el alelo G y 61.1% para el alelo C. (figura 2 y Tabla 5).

Tabla 4: Frecuencias por genotipo del SNP -174 (G>C) del gen IL-6.

Frecuencias por genotipo para el SNP -174 (G>C) del gen IL-6				
Genotipo	Número de pacientes n=8	Frecuencia %	Individuos sanos n=18	Frecuencia %
GG	4	50 %	4	22.2%
GC	4	50 %	6	33.3%
CC	0	0	8	44.5 %

Tabla 5: Frecuencias por alelo del SNP -174 (G>C) del gen IL-6.

Frecuencias alélicas para el SNP -174 (G>C) del gen IL-6				
Alelo	Número de alelos n=16	Frecuencia %	Individuos sanos n=36	Frecuencia %
G	12	75 %	14	38.9%
C	4	25 %	22	61.1%

El genotipo del gen IL-6R (SNP D358A), hasta el momento ha sido determinado en 8 pacientes con Neuroblastoma y 18 pacientes sanos. (Figura 1 y 3).

- El genotipo homocigoto silvestre (AA) no se encontró en pacientes con Neuroblastoma y se encontró en 9 pacientes sanos (50%). El genotipo heterocigoto (AC) se encontró en 5 pacientes con Neuroblastoma (62.5%) y en 8 de los pacientes sanos (44.4%). El genotipo homocigoto variante (CC) se encontró en 3 pacientes enfermos (37.5%) y se observó en 1 individuo sano (5.6%). (figura 3 y Tabla 6).
- Las frecuencias alélicas en pacientes con Neuroblastoma fue del 31.25% para el alelo A y 68.75% para el alelo C. En los pacientes sanos la frecuencia alélica fue del 72.2% para el alelo A y 27.8% para el alelo C. (figura 3 y Tabla 7)

Tabla 6: Frecuencias por genotipo del SNP D358A del gen *IL-6R*.

Frecuencias por genotipo para el SNP D358A del gen <i>IL-6R</i>				
Genotipo	Número de pacientes n=8	Frecuencia %	Individuos sanos n=18	Frecuencia %
AA	0	0	9	50%
AC	5	62.5%	8	44.4%
CC	3	37.5%	1	5.6 %

Tabla 7: Frecuencias por alelo del SNP D358A del gen *IL-6R*.

Frecuencias alélicas para SNP D358A del gen <i>IL-6R</i>				
Alelo	Número de alelos n=16	Frecuencia %	Individuos sanos n=36	Frecuencia %
A	5	31.25%	26	72.2%
C	11	68.75%	10	27.8%

Tabla 8: Descripción de la población de estudio.

FACTOR	n (%)
EDAD	
<18 meses	3 (37.5%)
>18 meses	5 (62.5%)
GENERO	
Masculino	1 (12.5%)
Femenino	7 (87.5%)
ESTADIO INSS (ver anexo 3)	
ESTADIO 1	2 (25%)
ESTADIO 2	0
ESTADIO 3	2 (25%)
ESTADIO 4	4 (50%)
ESTADIO 4s	0
HISTOLOGIA	
Favorable	3 (37.5%)
Desfavorable	4 (50%)
No se sabe	1 (12.5%)
PROTOCOLO	
Riesgo Bajo	2 (25%)
Riesgo Intermedio	2 (25%)
Alto Riesgo	4 (50%)
TRATAMIENTO ACTUAL	
Neoadyuvancia	2 (25%)
Adyuvancia	2 (25%)
Vigilancia	3 (37.5%)
Post TCPH	1 (12.5%)
SX PARANEOPLASICOS	
Presente	2 (25%)
Auscente	6 (75%)
ESTADO ACTUAL	
Vivo sin enfermedad.	3 (37.5%)
Vivo con enfermedad.	5 (62.5%)
Muerto con enfermedad.	0
Muerto por progresión.	0

Descripción de la Población.

Entre diciembre de 2014 y enero del 2016 se reclutaron un total de 8 pacientes, de los cuales 7 fueron femeninos (87.5%) y 1 fue masculino (12.5%).

Los diagnósticos incluyeron 4 casos (50%) de Neuroblastoma en protocolo de Alto riesgo, 2 casos de Neuroblastoma de Riesgo intermedio (25%) y 2 casos de muy bajo riesgo (25%). (Tabla 8)

El rango de edad al diagnóstico fue de 10 meses a 9 años 2 meses con una mediana 38.2 meses (3 años 1 mes), de los cuales se encontraron 3 pacientes (37.5%) menores de 18 meses y 5 pacientes (62.5%) mayores 18 meses. (tabla 8)

En el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG) se emplea un esquema de quimioterapia basado en los esquemas del POG 8104 y 8441, para etapas 1-2 y 3-4 respectivamente.

Los pacientes que recibieron el protocolo de alto riesgo (50%), un caso recibió consolidación con trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas, actualmente en mantenimiento con 13-cis ácido transretinoico, 1 caso presentó respuesta completa posterior a resección completa del primario y a 3 ciclos de quimioterapia adyuvante; 2 casos continúan en tratamiento neoadyuvante, de los cuales uno se encuentra con enfermedad estable y el otro caso aún no se ha evaluado respuesta. En 3 de los casos la histología de Neuroblastomas fue desfavorable, sólo en 1 caso no se reportó la histología. La edad al diagnóstico fue de un rango de 4 años 4 meses a 9 años 4 meses, con una media de 4 años 8 meses (58 meses).

Pacientes con riesgo intermedio representan el 25% de los casos, uno caso se encuentra en vigilancia desde agosto del 2015, el otro caso se encuentra con respuesta completa posterior a 3 ciclos de adyuvancia. La edad al diagnóstico fue de 10 a 32 meses con una media de 3 años 6 meses. Con histología desfavorable por tener neuroblastoma en diferenciación con MKI moderado y el otro caso con histología favorable por tener menos de 1.5 años en diferenciación con MKI bajo.

Los casos de neuroblastoma de muy bajo riesgo representan el 25%, los dos casos se encuentran en vigilancia posterior a resección completa de primario, ambos casos al diagnóstico presentaron asociación con síndrome de Kinsboure, su histología fue de Neuroblastomas diferenciado y en diferenciación con índice de mitosis y cariorrexis bajo, lo que les confiere una histología favorable, según la Clasificación internacional de patología para Neuroblastoma (INPC) (Ver anexo 4). Estos casos recibieron manejo para el síndrome paraneoplásico con gammaglobulina, dexametasona y ciclofosfamida. La edad de presentación al diagnóstico de 12 y 20 meses, con una media de 16 meses al diagnóstico.

La estadificación de los pacientes se realizó basándose en la evaluación clínica, radiográfica y quirúrgica. Los 3 factores pronósticos clínicos principales son la edad al diagnóstico, el estadio de la enfermedad y la histología. Los estadios que se encontraron en nuestra población fueron 4 casos (50%) con Estadio 4 del INSS (ver anexo 3), Estadio 3 con 2 casos (25%) y Estadio 1 con 2 casos (25%).

DISCUSION:

Estudios previos han mostrado asociación del SNP -174 (G>C) como factor pronóstico en pacientes con Neuroblastoma. En nuestro estudio los pacientes analizados presentaron alta frecuencia de alelo G (75%) el cual ha sido asociado con mal pronóstico, niveles elevados de IL-6 en suero, y progresión del Neuroblastoma. Al analizar esta frecuencia con los estadios de cada paciente no se observó una diferencia marcada entre el genotipo de -174 (G>C) y la estadificación de riesgo (alto, intermedio y bajo riesgo) ya que todos los pacientes presentaron al menos un alelo G, sin embargo es importante mencionar que ninguno de los pacientes analizados presentó el genotipo CC el cual ha sido asociado con mejor pronóstico, mejores tasas de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Es importante mencionar que no contamos con las pruebas moleculares (amplificación de N-Myc) necesarias para la estadificación por lo que en nuestro instituto la determinación del pronóstico se establece en relación a los factores clínicos e histopatológicos.

Por otro lado al analizar las frecuencias de genotipos para el SNP-174 (G>C) de las pacientes con neuroblastoma en comparación con individuos sanos utilizados para la estandarización de la técnica se encontró una marcada diferencia entre la frecuencia por genotipo para este SNP, 50% de los pacientes con Neuroblastoma presentaron el genotipo GG en comparación con 22.2% en población sana, la frecuencia para este genotipo concuerda con la reportada por Lagmay y cols (57.3% para GG) en un estudio realizado en 96 pacientes con Neuroblastoma. Además en la cohorte de pacientes analizada no encontramos genotipo CC y en la población sana la frecuencia fue de 44.5% para CC. Esta relación se observó claramente en el análisis de frecuencias por alelo ya que los pacientes con Neuroblastoma presentaron una frecuencia de 75% para el alelo G en comparación con los individuos sanos en los que se presentó una frecuencia del 38.9%, esto nos indica que este puede ser un posible biomarcador de riesgo a Neuroblastoma en población mexicana.

En el caso del SNP D358A del gen IL-6R, en el cual la variante C ha sido asociada con niveles elevados en suero del receptor para IL-6 y mal pronóstico en pacientes con diversos tipos de cáncer. En nuestro caso no se observó una diferencia marcada entre el genotipo y la estratificación del riesgo ya que todos los pacientes presentaron al menos un alelo C, esto puede deberse a que de la misma manera que lo explicado para el SNP -174 G>C no se cuentan con las herramientas moleculares establecidas para la determinación del riesgo, en este caso la estadificación se basó en características de edad y etapa clínica del tumor. Las frecuencias reportadas previamente por Lagmay y cols. en pacientes con Neuroblastoma no concuerdan con las reportadas en este estudio, estas diferencias son debidas al tipo de población y tamaño de muestra. Este mismo autor no reportó asociación entre el SNP D358A IL-6R y el Neuroblastoma de alto riesgo, progresión de la enfermedad y sobrevida. Sin embargo en nuestro caso las frecuencias alélicas mostraron una clara tendencia ya que el alelo C fue más frecuente (68.75%) en pacientes con Neuroblastoma en comparación con la población de individuos sanos

analizada (27.8%), lo que nos indica que el alelo C puede ser un posible biomarcador de riesgo a neuroblastoma en esta población.

El presente es el primer estudio en analizar frecuencias de estos SNP's en población mexicana, con los resultados de las frecuencias por genotipo y alelo para cada polimorfismo analizado tanto en los pacientes con Neuroblastoma y un grupo de pacientes sanos se muestran diferencias marcadas, que pueden ser importantes en el desarrollo y progresión de la enfermedad por lo cual es necesario continuar con el análisis de los polimorfismos D358A y -174 G>C en población mexicana con Neuroblastoma incluyendo una mayor cantidad de pacientes, además de analizar los niveles de IL-6 y IL-6R en suero, así como comparar dichos resultados con los factores de riesgo establecidos en los criterios internacionales como es la amplificación del N-Myc, para poder establecer el papel pronóstico de estos polimorfismos.

CONCLUSIONES:

- Se estandarizaron las condiciones metodológicas necesarias para la genotipificación de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6R.
- El alelo G del SNP -174 IL-6 (G>C) se presentó con mayor frecuencia en pacientes con Neuroblastoma que en individuos sanos.
- El alelo C del SNP D358A IL-6R se presentó con mayor frecuencia en pacientes con Neuroblastoma que en individuos sanos.
- Probablemente el alelo G del SNP 174 IL-6 (G>C) y el alelo C del SNP D358A IL-6R pueden tener un rol importante en el desarrollo y progresión del Neuroblastoma, como posibles biomarcadores de mal pronóstico.
- Es necesario incluir un mayor cantidad de pacientes para determinar el impacto pronóstico de los polimorfismos -174 IL-6 (G>C) y D358A IL-6R.

LIMITACIÓN DEL ESTUDIO:

Tiempo de seguimiento para evaluar las sobrevida libre de evento y enfermedad.

Incidencia de la enfermedad es baja, y además que existe regresión espontánea en algunos casos que pueden no detectarse clínicamente en edades tempranas.

En la mayor parte del país, como en el HIMFG no contamos con la determinación del N-MYC en el tejido de Neuroblastoma por lo tanto hasta este momento no se pueden estandarizar los factores pronósticos como en centros que tratan niños con cáncer en otros países.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

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

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) **Pizzo, Philip A.** Principles and Practice of Pediatric Oncology. 4th. S.I.: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- 2) **Medina-Sanson A, Martinez-Avalos A, Gallegos Castorena S et al.** Pediatric Oncology al Hospital Infantil de Mexico: fifty years of accomplishment. *Pediatr Hem Oncol*, 2002;19:383-7.
- 3) **Mertens, A C y Yasui, Y.** Late mortality experience in five-years survivors of childhood and adolescente cáncer: The Childhood Cancer Survivor Study. *J. Clin Oncol*, 2001; 19:3163-3172.
- 4) **Brodeur GM, Hogarty MD, Mosse YP,** Neuroblastoma. In: Poplack DG, Pizzo PA, editors. Principles nad Practice of pediatric oncology, 6th edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins;2011: 886-922,
- 5) **Irwin Meredith S, Park Julioe R.,** Neuroblastoma. Paradigm for Precision Medicine, *Pediatr Clin N Am* 2015; 62: 225-256.
- 6) **Juárez-Villegas le, Zapata-Tarrés M, Lezama del Valle P.** Resultados del tratamiento de niños con neuroblastoma en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez", *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2014;13(1):26-30.
- 7) **Juárez-Ocaña S, Palma-Padilla V, Gonzalez-Miranda G, Siorda-Reyes AG, López-Aguilar E, Aguilar-Martinez M, Mejía-Aranguré JM, Carreón-Cruz R, Rendón-Macías ME, Fajardo-Gutiérrez A,** Epidemiological and some clinical characteristics of Neuroblastoma in Mexican children (1996-2005), *BioMed Central Cancer*, 2009; 9:266
- 8) **Gurney, J G, Davis , S and Severson , R K.** *Trends in cancer incidence among children in the U.S.*, *Cancer* 1996; 78: 532–541,
- 9) **Gurney, J G, Ross, J and Wall, D A.** *Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992.* *J Pediatr Hematol Oncol* 1997;19: 428–432.
- 10) **Heck, J E, Hung, R J and Ritz, B.** *The epidemiology of neuroblastoma: a review.* *Paediatr Perinat Epidemiol* 2009; 23:125–143.
- 11) **Olshan, A F and Bunin, G R.** *Epidemiology of neuroblastoma.* *Neuroblastoma*, The Netherlands: Elsevier Science B.V, 2000: 33–39.
- 12) **Palma-Padilla V, Juárez-Ocaña S, González- Miranda G, Siordia-Reyes AG, Mejia-Aranguré JM, Carreón-Cruz R, Fajardo-Gutiérrez,** Incidencia y tendencia del Neuroblastoma en niños derechohabientes del IMSS. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2010; 48(2):151-158.
- 13) **Kaneko Y, Y and Cohn, S L. [ed.] G M Brodeur, T Sawada and Y Tsuchida.** *Ploidy and cytogenetics of neuroblastoma.* *Neuroblastoma* s.n., The Netherlands: Elsevier Science B.V., 2000: 41–56.
- 14) **Look, A T, Hayes, F A and Nitschke, R.** *Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma.* *N Engl J Med*, 1984; 311: 231–235.
- 15) **Katzenstein, H, Bowman, L C and Brodeur, G M.** *Prognostic significance of age, MYCN oncogene amplification, tumor cell ploidy, and histology in 110 infants with stage D(S) neuroblastoma: the pediatric*

- oncology group experience a Pediatric Oncology Group stu. J Clin Oncol*, 1998; 16: 2007–2017.
- 16) **Bagatell, R, Beck-Popovic, M and London , W B.** *Significance of MYCN amplification in international neuroblastoma staging system stage 1 and 2 neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group database* , J Clin Oncol, 2009; 27: 365–370.
 - 17) **Bown, N, Cotterill S, S and Lastowska, M.** *Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma.* N Engl J Med, 1999; 340:1954–1961.
 - 18) **Plantaz, D, Vandesompele, J and Van Roy, N.,** *Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification.* Int J Cancer, 2001; 91: 680–686.
 - 19) **Guo, C, White, P S and Weiss, M J.** *Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas.* Oncogene, 1999: 4948–4957.
 - 20) **Huang, E J and Reichardt, L F.,** *Trk receptors: roles in neuronal signal transduction* Annu Rev Biochem. 2003; 72: 609–642.
 - 21) **Nakagawara A.** *Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development.* Cancer Lett 2001, 169: 107–114,
 - 22) **Patapoutian, A and Reichardt, L F.,** *Trk receptors: mediators of neurotrophin action.* Curr Opin Neurobiol 2001; 11: 272–280.
 - 23) **Brodeur, G M, Pritchard, J and Berthold, F.** *Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment.* J Clin Oncol., 1993; 8: 1466-77.
 - 24) **Kushner, B H,** *Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies.* J Nucl Med, 2004; 7: 1172-88.
 - 25) **Medzhitov R.** *Origin and physiological roles of inflammation.* Nature 2008;454 (7203):428-35.
 - 26) **Medzhitov R.** *Inflammation 2010: new adventures of old flame.* Cell 2010; 19-40 (6):771-6.
 - 27) **Grivennikov SI, Karin M.** *Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage.* Ann Rheum Dis. 2011 70 Suppl1:i104-8.
 - 28) **Grivennikov SI, Greten FR, Karin M.** *Immunity, inflammation, and cancer.* Cell. 2010 19;140(6):883-99.
 - 29) **Grivennikov SI, Karin M.** *Inflammation and oncogenesis: a vicious connection.* Curr Opin Genet Dev. 2010 Feb;20(1):65-71.
 - 30) **Totaro F, Cimmino F, Pignataro P, Acierno G, De Mariano M, Longo L, Tonini GP, Iolascon A, Capasso M.** *Impact of interleukin-6 -174 G>C gene promoter polymorphism on neuroblastoma.* PLoS One. 2013 Oct 21;8(10):e7681
 - 31) **Hunter CA, Jones SA.** *IL-6 as a keystone cytokine in health and disease.* Nat Immunol. 2015 May;16(5):448-57.
 - 32) **Rivera-Chavez FA, Peters-Hybki DL, Barber RC, O'Keefe GE.** *Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6 cytokine responses.* Shock. 2003 Sep;20(3):218-23.

- 33) **Egler RA, Burlingame SM, Nuchtern JG, Russell HV.** Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor levels as markers of disease extent and prognosis in neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 1;14(21):7028-34.
- 34) **Ghandadi M, Sahebkar A.** Interleukin-6: A Critical Cytokine in Cancer Multidrug Resistance. *Curr Pharm Des.* 2015 Nov 24.
- 35) **Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R.** Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer.* 2014 Nov;14(11):736-46.
- 36) **Vendramini-Costa DB, Carvalho JE.** Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr Pharm Des.* 2012;18(26):3831-52.
- 37) **Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL.** The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer.* 2005 Nov;41(16):2502-12.
- 38) **Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA.** Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol.* 2006 Aug;80(2):227-36.
- 39) **Liao C, Yu Z, Guo W, Liu Q, Wu Y, Li Y, Bai L.** Prognostic value of circulating inflammatory factors in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Biomark.* 2014;14(6):469-81.
- 40) **Knüpfner H, Preiss R.** sIL-6R: more than an agonist? *Immunol Cell Biol.* 2008 Jan;86(1):87-91.
- 41) **Egler RA, Burlingame SM, Nuchtern JG, Russell HV.** Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor levels as markers of disease extent and prognosis in neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2008 Nov 1;14(21):7028-34.
- 42) **Naugler WE, Karin M.** The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med.* 2008 Mar;14(3):109-19.
- 43) **Lagmay JP, London WB, Gross TG, Termuhlen A, Sullivan N, Axel A, Mundy B, Ranalli M, Canner J, McGrady P, Hall B.** Prognostic significance of interleukin-6 single nucleotide polymorphism genotypes in neuroblastoma: rs1800795 (promoter) and rs8192284 (receptor). *Clin Cancer Res.* 2009 Aug 15;15(16):5234-9.
- 44) **Tanaka T, Kishimoto T.** The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res.* 2014 Apr;2(4):288-94.
- 45) **Keller ET, Wanagat J, Ershler WB.** Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front Biosci.* 1996 Dec 1;1:d340-57
- 46) **Ara T, Song L, Shimada H, Keshelava N, Russell HV, Metelitsa LS, Groshen SG, Seeger RC, DeClerck YA.** Interleukin-6 in the bone marrow microenvironment promotes the growth and survival of neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 2009 Jan 1;69(1):329-37.
- 47) **De Michele A, Martin AM, Mick R, Gor P, Wray L, Weber B and et al.** Interleukin-6 -174G>C Polymorphism is associated with improved outcome in High-Risk Breast Cancer, *Cancer research.* 2003; 63: 8051-8056

- 48) **Galicía JC, Tai H, Komatsu TY, Shimada Y, Akazawa K, Yoshie H.** Polymorphisms in the IL-6 receptor (IL-6R) gene: strong evidence that serum levels of soluble IL-6R are genetically influenced. *Genes Immun* 2004;5:513-6
- 49) **Fangyi Gu, Abrar A. Qureshi, Tianhua Niu, Peter Kraft, Qun Guo, David J. Hunter and Jiali Han,** Interleukin and interleukin receptor gene polymorphisms and susceptibility to melanoma. *Melanoma Research*, 2008; 18 (5): 330-335
- 50) **Müllberg J, Oberthür W, Lottspeich F, Mehl E, Dittrich E, Greave L, Heinrich PC, Rose-John S.** The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *Journal Immunol*, 1994; 152 (10): 4958-68.
- 51) **Rafiq S, Frayling TM, Murray A. et al.** A common variant of the interleukin 6 receptor (IL-6R) gene increases IL-6R and IL-6 levels, without other inflammatory effects. *Genes Immun* 2007;8:552-9.
- 52) **Ferreira RC, Freitag DF, Cutler AJ, Howson JMM, Rainbow DB, et. Al.** Functional IL6R 358Ala Allele impairs classical IL-6 receptor signaling and influences risk of diverse inflammatory diseases. *PLOS Genetics*, 2013; 9(4): 1-12.
- 53) **Kattan MW, Shariat SF, Andrews B, et al.** The addition of interleukin-6 soluble receptor and transforming growth factor β 1 improves a preoperative nomogram for predicting biochemical progression in patients with clinically localized prostate cancer, *J Clin Oncol* 2003;21:3573-9.
- 54) **Kingo K, Ratsep R, Koks S, Karelson M, Silm H, Vasar E,** Influence of genetic polymorphisms on interleukin-10 mRNA expression and psoriasis susceptibility. *J Dermatol Sci* 2005;37:111-113 .
- 55) **Zhou Y, Li N, Zhuang W, Liu GJ, Wu TX, Yao X, Du L, Wei ML, Wu XT,** Interleukin-10 -1082 promoter polymorphisms associated with gastric cancer among Asians.
- 56) **Chen KF, Li B, Wei YG et al,** Interleukin-10 -819 promoter polymorphism associated with gastric cancer among Asians, *J Int Med Res*, 2010; 38: 1-8
- 57) **Yao Chenjiao, Fan Zili, Chen Haibion, Lin Ying, Xiao Sheng, Huang Lihua, Du Wei,** IL-10 promoter polymorphisms affect IL-10 production and associate with susceptibility to acute myeloid leukemia, *Pharmazie*; 2013; 68: 201-206
- 58) **Fanjun Kong, Jie Liu, Yongheng Liu, Bao Song, Hualing Wang and Wenchao Liu,** Association of interleukin-10 gene polymorphisms with breast cancer in a Chinese population. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2010; 29 : 72
- 59) **Hull J, Thomson A, Kwiatkowski D.** Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. *Thorax* 2000; 55 (12):1023-1027
- 60) **Huiping Xue, Jianjun Liu, Bing Lin, Zheng Wang, Jianhua Sun, Gan Huang,** A meta-Analysis of Interleukin-8 -251 Promoter Polymorphism Associated with Gastric Cancer Risk, *PlosOne*; 2012, 7 (1): 1-14

- 61) Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol*, 2005; 7: 122-33
- 62) Hao Liu, Ping Mao, Changhou Xie, Wanfu Xie, Maode Wang and Haitao Jiang, Association between interleukin 8 -251T/A and +781 C/T polymorphisms and glioma risk, *Diagnostic Pathology* 2015; 10 : 138
- 63) Yuzhalin AE, Kutikhin AG, Interleukin-12: Clinical usage and molecular markers of cancer susceptibility, *Growth Factors*, 2012; 30 (3):176-191
- 64) Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, Vrohling M, Nussbaum K, Vom Berg J, Kulig P, Becher B. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ*. 2015 Feb;22(2):237-46
- 65) Dunning AM, Ellis PD, McBride S et al, Transforming growth factor β 1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer, *Cancer Res* 2003;63:2610-5
- 66) Awad MR, El-gamel A, Hasleton P, Genotypic variation in the transforming growth factor- β 1 gene, association with TGF.beta 1 production. *Transplantation* 1998; 66 :1014-20
- 67) Pelletier R, Pravica V, Perrey C et al, Evidence for a genetic predisposition towards acute rejection after kidney and simultaneous kidney-pancreas transplantation, *Transplantation* 2000; 70 : 674-80
- 68) Winkler B, Taschik J, Haubitz I, Eyrich M, Schlegel PG, Wiegering V, TGF β and IL10 have an impact on risk group and prognosis in childhood ALL, *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62: 72-79
- 69) D'Alfonso S, and Richiardi PM, A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region, *Immunogenetics* 1994; 39 (2): 150-154
- 70) Lu H. Ouyang W, and Huang C, Inflammation a key event in cancer development, *Molecular cancer research* 2006; 4(4): 221-233
- 71) Oliviera MM, Da silva JC, Costa JF, et al, Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the TNF-a (-238/-308) gene among TB and non TB patients: Susceptibility markers of TB occurrence?, *Journal Brasileiro de Pneumologia*, 2004; 30(4): 461-470.
- 72) Korobeinikova E, Myrzaliyeva D, Ugenskiene R, Raulinaityte D, et al, The prognostic value of IL10 and TNF alpha functional polymorphisms in premenopausal early-stage breast cancer patients.

ANEXOS.

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

TITULO DEL ESTUDIO:

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

Nombre del paciente _____

Nombre del tutor _____

Después de haber sido debidamente informado(a) sobre el objetivo del estudio y de haberme enterado que el estudio no implica riesgo para mi hijo(a), he decidido aceptar voluntariamente la participación de mi hijo(a) en este proyecto.

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

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

En el caso que tuviese cualquier duda, pregunta o queja relacionada a la conducción de este estudio, puedo discutirlo con los investigadores el Dr. Luis Enrique Juárez Villegas y la Dra. Gabriela Hernández Pliego. Que se encuentran en el teléfono 52 28 9917 en la ext. 4205 y 4204 respectivamente.

Ante dos testigos y el investigador principal, firmo o imprimo mi huella dactilar como constancia de mi aceptación voluntaria en la participación de mi hijo(a) en este estudio, el día _____ del mes de _____ del 2016 en la Ciudad de México.

Firma o huella dactilar del padre o tutor

Testigo 1

NOMBRE FIRMA

DIRECCIÓN PARENTESCO

Testigo 2

NOMBRE FIRMA

DIRECCIÓN PARENTESCO

Investigador

Investigador

Dr. Luis Enrique Juárez Villegas

Dra. Gabriela Hernández Pliego

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

TITULO DEL ESTUDIO:

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

Nombre del paciente: _____ Edad: _____

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

Objetivo:

El estudio tiene como objetivo analizar tu material genético y asociarlo con el resultado del tratamiento que te realizarán.

Justificación:

El Neuroblastoma es un tumor que afecta a niños y tienen características muy diversas, en algunos casos se cura fácilmente y en otros casos puede ser difícil su tratamiento el cual puede no funcionar.

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

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

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

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

TITULO DEL ESTUDIO:

“Identificación de Biomarcadores Inmunológicos y Moleculares como Factores de Riesgo en Pacientes Pediátricos con Neuroblastoma”

Nombre del paciente: _____ Edad: _____

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

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

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

- En caso de que tengas alguna duda relacionada al estudio, puedes preguntarla a los investigadores.
- Los resultados obtenidos de este estudio podrán ser publicados a nivel nacional e internacional, manteniendo siempre en secreto tus registros.

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

Ante dos testigos y el investigador principal, firmo o imprimo mi huella dactilar como constancia de mi aceptación para participar voluntaria en este estudio, el día _____ del mes de _____, 2016 en la Cd. de México.

Firma o huella dactilar del padre o tutor

Testigo 1

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

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

Testigo 2

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

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

Investigador

Investigador

Dr. Luis Enrique Juárez Villegas

Dra. Gabriela Hernández Pliego

Anexo 3

La estadificación de acuerdo con los criterios del INSS (1993)

EI	Tumor localizado con escisión macroscópica completa, con enfermedad residual microscópica o sin esta; ganglios linfáticos ipsilaterales representativos, microscópicamente negativos para
-----------	---

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

Anexo 4:

Clasificación de la INPC de acuerdo con el método de Shimada

EDAD	. HISTOLOGÍA FAVORABLE	HISTOLOGÍA DESFAVORABLE
Cualquiera	Ganglioneuroma	
	Ganglioneuroblastoma	Ganglioneuroblastoma nodular
		Neuroblastoma indiferenciado
< 1.5 años	NB con MKI bajo o intermedio	NB pobremente con MKI alto
1.5 - 5 años	NB con diferenciación y MKI bajo	NB pobremente con cualquier MKI
		NB con diferenciación con MKI alto
> 5 años		Neuroblastoma con cualquier MKI