



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

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.

ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO -251 A/T DEL GEN IL-8
EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON DIAGNÓSTICO DE
NEUROBLASTOMA EN EL HOSPITAL INFANTIL DE
MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:
ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA

DRA. NADIA GRACIELA MENÉNDEZ AULD

TUTOR ACADÉMICO
DR. LUIS ENRIQUE JUÁREZ VILLEGAS

TUTOR METODOLÓGICO
DRA. GABRIELA HERNÁNDEZ PLIEGO

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DE 2019.





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.

DRA. REBECA GÓMEZ CHICO VELASCO
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

TUTOR ACADÉMICO



DR. LUIS ENRIQUE JUÁREZ VILLEGAS
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGÍA Y ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

TUTOR METODOLÓGICO



DRA. GABRIELA HERNÁNDEZ PLIEGO
MÉDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGÍA Y
ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

DEDICATORIAS.

A mis padres que siempre han estado a mi lado apoyándome para cumplir todos mis sueños.

A mis maestros que me enseñaron a dar lo mejor de mi y que contribuyeron a mi formación.

A todas las personas que confiaron en mi y que hicieron que esto fuera posible.

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	5
II.	MARCO TEÓRICO	6
	i. GENERALIDADES	
	ii. EPIDEMIOLOGÍA	
	iii. PREDISPOSICIÓN GENÉTICA	
	iv. BIOLOGÍA MOLECULAR	
	v. HISTOPATOLOGÍA	
	vi. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	
	vii. DIAGNÓSTICO	
	viii. ESTADIFICACIÓN	
	ix. FACTORES PRONÓSTICO	
	x. TRATAMIENTO	
	xi. INTERLEUCINAS Y CÁNCER	
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
IV.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	20
V.	JUSTIFICACIÓN.....	21
VI.	OBJETIVOS.....	22
	GENERALES	
	ESPECÍFICOS	
VII.	HIPÓTESIS	23
VIII.	METODOLOGÍA.....	24
	a. DISEÑO, UNIVERSO DE ESTUDIO	
	b. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	
	c. DESCRIPCIÓN DE VARIABLES (DEFINICIÓN CONCEPTUAL, OPERACIONALES)	
	d. MÉTODOS: OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE IL8	
	e. RECURSOS	
	f. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	
IX.	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	27
X.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	28
XI.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	29
XII.	DISCUSIÓN.....	36
XIII.	CONCLUSIÓN.....	37

XIII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	38
XIV. ANEXOS (figuras y gráficas).....	39
XV. BIBLIOGRAFÍA	43

I. RESUMEN.

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, existe una variedad de tumores neuroblásticos altamente malignos y agresivos que tienen una mala respuesta a los esquemas terapéuticos convencionales. Se han realizado estudios en los cuales se observa que la génesis del Neuroblastoma está relacionada con alteraciones genéticas como diversos polimorfismos en citocinas (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α y β) los cuales podrían estar asociados a factores de riesgo y pronóstico. La IL-8 es una citocina proinflamatoria producida por varias células, la cual tiene diversas funciones biológicas importantes en la formación de tumores como la migración celular, la angiogénesis y el desarrollo de metástasis; considerándose como un factor de riesgo en el control del Neuroblastoma. La IL-8 activa vías efectoras que interactúan de forma activa con el proceso de génesis tumoral. Está relacionada con la activación de la cascada de señalización JAK/STAT produciendo fosforilación y activación de factores de transcripción STAT que se encargan de regular la proliferación celular y apoptosis. Por lo que se ha propuesto que esta interleucina tiene capacidad de inhibir la angiogénesis del Neuroblastoma y limitar el tamaño del tumor. Por otro lado, también se propone que actúa de forma estimulante sobre el microambiente celular promoviendo progresión celular y metástasis. Por lo tanto es importante medir y validar los niveles de IL-8 así como los polimorfismos asociados para poder comprender las bases biológicas de la enfermedad, identificar posibles biomarcadores pronóstico y determinar el éxito o el fracaso del tratamiento con el fin de brindar una terapia dirigida e incremento en la sobrevida.

Planteamiento del Problema: El NB presenta características clínicas que van desde la regresión espontánea a tumores altamente agresivos con mala respuesta terapéutica. La supervivencia de los pacientes que tienen tumores metastásicos no es alta, siendo las metástasis la principal causa de muerte. El crecimiento, invasión y metástasis de un tumor requiere de angiogénesis y la IL-8 tiene un papel importante en este proceso, ya que está implicada en la infiltración de leucocitos, la neovascularización y la angiogénesis, procesos que preceden a la invasión y metástasis de las células tumorales. La IL-8 desencadena la activación de una cascada de citocinas proinflamatorias que promueven la angiogénesis y la supervivencia celular al igual que el potencial metastásico del tumor primario. La IL-8 activa la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) promoviendo la angiogénesis y así el crecimiento descontrolado de las células tumorales.

Justificación: Tres cuartas partes de los pacientes con NB que se diagnostican en el HIMFG presentan metástasis. Existe evidencia que la expresión aumentada de IL-8 en la vascularidad de diversos tumores puede ser un importante factor de riesgo, debido a su participación en los mecanismos de angiogénesis que tienen un papel crítico en la progresión y metástasis del Neuroblastoma. Por lo tanto, es importante evaluar el resultado clínico y la asociación entre esta interleucina y el pronóstico de los pacientes con la finalidad de brindar una terapia dirigida que genere incremento en la sobrevida.

Objetivo: Identificar y determinar la asociación del polimorfismo -251 A/T de IL-8 y el riesgo en una cohorte de pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma en el Hospital Infantil de México.

Hipótesis: El polimorfismo -251 A/T impactará negativamente el pronóstico de los pacientes con Neuroblastoma, asociándose con falla a tratamiento y recaída.

Metodología: Estudio de cohorte retrospectivo en pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma en donde se definirán factores de riesgo como edad, etapa al diagnóstico, sitio del tumor primario e histología del tumor. Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 20 pacientes con diagnóstico de Neuroblastoma, se realizó la extracción de ADN por método de columna y se analizaron los SNP's -251 A/T de IL-8 por medio de PCR-RFLP y se buscará la asociación entre la expresión de esta interleucina con factores de pronóstico desfavorable.

II. MARCO TEÓRICO

GENERALIDADES

El neuroblastoma (NB) es el tumor maligno extracraneal más frecuente en la infancia y el cuarto en frecuencia de todas las neoplasias infantiles tras las leucemias, tumores de sistema nervioso central y los linfomas⁽¹⁾. La incidencia del NB varía de 6 a 14 casos por millón de niños en países desarrollados y en México, se reporta una incidencia de 5-6 casos por millón de niños por año⁽²⁾. El NB se deriva 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 sitios de localización y presentación clínica⁽³⁾. El NB puede presentar diversas características biológicas y clínicas, que van desde la regresión espontánea, maduración a componente benigno o progresión a enfermedad metastásica diseminada con pronóstico desfavorable⁽⁴⁾.

Los tumores neuroblásticos representan un espectro de tumores que se originan de las células ganglionares simpáticas primitivas; los cuales se pueden distinguir de acuerdo a su grado de maduración celular y diferenciación estimando así su potencial de crecimiento de acuerdo a la variedad histológica⁽⁵⁾. La supervivencia de los pacientes que desarrollan NB, después del primer año de vida o que presentan tumores metastásicos; no ha mejorado en comparación a otras neoplasias siendo un gran reto para la oncología pediátrica⁽⁶⁾. Se han identificado ciertas alteraciones genéticas como predictores de respuesta a tratamiento por lo que los análisis genéticos y biológicos de las células tumorales brindan información importante para brindar un manejo óptimo, comprender mejor la biología tumoral y mejorar el pronóstico de los pacientes con este tipo de tumor⁽⁴⁾.

EPIDEMIOLOGÍA.

El NB es el tumor sólido extracraneal más frecuente en los niños, representando del 7-8% de todos los tumores en la edad pediátrica. Se estima una prevalencia de 1 caso por cada 7,000 nacidos vivo y aproximadamente 800 casos nuevos diagnosticados al año en Estados Unidos; reportando una incidencia de 9.7 casos por millón en raza blanca y 6.8 casos por millón en raza negra en población menor a 19 años de edad^(7,8). La edad promedio para el diagnóstico de NB es de aproximadamente 19 meses de edad y con la siguiente distribución; 38% lactantes, 89% menores de 5 años y 98% diagnosticados antes de los 10 años de edad. La proporción es similar en niños y niñas con una relación hombre – mujer (1.1:1)⁽⁴⁾. En México, no se cuentan con datos precisos, sin embargo se estima una incidencia de 2.5 a 3.6 casos por millón de niños al año considerándose que la incidencia puede estar subestimada debido a dificultad y retraso para realizar el diagnóstico⁽²⁾.

PREDISPOSICIÓN GENÉTICA.

Existen un subgrupo de pacientes con NB que presentan predisposición genética para el desarrollo de este tumor siguiendo un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia completa⁽⁹⁾. Se reporta una incidencia de tumores neuroblásticos familiares en 1-2% de los casos nuevos diagnosticados. Las características del NB hereditario varían de acuerdo al NB esporádico en que son diagnosticados a edades más tempranas y pueden debutar con afección de más de un sitio primario⁽¹⁰⁾. Se han detectado mutaciones en el dominio TK del oncogen ALK en 75-80% de los casos de NB hereditario resultando en una activación persistente de la cinasa generando un estado de premalignidad constante. Se ha encontrado asociación entre la génesis del NB y otras alteraciones relacionadas con el desarrollo anormal de tejidos derivados de la cresta neural como la Enfermedad de Hirschsprung⁽¹¹⁾.

Dentro de las alteraciones genéticas, existe una asociación del NB hereditario con una alteración en el PHOX2B en 5% de los casos. Este gen es el regulador principal del sistema nervioso autónomo, por lo que las mutaciones que lo inhiben, generan defectos en la formación del tejido simpático suprarrenal^(12,13). En el 15-20% de los NB hereditarios no se ha logrado

identificar alguna predisposición genética asociada. Se identifican de forma infrecuente las anomalías cromosómicas constitucionales o traslocaciones desequilibradas que pueden ocurrir en loci encargados del reordenamiento somático de los tejidos tumorales como 1p, 2p, N-myc, ALK, 11q entre otros; sugiriendo que puede existir una expresión aberrante o regulación de múltiples genes que estimulen la transformación maligna de los neuroblastos indiferenciados ⁽¹⁴⁾. Existen diversos polimorfismos en el genoma asociados con la susceptibilidad, variedad histológica y fenotipo del NB permitiendo estadificar en NB de alto o bajo riesgo, se encuentran localizados en regiones reguladoras que alteran los genes implicados en el desarrollo del sistema simpático ⁽¹⁵⁾.

BIOLOGÍA MOLECULAR.

La etiología del NB es desconocida, y hasta la fecha no hay datos que apoyen de forma importante las exposiciones pre y postnatal a drogas, químicos, radiación o infecciones para el desarrollo de este tumor ⁽⁸⁾. Diversos grupos de estudio de NB han realizado cribado para detección de factores de riesgo que permitan identificar el comportamiento clínico de los tumores, concluyendo que los NB que presentaron regresión espontánea no fueron clínicamente detectados y tuvieron estudios citogenéticos y biología favorable. El desarrollo del NB en los casos esporádicos es consecuencia de alteraciones genéticas adquiridas de forma somática controlado por protooncogenes generando alteración en el comportamiento tumoral y permitiendo así clasificar al NB por grupos de riesgo ⁽¹⁶⁾.

Alteraciones somáticas

Los primeros estudios realizados, proponen que todos los NB son aneuploides con alteraciones como amplificaciones genéticas en sitios específicos, traslocaciones desequilibradas y pérdida o ganancia de cromosomas dando un fuerte valor pronóstico y para estadificar de acuerdo a grupos de riesgo permitiendo brindar una terapia dirigida al riesgo ⁽¹⁷⁾. Las teorías proponen un modelo evolutivo en donde establecen que el NB deriva de un precursor común, por lo que al existir diversos tipos de inestabilidad genómica se produce comportamiento tumoral diferente ^(17,18).

Conceptos generales de las alteraciones citogenéticas más frecuentes en NB:

- **Ploidía:** 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 ^(19,20,21,22).
- **Gen N-myc:** 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 ⁽²³⁾.
- **Ganancia del brazo largo del cromosoma 17:** Se presenta hasta en 50% de los casos con NB ⁽²⁴⁾.
- **Delección o pérdida de brazo corto del cromosoma 1:** está presente en 70-80% de los NB con cariotipos diploides, y en general se asocia a estadios avanzados y amplificación de N-myc, confirmando un mal pronóstico ⁽²⁵⁾.
- **Alteraciones en la expresión de receptores de neurotrofina: TrKA, TrKB y TrKC** que influyen en la génesis y progresión del NB ^(26,27,29).

Tipo I

En este tipo de NB hay ganancia o pérdida de cromosomas completos y pueden o no tener alteraciones en segmentos cromosómicos. La causa es desconocida, sin embargo se ha visto asociación con la segregación mitótica defectuosa. Estos tumores expresan niveles altos de receptores TrKA en cargados de llevar a cabo la diferenciación o apoptosis celular y puede ser dependiente de (NGF) factor de crecimiento neural. Generalmente presentan características biológicas favorables como estadios bajos y edad temprana de presentación con un excelente pronóstico. Tienen cariotipo hiperdiploide (cerca de triploide) refleja ganancia cromosómica y

ausencia de amplificación N-myc (asociado con comportamiento tumoral agresivo). La hiperdiploidia se analiza por citometría de flujo y continúa siendo un biomarcador de pronóstico favorable presente en niños menores de 18 meses de edad con enfermedad estadio 4 o 4s ^(29,30).

Tipo II

Estos tumores presentan alteraciones cromosómicas segmentarias como deleciones o traslocaciones desequilibradas; generalmente dentro de los brazos 1p, 1q, 3p, 11q, 14q o 17q. Estos NB tienen cariotipos casi diploides o casi tetraploides ya que las alteraciones segmentarias no alteran el contenido total del DNA. Existen dos subtipos adicionales; 2A con supresiones segmentarias en 3p,11q o deleción 1p. El tipo 2B tienen comportamiento más agresivo y tienen la amplificación del onogen N-myc muchas veces acompañado de deleción 1p generalmente sin pérdida en 11q o 3p. Estos tumores frecuentemente presentan una ganancia desequilibrada de 17q y expresan el receptor TrkB más el ligando del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) el cual funciona con vía de activación de la supervivencia autocrina y confiere una ventaja de sobrevida selectiva ^(29,30).

Protooncogenes en NB

N-myc

En el cariotipo del NB se puede identificar el oncogen N-myc (2p24) asociado con etapas avanzadas de la enfermedad, características biológicas desfavorables y respuesta pobre a tratamiento. El objetivo es identificar de forma temprana la amplificación N-myc para establecer un plan de tratamiento dirigido a pacientes de alto riesgo. La técnica para identificarlo es por medio de hibridación in situ (FISH) que permite la detección de la amplificación y heterogeneidad intratumoral ^(31,32).

El grado de copias necesario para constituir la amplificación N-myc se ha establecido por diversos grupos como >4 veces (copias/ célula). La prevalencia de la amplificación es de un 20-22% y muestra una concordancia casi completa cuando se evalúan múltiples sitios entre las muestras obtenidas al momento del diagnóstico y la recaída haciendo referencia a que es un tumor altamente agresivo ^(31,33).

N-myc miembro de la familia de protooncogenes MYC que se encargan de codificar factores de transcripción que regulan la expresión de aproximadamente el 15% de todos los genes humanos impactando el comportamiento celular. Estos genes desempeñan un papel importante en la regulación del metabolismo celular al igual que la proliferación celular la cual se encuentra normalmente afectada en la génesis tumoral ⁽³⁴⁾.

ALK

El gen ALK codifica un receptor de la superficie celular perteneciente a la familia TK el cual se expresa solamente en el sistema nervioso en desarrollo. Las mutaciones en ALK en la línea germinal, son la principal causa de NB hereditario ⁽³⁵⁾. Estas mutaciones son sustituciones de un solo aminoácido en el dominio de TK el cual promueve la actividad de señalización constitutiva. Las mutaciones de activación de AKJ adquiridas de forma somática también se encuentran como controladores oncogénicos en el 8-10% de los NB esporádicos. La amplificación del gen ALK acompaña a la amplificación N-myc en 2-4% de los NB. Por lo tanto, el 10% de los NB tendrán una alteración en ALK que puede servir como blanco terapéutico. Actualmente el Crizotinib es un inhibidor de ALK el cual ya fue aprobado por la FDA en el tratamiento de cáncer reordenado por ALK y actualmente esta siendo probado como blanco terapéutico en pacientes con NB ⁽³⁶⁾.

Alteraciones segmentarias en los cromosomas

Ganancia 17q

La ganancia desequilibrada del brazo largo del cromosoma 17q se presenta en más de la mitad de los casos de NB. Esa ganancia ocurre frecuentemente como traslocaciones desequilibrada entre los cromosomas 1 y 17. Los genes responsables de esta alteración son desconocidos, sin embargo se ha identificado BIRC5 (inhibidor de la apoptosis) y NME1 (síntesis de nucleósido trifosfato). La ganancia de 17q se asocia con NB más agresivo aunque su significancia pronóstica aún se encuentra en estudio ⁽³⁷⁾.

Delección 1p

La pérdida del brazo corto del cromosoma 1 se encuentra en 35% de los NB primarios y se asocia a etapas avanzadas de la enfermedad y amplificación de N-myc. La delección de este alelo también predice un mayor riesgo de recaída en pacientes con tumores localizados y tumores que carecen de la amplificación N-myc. Se identificó el gen de la proteína 5 de unión a cromodominio helicasa de DNA (CHD5) que codifica para una proteína encargada de la remodelación de la cromatina. La baja expresión de CHD5 está relacionado con características clínicas y biológicas desfavorables. La mayoría de las delecciones 1p son grandes, por lo que es probable que más de un gen supresor de tumores se encuentre involucrado en la patogénesis del NB ^(38,39).

HISTOPATOLOGÍA

El NB está compuesto por células pequeñas redondas y azules; los cuales se tiñen con anticuerpos neurales específicos que reconocen TH, enolasa neuronal específica, sinaptosina y cromogranina. Los tres patrones histopatológicos clásicos reflejan un espectro de diferenciación neuronal.

- El NB típico está compuesto de células pequeñas de tamaño uniforme que contienen núcleos densos e hipercromáticos con escaso citoplasma. La presencia de procesos neuríticos (neuropil) es un rasgo característico de todos los NB excepto de los más primitivos. Las pseudoreosetas de Homer Wright rodean el núcleo central, aunque es un hallazgo clásico en NB, se observa con poca frecuencia en tejido tumoral primario o metastásico.
- Ganglioneuroma (componente benigno) está compuesto de células ganglionares maduras, neuropil y estroma Schwanniano. Se definen como un grupo heterogéneo de tumores con características histopatológicas que abarcan los extremos de maduración. El término NB en maduración se usa para tumores que contienen <50% de células maduras.
- Ganglioneuroblastoma: tumor con maduración extensa (>50%). Pueden ser nodulares o difusos, cuando es focal generalmente presenta comportamiento agresivo.

Se desarrolló la clasificación de Shimada para establecer el pronóstico de los NB basada en las características histopatológicas como presencia o ausencia de estroma Schwanniano, grado de diferenciación, índice de mitosis cariorrexis para así poder clasificar a los tumores como favorables o desfavorables ⁽⁴⁰⁾.

Tabla 1. 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

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los neuroblastomas son tumores derivados de las células simpáticas primitivas pluripotenciales. Estas células embrionarias forman la cresta neural y tras la migración y diferenciación forman los diferentes tejidos del sistema nervioso simpático. A partir del tubo neural, emergen las células de la cresta neural que migran de forma ordenada y coordinada, adyacentes a la Aorta dorsal formando la cadena simpática primaria. Desde esta estructura, migran para formar los ganglios paravertebrales de los plexos mesentéricos y celiacos y finalmente una población adquiere la capacidad de respuesta a los glucocorticoides. Bajo la influencia de estas hormonas, van perdiendo los rasgos neuronales y adquiriendo la expresión de marcadores endócrinos ⁽⁴¹⁾.

La edad promedio en la cual se realiza el diagnóstico de un niño con NB es en < 5 años pero pueden ocurrir casos en niños mayores. La ubicación de los tumores primarios al momento del diagnóstico son variadas y cambian conforme a la edad. La mayoría de los NB se encuentran en abdomen (75%) aunque la frecuencia de los tumores suprarrenales es más alta en escolares (40%) que en lactantes (25%). Los lactantes también pueden debutar con lesiones a nivel torácico y cervical ⁽⁴⁾.

La sintomatología del NB depende del tamaño, localización del tumor y enfermedad metastásica; sin embargo 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; secundario a diseminación linfática y hematogena. La afección ganglionar se presenta alrededor del 30-35% en tumores aparentemente localizados y 30% de los pacientes con enfermedad metastásica también presentan involucro de ganglios regionales. Las metástasis por diseminación hematogena más frecuentes son a médula ósea, hueso, hígado y piel. En enfermedad recurrente o terminal se presenta metástasis a pulmón, sistema nervioso central, bazo, páncreas, tiroides ^(4,22).

Tumor abdominal: dolor abdominal o plenitud, puede presentarse como una masa asintomática o identificarse de manera incidental. A la exploración física se puede detectar una masa abdominal fija con bordes mal definidos por localización retroperitoneal. Cuando existe afección del órgano de Zuckerkandl puede haber síntomas vesicales o intestinales secundarios a obstrucción. La afección masiva a nivel hepático secundario a enfermedad metastásica frecuentemente en lactantes puede ocasionar compromiso respiratorio.

Tumor torácico: se presentan como masas sintomáticas o también pueden ser hallazgos incidentales. Las masas a nivel cervical pueden asociarse con el síndrome de Horner (ptosis unilateral, miosis y anhidrosis). Cuando son masas de gran volumen puede haber obstrucción mecánica de la VCS. Los tumores paraespinales en las regiones torácica, abdominal y pélvica pueden extenderse hacia los agujeros neurales de los cuerpos vertebrales y causar compresión de las raíces nerviosas de la médula espinal presentando paraplejía, disfunción de vejiga o intestino o dolor radicular. Estos síntomas neurológicos asociados son considerados una urgencia oncológica que debe de ser atendida a la brevedad.

Signos y síntomas asociados a enfermedad metastásica: Proptosis y equimosis periorbitario se presentan cuando existe infiltración tumoral a los huesos periorbitarios. La afección de hueso y médula ósea ocasiona dolor ocasionando irritabilidad y claudicación de la marcha. Pueden haber síntomas de aplasia medular como anemia, hemorragia o infecciones recurrentes. La afectación cutánea es frecuente en lactantes y se caracteriza por nódulos subcutáneos azules ⁽⁴⁾.

Síndromes paraneoplásicos

- **Síndrome de ataxia Opsoclonus Mioclonus (Síndrome de Kinsbourne):** se observa en 2-3% de los pacientes con reciente diagnóstico de NB. Su origen es autoinmune se cree que se forman anticuerpos contra el tumor que reaccionan alrededor de las células neurales del cerebro o cerebelo. Se manifiesta como movimiento rápido y caótico de los ojos, ataxia y mioclonía. La mayoría de los niños con este síndrome presentan enfermedad localizada y pronóstico favorable. Está relacionado con respuesta antitumoral del hospedero. A pesar del buen pronóstico, del 70 al 80% de estos niños presentan secuelas neurológicas como retraso cognitivo y motor, déficit del habla y alteraciones en el comportamiento; probablemente secundarias a la presencia de anticuerpos dirigidos al tumor que originan una respuesta cruzada con las células neurales del SNC. La resección tumoral mejora los síntomas, sin embargo es frecuente la exacerbación de los síntomas generalmente cuando ocurre proceso infeccioso. Cerca del 30-50% de los casos de OMAS ocurren sin estar asociados a NB o secundario a tumores que tuvieron regresión espontánea. Debido a la asociación con NB, todos los niños con OMAS deben de completar estudios complementarios para descartar NB. El manejo actual de este síndrome es con gammaglobulina, quimioterapia, corticoides y rituximab^(42, 43).
- **Síndrome de Kerner-Morrison / Síndrome asociado a péptido intestinal vasoactivo (VIP):** Se encuentra en 7-9% de los casos, resultado de una secreción anormal de péptido intestinal vasoactivo. Se caracteriza por diarrea acuosa, hipokalemia, hipocalcemia. Y se asocia a tumores neuroblásticos con células maduras (ganglioneuroma y ganglioneuroblastoma). Generalmente asociado a factores de buen pronóstico, en donde la resección quirúrgica completa resuelve la sintomatología completamente⁽⁴⁴⁾.
- **Síndrome de Pepper:** Hepatomegalia masiva por infiltración de NB; acompañada de dificultad respiratoria y/o insuficiencia respiratoria secundaria a restricción torácica⁽⁴²⁾.
- **Síndrome de Horner:** Infiltración por NB del ganglio estrellado, se caracteriza por ptosis, miosis, anhidrosis.
- **Síndrome de Blueberry muffin:** Infiltración metastásica subcutánea de NB, existen lesiones violáceas oscuras de 5 a 10 mm, que al ser presionadas presentan liberación de catecolaminas, y el paciente presenta taquicardia, rubor facial, hipertensión arterial.
- **Síndrome de Hutchinson:** Afección medular que ocasiona dolor óseo que puede presentarse durante la deambulación, o en los lactantes puede presentarse como irritabilidad sin causa aparente.
- **Ojos de mapache:** Proptosis, equimosis periorbitaria y retrobulbar.

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⁽⁴⁵⁾.

Exploración física: búsqueda intencionada de masa abdominal para estimar localización y tamaño. Evaluación detallada de ganglios linfáticos, se describe que si se presenta un ganglio con localización supraclavicular izquierda puede orientarnos a un NB de alto riesgo con enfermedad intraabdominal y extensión linfática. Exploración adecuada y detallada de cabeza y cuello en búsqueda de síndromes paraneoplásicos al igual que exploración neurológica en búsqueda de tumores paraespinales que puedan comprometer médula espinal⁽⁴⁾.

Histopatología: determinar el origen neural y el grado de diferenciación del tejido tumoral por medio de microscopía de luz e inmunohistoquímica elementos indispensables para establecer diagnóstico, estadificar en riesgo y planear estrategia de tratamiento.

Aspirado de médula ósea: se debe de realizar bilateral y con toma de biopsia. Microscopía de luz detecta 1 célula neuroblástica por cada 100 células nucleadas, inmunohistoquímica incrementa la sensibilidad a 1 en 100,000 células^(4,45).

Imagen: se debe de realizar RMN (lesión paraespinal) o TAC para localización de tumor primario. Se considera la RMN como el estudio de elección el cual está desplazando a la TAC debido a que tiene mejor resolución y no condiciona exposición a radiación.

El gamagrama con ^{131}I -MIBG es para esencial en la estadificación de NB, especialmente en aquellos de alto riesgo. Cuando se reporta gamagrama con ^{131}I -MIBG con resultado negativo y se tiene una alta sospecha de metástasis óseas de debe de realizar gamagrama con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ bifosfonato. El PET con FDG puede ser de utilidad en enfermedad metastásica pero tiene menos sensibilidad que el gamagrama con MIBG ^(4, 46).

Catecolaminas: debido a que los NB derivan de tejido neural, estos expresan enzimas encargadas en la síntesis de catecolaminas y en su metabolismo. Estos generalmente expresan monoamino oxidasa y catecol – O – metiltransferasa, los metabolitos HVA y VMA detectan una alta sensibilidad para la detección tumoral. El cribado de HVA y VMA en orina debe de ser parte del abordaje diagnóstico inicial si se sospecha NB como diagnóstico diferencial ⁽⁴⁷⁾.

ESTADIFICACIÓN

La estadificación de este tumor es compleja por tal motivo con la finalidad de uniformar 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 (INSS), basada en la evaluación clínica, radiográfica y quirúrgica⁽³⁾. 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.

Tabla 2. La estadificación de acuerdo con los criterios del INSS (1993)

E1	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.

Otra clasificación utilizada para estadificación del NB, es la propuesta por el International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) creada en 1990 (48).

Tabla 3. Clasificación del El Grupo de Riesgo Internacional para Neuroblastoma (INRG) etapas y grupo pre-tratamiento.

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

FACTORES PRONÓSTICO

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^(49,50).

TRATAMIENTO

La bifurcación biológica y pronóstica del NB se refleja en la tendencia divergente en el tratamiento; menos tratamiento para los tumores de biología favorable y estadio 4s y tratamientos más intensivos para los tumores de biología desfavorable y/o estadio 4. Los NB diseminados (estadio 4) se presentan en un 60%, siendo de mal pronóstico y hasta el año 90 tenían una SLE del 25-30%, esta actualmente ha aumentado en la última década, debido al aumento en la intensidad del tratamiento, la terapia mieloablativa de consolidación, la radioterapia, la cirugía y la aplicación de los modificadores de la respuesta biológica como el ácido 13-cis-retinoico y la inmunoterapia⁽⁵¹⁾.

QUIMIOTERAPIA

Es la base para el control sistémico de la enfermedad y se utilizan diversos fármacos citotóxicos con acción sinérgica conjunta. Es fundamental en NB de riesgo intermedio o de alto riesgo y se utiliza en pacientes de bajo riesgo con afectación sintomática de órganos vitales. Al conseguir respuesta a la quimioterapia inicial o de inducción se realiza la resección quirúrgica para eliminar tumor residual llamada cirugía de "second-look". Los agentes activos fundamentales en los regímenes actuales de inducción son los agentes alquilantes, antraciclinas, análogos de platino, y las camptotecinas. Las tasas de respuesta al cisplatino, ciclofosfamida (CFM), doxorubicina (DOXO) y epipodofilotoxinas (VP16) van del 34 al 45% ⁽⁵²⁾. Más recientemente, la camptotecinas han mostrado actividad en las recaídas cuando se combina con agentes alquilantes como la CFM y temozolomida ^(53,54).

La curva lineal de dosis-respuesta de estos tumores a los citotóxicos ha proporcionado el apoyo teórico para la utilización de tratamientos mieloablativos como terapia de consolidación. Los fármacos antineoplásicos empleados a altas dosis con rescate de células hemopoyéticas autólogas eficaces contra NB y con toxicidad extra medular limitada incluyen el Melfalán, Busulfán y Tiotepa. Los trasplantes alogénicos no se utilizan para el tratamiento del NB porque no se ha demostrado efecto terapéutico a través del "efecto injerto versus tumor." ^(26,27)

NB de bajo riesgo

Consiste en la resección quirúrgica del tumor primario en estadios INSS-1. La supervivencia libre de evento (EFS) es mayor del 90% en los NB localizados y completamente resecados independientemente de la edad. La cirugía sola como terapia inicial es efectiva en los NB con INSS estadio 1. Las recidivas locales pueden ser manejadas con segundas cirugías, y las recurrencias metastásicas suelen ser controladas con quimioterapia ⁽⁵⁵⁾.

La cirugía sola es el tratamiento inicial de elección para la mayoría de NB estadio INSS 2, incluso con enfermedad macroscópica residual en donde la quimioterapia adyuvante o la radioterapia no están justificadas para la mayoría de INSS estadio 2 ⁽⁵⁶⁾. Se recomiendan cuatro ciclos de quimioterapia para la etapa INSS 2 con resección del tumor menor del 50%. Sin embargo, la sola observación de pacientes con NB metastásico biológicamente favorable sugiere que pueden observarse en forma segura, o ser tratados con menos quimioterapia ⁽⁵⁷⁾.

La gran proporción de los NB se comportarán de una manera benigna, la regresión espontánea es descrita en estadio 4S; la experiencia en la evaluación del recién nacido con catecolaminas en orina sugiere que la gran mayoría de los casos localizados tendrán regresión. Este "esperar y ver" se ha extendido a las masas suprarrenales descubiertas accidentalmente en el período perinatal, recomendando una estrecha observación con ecografía serial para tumores seleccionados sin biopsia quirúrgica o cualquier intervención ⁽⁵⁸⁾. Los pacientes con INSS 1 y 2 con amplificación de N-myc deben tratarse con quimioterapia corta y poco intensa después de la cirugía del tumor primario, ya que la mayoría de los pacientes presentan recaídas metastásica si solo son tratados con cirugía. Los pacientes con estadios 4S y amplificación del N-myc demuestran progresión rápida o recaída de la enfermedad y se comportan como estadios 4.

NB de riesgo intermedio

Caracterizado por enfermedad metastásica o de cualquier edad con tumores grandes y primarios irreseables. El NB INSS estadio 3 ha sido tratados de forma heterogénea y son heterogéneos debido a estrategia quirúrgica que afecta la etapa INSS. Los tratamientos se basan en dosis moderadamente intensa de CFM, DOXO, CDDP y VP16 con radiación local en enfermedad residual. Los casos con Estadio 3, sin amplificación N-myc, Shimada favorable, y la ferritina sérica baja tienen una SSC del 100% a 4 años. Lactantes con Estadio 3 y una característica biológica desfavorable tienen a 4 años de SSC 90% y SG de 93%. Estadio 3 con 1 año de edad y una característica biológica desfavorable tienen SSC de 75% y SG de 65% a 4 años. Lactantes con NB INSS 4 son clasificados como de riesgo intermedio.

La edad al diagnóstico y el estado de N-myc son factores pronóstico independientes de en este grupo de pacientes. Los casos NB sin amplificación N-myc tienen un curso clínico es menos agresivos y responden a quimioterapia de intensidad moderada, con de SSC de 93% a 3 años.

Lactantes con amplificación del N-myc con terapia más intensiva tienen EFS del 10%. El COG redujo la quimioterapia y radioterapia en este grupo, con 4 o 8 ciclos basado en las características biológicas del tumor. La SSC de 88% y SG 96% a 3 años⁽⁵⁹⁾. Se reducirá más la quimioterapia usando un algoritmo basado en la respuesta guiando la duración de la terapia, este identifica casos con delección 1p36 y 11q23 por tener mayor riesgo de fracaso al tratamiento y se dará tratamiento más largo, para mejorar su tasa de curación.

NB de alto riesgo

Históricamente se reporta una supervivencia menor del 15%. Actualmente los métodos de tratamiento integrales incluyen quimioterapia de inducción intensiva, la terapia de consolidación mieloablativa con rescate de CPH y terapia dirigida para la enfermedad residual, que han logrado mejorar las tasas de supervivencia global. Sin embargo, las tasas de supervivencia actuales siguen siendo bajas. Lactantes con NB metastásico con amplificación del N-myc tienen un curso clínico muy agresivo y deben ser clasificados como de alto riesgo.

- Terapia de inducción: Su objetivo es la reducción máxima de la masa tumoral en los sitios primarios y metastásicos. La intensidad de dosis se ha asociado con la respuesta y la supervivencia. Las lesiones óseas corticales persistentes y el involucro de la médula ósea son factores pronósticos adversos independientes⁽⁶⁰⁾. La gammagrafía con MIBG es importante para evaluar la respuesta, y la calidad de respuesta a la quimioterapia de inducción asociada con evolución. Los pacientes que logran un respuesta completa con la inducción tienen mejor pronóstico, los pacientes con pobre respuesta se puede convertir en respuestas completas con dosis altas de terapia mieloablativa⁽⁶¹⁾. Las técnicas radiográficas son más sensibles (enfermedad mínima residual al final de la inducción detectado por I 123-MIBG), también se han maximizado los efecto dosis-respuesta con los agentes de quimioterapia básicos utilizados.
- Tratamiento de consolidación: Su objetivo es consolidar la respuesta de la inducción y eliminar remanente tumoral, utilizando quimioterapia mieloablativa y rescate con células progenitoras hematopoyéticas. El Melfalán es el fármaco más investigado, utilizado a altas dosis. El CCG reportó SLE del 62% a 3 años con carboplatino, VP16, melfalan, radioterapia local y trasplante autólogo de CPH.
- Radioterapia: El NB es un tumor radiosensible, aunque las dosis curativas de irradiación no han sido bien definidas. Para los tumores no resecables quirúrgicamente se utilizan habitualmente dosis entre 20 - 45 Gy para conseguir el control local de la enfermedad. Los estadios 4 se benefician de un buen control local con cirugía completa y 21 Gy de radioterapia de consolidación.
- MIBG (Meta Iodo Bencil Guanidina): Su uso a dosis altas permite utilizar el efecto de la radiación local con finalidades terapéuticas. La experiencia es favorable en recaída, algunos grupos la utilizan para el tratamiento de inducción, aún se desconoce la dosis más adecuada y la captación de MIBG por los tumores y las metástasis son variables.

De acuerdo a los estudios que se utilizan para estadificar la extensión de la enfermedad, también existen criterios internacionales para valorar la respuesta al tratamiento en NB

NB en recaída

El tratamiento con terapias estándar después de la recurrencia puede producir segundas remisiones con corta duración, sin embargo la mitad de los casos de recaídas presentan factores biológicos desfavorables. Los pacientes con NB de alto riesgo con enfermedad recurrente o refractaria o con desarrollo de enfermedad progresiva son un reto clínico y en la actualidad no existen tratamientos curativos conocidos. No obstante, han sido identificados agentes que permiten una supervivencia prolongada de un subconjunto de pacientes. Los avances en la comprensión de la base molecular del NB de alto riesgo han identificado dianas terapéuticas^(60,61).

INTERLEUCINAS Y CÁNCER

El binomio entre inflamación persistente y cáncer se ha propuesto como promoción de progresión de tumores.^(62, 63) La respuesta inflamatoria típica involucra una serie de reacciones

de los vasos sanguíneos que conducen a la acumulación de fluidos y células inmunitarias a tejidos extravasculares. La vía inflamatoria ésta integrada por cuatro componentes: 1) Los inductores, 2) tipos de sensores, 3) síntesis de mediadores inflamatorios y 4) las acciones de las moléculas efectoras sobre los órganos blanco. ^(64, 65). Entre los mediadores inflamatorios, las citocinas tienen un papel importante tanto en activación de inflamación, regulación inmunitaria y homeostasis del hospedero ⁽⁶⁵⁾. Las citocinas, pertenecen a una familia de pequeñas moléculas secretoras las cuales tienen la capacidad de inducir la migración de leucocitos. Mientras que algunas citocinas son de naturaleza homeostática y se secretan de forma constitutiva, otras se secretan específicamente en sitios de infección o como respuesta a un estímulo proinflamatorio; lo cual es crucial en la inflamación y el estado de vigilancia inmunológica ^(66,67).

Las citocinas se clasifican en 4 grupos definidos por la posición de los residuos de cisteína conservados dentro del extremo amino. Hay más de 50 citocinas identificadas las cuales ejercen sus efectos biológicos cuando se unen a su receptor específico acoplados a proteínas G. Aunque originalmente las citocinas y sus receptores se identificaron en leucocitos, hoy en día se sabe que son expresados y secretados por varios tipos de células incluidas epiteliales, endoteliales y fibroblastos. La expresión de las citocinas y sus receptores varía mucho entre los tipos de células y está determinada por el linaje y el estado de diferenciación de una célula ^(62,64).

El control de la inflamación depende del balance de citocinas pro y anti-inflamatorias (IL-1, TNF- α , IL-12, IL-8, IL-6 vs IL-4, IL-10, TGF- β). La red de receptores de citocinas ha evolucionado para beneficio del huésped, sin embargo cuando existe una disregulación de estas proteínas se ha visto asociación con diversas patologías ⁽⁶⁸⁾. Existe una creciente evidencia de que una de las funciones biológicas de las citocinas tienen un papel en la mediación de la tumorigénesis. Una de las características del cáncer, es el involucro de células inmunitarias en la que los leucocitos se reclutan en la proximidad de los tumores en un proceso mediado directamente por citocinas. Además, las propias células neoplásicas, pueden adquirir la expresión de receptores de citocinas debido a mutaciones genéticas o por cambios en el microambiente como la hipoxia celular. Las células tumorales expresan muchos receptores de citocinas lo que induce el crecimiento celular, la supervivencia y la angiogénesis; procesos que contribuyen al potencial metastásico tumoral ⁽⁶⁹⁾.

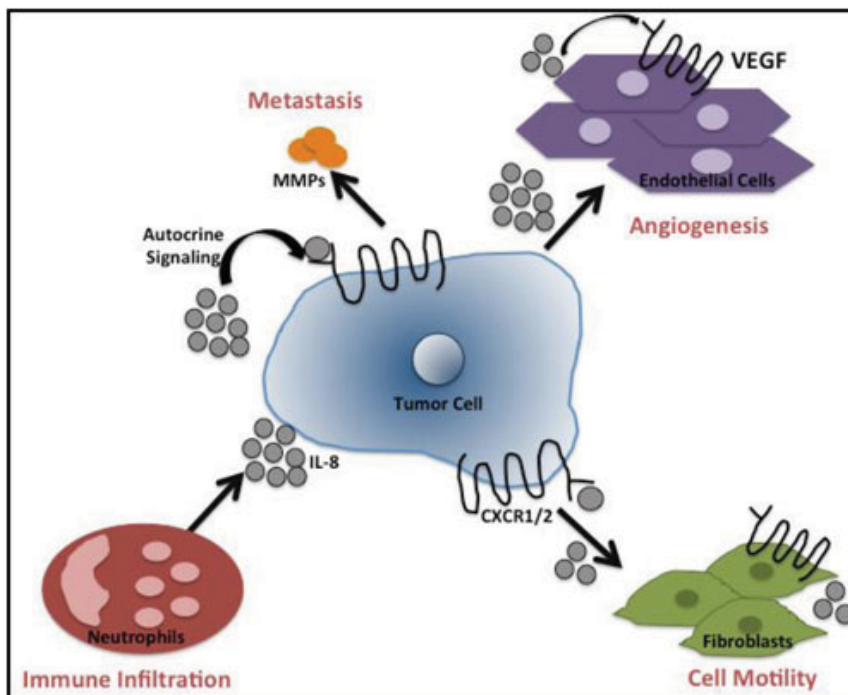
La interleucina 8 (IL-8) también conocida como CXCL8 pertenece a la familia de las citocinas CXC y su papel en el desarrollo de tumores y la diseminación específica de las células tumorales es un área de importante investigación. La IL-8 es una citocina proinflamatoria, inicialmente denominado péptido 1 activador de neutrófilos debido a que es un potente quimotáctico para neutrófilos en enfermedades inflamatorias e inmunes. Se ha establecido que tiene un papel importante en la génesis tumoral, ya que regula los procesos de desarrollo tumoral, migración, celular, angiogénesis y desarrollo de enfermedad metastásica ^(68,70).

La IL-8 se activa a través de dos receptores (CXCR1 y CXCR2) acoplados a proteínas G heterotriméricas que consisten de subunidades α , β y γ y que se encuentran en la superficie celular (70,71). La unión de este ligando a su receptor conduce al intercambio de difosfato de guanosina por trifosfato de guanosina en la subunidad $G\alpha$. Esta reacción catalítica activa tres cascadas de señalización primaria que son fosfatidilinositol 3 cinasa / Akt (PI3K / Akt), fosfolipasa C / proteína cinasa C (PLC / PKC) y Ras / Raf / proteína cinasa reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (Erk1 / 2). Otras cascadas de señalización activadas en respuesta a la señalización de IL-8 incluyen los transductores de la quinasa de adhesión focal, Rho, Rac y Janus; activadores de las vías de transcripción (JAK / STAT). A través de estas cascadas de señalización, la IL-8 activa una serie de efectores que colabora en el proceso de tumorigénesis ⁽⁷²⁾.

La IL-8 ejerce sus efectos tumorigénicos a través de la señalización autócrina y parácrina. La secreción de IL-8 por las células tumorales puede mejorar la supervivencia celular y la proliferación de las células tumorales a través de la señalización autócrina. La IL-8 también tiene un papel importante en el microambiente tumoral; compuesto por diversos grupos de células como fibroblastos, células endoteliales, células dendríticas y macrófagos asociados a tumores ⁽⁷³⁾. Una red compleja de citocinas y moléculas inflamatorias impulsa la comunicación entre el microambiente y las células tumorales malignas. Es importante mencionar que la IL-8

está implicada en el inicio de la infiltración de leucocitos, la neovascularización y la angiogénesis; todos estos procesos preceden a la invasión y metástasis de las células tumorales ⁽⁷⁴⁾. Las células tumorales secretan IL-8 desencadenando la infiltración de leucocitos al sitio de producción de las citocinas. Los leucocitos a su vez secretan citocinas y factores de crecimiento que promueven la angiogénesis y la supervivencia celular. También la IL-8 tiene acción directa sobre las células endoteliales y otros componentes del microambiente promoviendo así la invasividad y el potencial metastásico del tumor primario. Un estudio reciente, demuestra que la IL-8 activa la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a través de la señalización autócrina promoviendo de esta manera la angiogénesis. La IL-8 mejora la producción de metaloproteinasas de matriz como MMP-2 y MMP-9 en las células tumorales promoviendo la diseminación tumoral ^(72,73,74). *Figura 1*

Figura 1. La señalización de IL-8 puede conducir a la activación de las células inmunes, factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas, que activan los procesos de desarrollo tumoral, la angiogénesis y la formación de enfermedad metastásica.



Dada la amplia gama de funciones biológicas que tiene la IL-8 sobre las células tumorales y el microambiente celular, no es sorprendente que la expresión elevada de IL-8 sea característica en pacientes con diagnóstico de Neuroblastoma, tumor que tiene un alto grado de generar metástasis. La IL-8 se ha estudiado como un posible marcador pronóstico en varios tumores en estudios preclínicos y clínicos. En pacientes con cáncer de páncreas, se detectó una expresión incrementada de IL-8 confiriendo una tasa rápida de crecimiento y mayor agresividad en comparación con los tumores con bajos niveles de IL-8. La expresión alta de IL-8 también se relaciona con el alto potencial metastásico de las líneas celulares en melanoma y cáncer de mama ^(75,76).

Existen estudios antes mencionados que relacionan los niveles de IL-8 con la agresividad y el potencial metastásico de los tumores, sin embargo los mecanismos precisos que subyacen al papel de IL-8 en el desarrollo de tumores sigue siendo incierto. Independientemente de los mecanismos moleculares de la función de la IL-8 en la carcinogénesis, múltiples informes sugieren que la IL-8 y sus receptores sirven de dianas terapéuticas en diversos tipos de cáncer ⁽⁷⁷⁾. La repertaxina, un anticuerpo humanizado contra IL-8 e inhibidor del receptor de IL-8 tiene efectos prometedores en el contexto de su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral, angiogénesis y metástasis. El discernir la asociación del complejo IL-8 y el de otras citocinas

(IL-8, TNF- α , IL-12, TGF- β , e IL-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 ⁽⁷⁸⁾.

El gen de la IL-8 humana está localizado en el cromosoma 4q 13-21 de aproximadamente 2504.682 g/mol 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 -251 A>T que se encuentra en la región promotora del gen *IL-8* puede ser un factor pronóstico 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-8, 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-8. ⁽³²⁾ DeMichele describió una correlación directa entre el SNP -251 (A>T) y el resultado clínico en cáncer de mama y melanoma. Así mismo mujeres con cáncer de mama sensible a hormonas y homocigotas (TT) para el SNP -251 (A/T) 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 A en comparación con aquellos pacientes homocigotas para el alelo T ⁽⁴³⁾. Por otra parte, Totaro y cols reportaron la variante -251 A/T presenta un incremento significativo en la actividad transcripcional comparada con el alelo T, también encontraron niveles elevados de IL-8 asociados con mal resultado en niños con Neuroblastoma. Además relacionaron al SNP IL-8 -251 A>T 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⁾.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El Neuroblastoma presenta características clínicas que van desde la regresión espontánea hasta tumores con características desfavorables que son altamente malignos y agresivos que condicionan una falla terapéutica a los esquemas de tratamiento convencionales. La supervivencia de los pacientes que tienen tumores metastásicos no es alta, siendo las metástasis la principal causa de muerte.

El crecimiento, invasión y metástasis de un tumor requiere de angiogénesis y la IL-8 tiene un papel importante en este proceso, ya que está implicada en la infiltración de leucocitos, la neovascularización y la angiogénesis, procesos que preceden a la invasión y metástasis de las células tumorales. La IL-8 desencadena la activación de una cascada de citocinas proinflamatorias que promueven la angiogénesis y la supervivencia celular al igual que el potencial metastásico del tumor primario. La IL-8 activa la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) promoviendo la angiogénesis y así el crecimiento descontrolado de las células tumorales.

La determinación del polimorfismo en la IL-8 nos permite identificar un factor pronóstico que puede condicionar una posible falla terapéutica a tratamiento; permitiendo estadificar a los pacientes como de alto riesgo y así brindar un tratamiento dirigido con la finalidad de mejorar la sobrevida.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿La expresión del polimorfismo -251 (A/T) de IL-8 condiciona un impacto negativo en el pronóstico de los pacientes diagnosticados con Neuroblastoma en el HIMFG condicionando un incremento en el riesgo para el desarrollo de metástasis y falla al tratamiento ?

V. JUSTIFICACIÓN.

Tres cuartas partes de los pacientes con NB que se diagnostican en el HIMFG presentan metástasis. Existe evidencia que la expresión aumentada de IL-8 en la vascularidad de diversos tumores puede ser un importante factor de riesgo, debido a su participación en los mecanismos de angiogénesis que tienen un papel crítico en la progresión y metástasis del Neuroblastoma. Los polimorfismos -251 A/T IL-8 que regulan la expresión de IL-8 y el nivel del receptor soluble de IL-8 pueden tener relación con el resultado clínico en pacientes con neuroblastoma. Por lo tanto, es importante evaluar el resultado clínico y la asociación entre esta interleucina y el pronóstico de los pacientes con la finalidad de brindar una terapia dirigida que genere incremento en la sobrevida.

VI. OBJETIVOS.

GENERAL.

1. Determinar la asociación del polimorfismo -251 A/T de IL-8 y el riesgo en pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

ESPECÍFICOS.

1. Estandarización de la técnica PCR-RFLP para la determinación el polimorfismo-251 A/T
2. Determinar las frecuencias del polimorfismo -251 A/T en pacientes con Neuroblastoma.
3. Determinar las frecuencias del polimorfismo -251 A/T en un grupo de individuos sanos.

VII. HIPOTESIS.

Hipótesis verdadera.

El polimorfismo -251 A/T impactará negativamente el pronóstico de los pacientes con Neuroblastoma, asociándose con falla a tratamiento y recaída.

Hipótesis nula.

El polimorfismo -251 A/T no se asociara con la falla a tratamiento o recaída, y mal pronóstico en pacientes con Neuroblastoma.

VIII. METODOLOGÍA.

Diseño de estudio.

Estudio epidemiológico de tipo cohorte, observacional, descriptivo y prospectivo que incluirá a los pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma.

Universo de estudio.

Se incluirán todos los pacientes pediátricos de 0 a 18 años de edad, de ambos sexos con diagnóstico de Neuroblastoma que hayan sido diagnosticados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez en quienes se haya realizado identificación del polimorfismo -251 A/T IL-8.

Criterios de inclusión

- Pacientes pediátricos de 0 a 18 años de edad de ambos sexos con diagnóstico de Neuroblastoma.
- Pacientes que no hayan recibido tratamientos previos.
- Atendidos en el servicio de Oncología del Hospital Infantil de México Federico Gómez.
- Que el expediente contenga los siguientes datos: edad del paciente al momento del diagnóstico, género, datos clínicos al ingreso, estudios de imagen y laboratorio al diagnóstico, fecha del diagnóstico, localización de tumor primario, presencia de enfermedad metastásica al diagnóstico, estadificación de NB y tratamiento recibido.
- Firma de consentimiento / asentimiento informado.

Criterios de exclusión y eliminación.

- Pacientes con inmunodeficiencias adquiridas o congénitas.
- Cantidad insuficiente de muestra que no permita la realización de las pruebas necesarias para el estudio.
- Falta de datos en expediente clínico.
- Sin firma de consentimiento / asentimiento informado.

Descripción de variables.

Dependiente

- Neuroblastoma
- Metástasis

Independientes

- Genotipo de los SNP analizados para cada citocina (-251 IL-8 (A/T))

Variables de control

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de Medición
Neuroblastoma	Cualitativa nominal dicotómica	Tumor maligno extracraneal derivado de las células primordiales de la cresta neural.	El diagnóstico será determinado por características clínicas e histopatológicas.	Categórica 1)NB de alto riesgo 2)NB de riesgo intermedio 3) NB de Bajo riesgo.
Genotipo	Cualitativa Nominal Policotómica	Información de características genéticas que tenemos los seres humanos. Formado para cada gen por dos alelos (silvestre	determinado mediante PCR-RFLP, se obtendrá tres categorías. Homocigoto silvestre, Heterocigoto y	Categórica Homocigoto silvestre, Heterocigoto y Homocigoto variable

		y variante).	Homocigoto.	
Metástasis	Cualitativa Nominal dicotómica	Diseminación del cáncer de una parte del cuerpo donde se formo originalmente a otra parte del cuerpo.	La metástasis será determinada por características clínicas, estudios de imagen e histopatológicos.	Categorica: 1) Paciente con metástasis 2) Paciente sin metástasis.
Niveles IL8	Cuantitativa numérica continúa	Moléculas quimiotáctica involucrada en la cascada proinflamatoria y con alto potencial angiogénico.	Datos obtenidos a través de una prueba ELISA.	Numérica (de razón)
Edad	Cuantitativa discreta.	Término que se utiliza para hacer mención al tiempo que ha vivido un ser vivo desde su nacimiento.	Número de años cumplidos	Numérica meses
Sexo	Cualitativa dicotómica	Características fenotípicas de los individuos que los agrupan en hombre o mujer.	Identificación en el expediente clínico del dato de género registrado.	Categorica 1) Mujer, 2) Hombre

Métodos.

1. *Diagnóstico de NB:* por medio de hallazgos histopatológicos en biopsias de tumor y morfología de la médula ósea.

2. *Obtención de muestra:* Suero: Las muestras de suero empleadas para la determinación de los niveles de IL-8 serán colectadas por punción venosa 1ml (previo consentimiento y/o asentimiento informado) como parte de las pruebas requeridas para el diagnóstico de los pacientes teniendo la precaución de hacerlo antes de que el paciente haya sido transfundido o de que hayan pasado al menos 3 meses desde la última transfusión. No se realizó una punción exclusivamente para el protocolo.

3. *Metodología experimental:* Análisis del polimorfismo genéticos de -251 (A/T) del Gen IL-8

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 incubo con proteinasa K (200ug/uL). Posteriormente se adicionó etanol absoluto volumen a volumen, se homogeneizo y se paso a través de la columna, se realizaron dos lavados con las soluciones "AW1" y "AW2". Finalmente se coloco 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 utilizo 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-8

La identificación de estos polimorfismos se realizó mediante metodologías de PCR-RFLP (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).

Tabla 1. Secuencias de los iniciadores

Polimorfismo	Secuencia de Iniciador	Producto de amplificación
-251 IL-8 (A>T)	F: 5' TCA TCC ATG ATC TTG TTC TAA 3'	542 pb
	R: 5' GGA AAA CGC TGT AGG TCA GA 3'	

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.

4. Recursos:

MATERIALES

- Expediente Clínico.
- Hoja de Recolección de Datos.
- Estudio Histopatológico.
- Kits de extracción de DNA y genotipificación.

HUMANOS

- Residente de Oncología Pediátrica realizó el protocolo de investigación y análisis de los datos obtenidos bajo asesoría del tutor metodológico, recolecto la información de los expedientes, clínicos y bases de datos así como la búsqueda de la literatura para la elaboración del marco teórico.
- Investigador Responsable: Elaboración del protocolo y marco teórico y seguimiento del estudio.
- Asesor Metodológico: Es el responsable de guiar el diseño del protocolo de investigación, la redacción de este, así como apoyar en el análisis de la información para la presentación de los resultados.

5. Análisis estadístico.

Se analizarán los casos de pacientes pediátricos con diagnóstico de Neuroblastoma en los cuales se determinó la presencia del polimorfismo -251 (A/T) de IL-8 y su asociación con factores de mal pronóstico que les confieran una estadificación de alto riesgo. Para definir el riesgo se analizarán factores ya conocidos, como edad, etapa al diagnóstico, sitio del tumor primario, histología del tumor y presencia de enfermedad metastásica al diagnóstico. Se realizó estadística descriptiva realizando el cálculo de frecuencias de características clínicas, genotipos y por alelo para cada polimorfismo.

IX. 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).

IX. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

- Incidencia baja de la enfermedad con riesgo de que los pacientes presenten regresión espontánea, haciendo que en algunos casos la enfermedad no pueda ser detectada clínicamente a edades tempranas.
- Tiempo de seguimiento para valorar la supervivencia libre de enfermedad.
- 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.

X. ANÁLISIS DE RESULTADOS

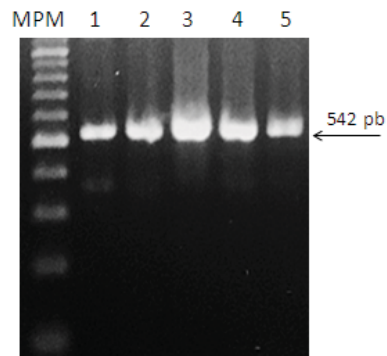
Para la estandarización de la Técnica PCR-RFLP para el -251 IL-8 (A>T) del gen *IL-8*, se hicieron curvas de concentración de iniciadores, MgCl₂, temperatura de alineamiento, tomando en cuenta la temperatura medio de los iniciadores, La temperatura optima de alineamiento fue de 57 °C en donde se obtuvo un producto amplificación sin bandas inespecificas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (tabla 2).

Tabla 2. Condiciones de amplificación para el -251 (A/T) IL-8 del gen IL-8

Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos
35 ciclos	95°C	60 s
	64°C	60 s
	72°C	60 s
Extensión final	72°C	8 min
Producto de PCR	542 pb	

En la figura A se observa una electroforesis con los productos de PCR para el gen IL-8.

Figura A. Amplificaciones del gen *IL-8* SNP -251 A/T



a) MPM= Marcador de peso molecular de 100 pb, carril 1 al 5 producto de PCR de 542 pb del gen *IL-8* SNP -251 A/T.

Figura A : Se muestran productos de PCR para el gen *IL-8* de 305 pares de bases (carril 1 al 5)

En la figura B se observa la digestión del producto de PCR del gen *IL-8* con la enzima de restricción *Mfe I*, para la determinación del genotipo del SNP -251 A>T

Figura B. Digestión del gen *IL-8* SNP -251 A/T con la enzima *Mfe I*

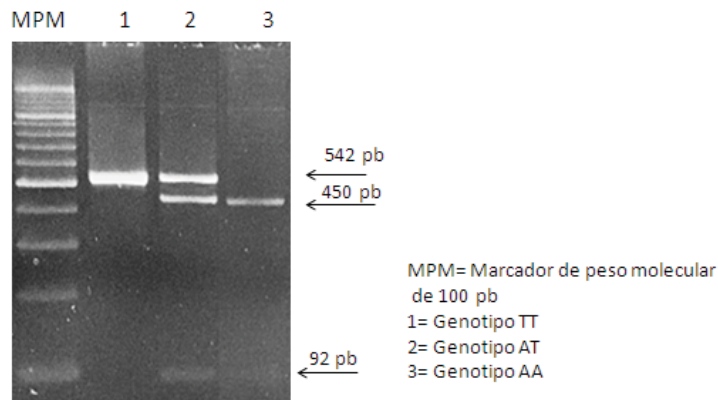


Figura B: Se muestran la digestión del gen *IL-8* con la enzima *Mfe I* para la determinación del SNP -251 *IL-8* (A>T), se observa el genotipo TT en el carril 1 (542 pb, 92 pb), genotipo AT en el carril 2 (542 pb, 450 pb y 92 pb) y el genotipo AA en el carril 3 (450pb y 92 pb).

GENOTIPIFICACIÓN DE LOS PACIENTES.

El genotipo del SNP -251 (A>T) del gen *IL-8*, hasta el momento ha sido determinado en 20 pacientes con Neuroblastoma y 20 pacientes sanos (Figura A y B).

- El genotipo homocigoto silvestre (AA) se encontró en dos pacientes (10%) con Neuroblastoma y en dos pacientes sanos (10%).
- El genotipo heterocigoto (AT) se encontró en 12 pacientes con Neuroblastoma (60%) y en 4 de los pacientes sanos (20%).
- El genotipo homocigoto variante (TT) se encontró en 6 (30%) pacientes enfermos y se observó en 14 individuos sanos (70%). (Tabla 3).

Las frecuencias alélicas en pacientes con Neuroblastoma fue del 40% para el alelo A y 60% para el alelo T. En los pacientes sanos las frecuencias alélicas fue del 20% para el alelo A y 80% para el alelo T. (Tabla 4).

Tabla 3: Frecuencias por genotipo del SNP -251 (A/T) del gen *IL-8*

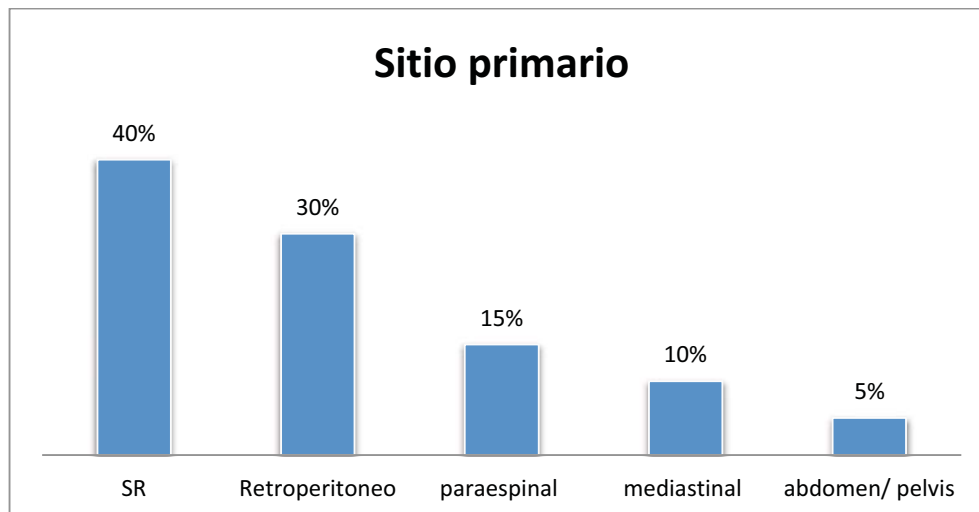
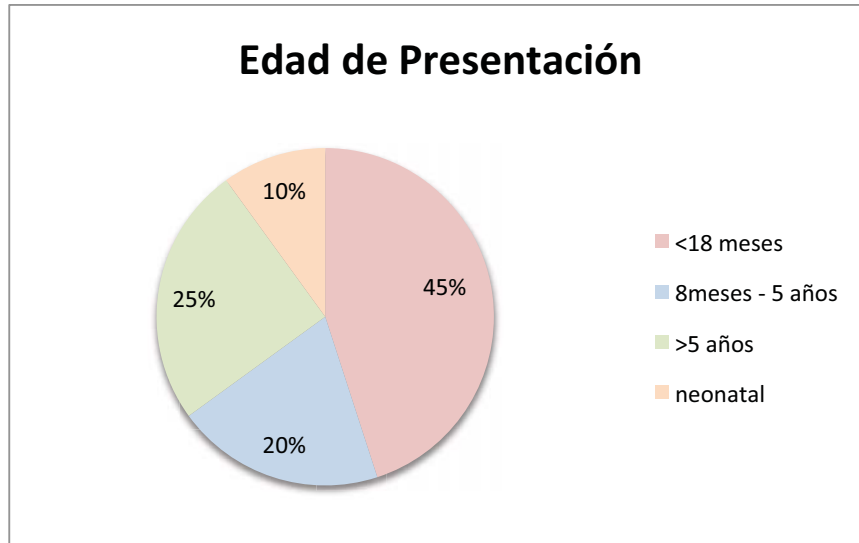
Frecuencias por genotipo para el SNP -251 (A>T) del gen <i>IL-8</i>				
Genotipo	Número de pacientes n=20	Frecuencia %	Individuos sanos n=20	Frecuencia %
AA	2	10 %	2	10 %
AT	12	60 %	4	20 %
TT	6	30 %	14	70 %

Tabla 4: Frecuencias por alelo del SNP -251 (A/T) del gen *IL-8*

Frecuencias alélicas para el SNP -251 (A>T) del gen <i>IL-8</i>				
Alelo	Número de alelos n=40	Frecuencia %	Individuos sanos n=40	Frecuencia %
A	16	40 %	8	20 %
T	24	60 %	32	80 %

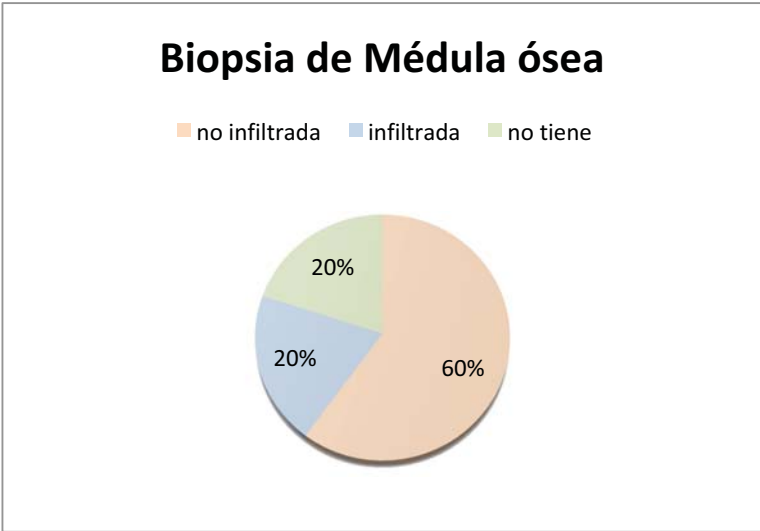
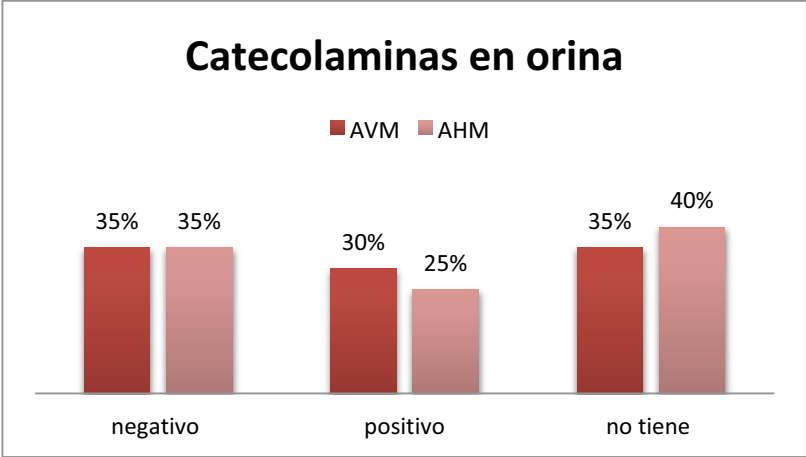
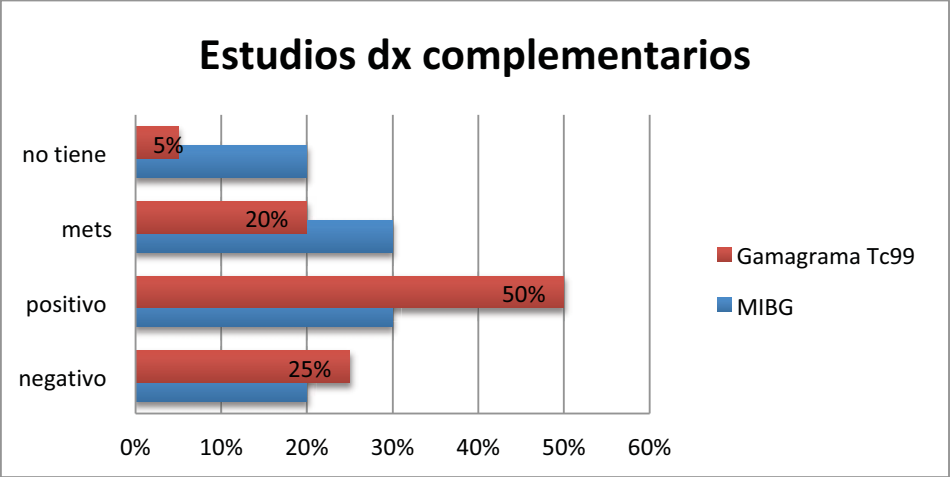
CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Entre Diciembre de 2014 y Marzo de 2018 se reclutaron un total de 20 pacientes con diagnóstico de Neuroblastoma en el HIMFG a quienes se les realizó prueba para identificar el polimorfismo -251 (A/T) del gen de IL-8. El grupo de edad en el cual se presentó con mayor frecuencia fue en menores de 18 meses representando un 45% de los casos, seguido de los mayores de 5 años en un 25%. En cuanto al género, se vieron afectados de forma más frecuente las mujeres con 12 casos de 20 (60%) en contraste con 8 casos de 20 (40%) en el género masculino. El sitio primario más frecuente fue glándulas suprarrenales (40%), retroperitoneo (30%), paraespinal (15%), mediastinal (10%) y abdomino pélvico (5%) de los casos.



En cuanto a su presentación clínica, el 50% de los casos debutaron con tumores metastásicos al diagnóstico, de los cuales únicamente el 25% presentaron algunos de los síndromes paraneoplásicos mencionados anteriormente. Las anomalías más frecuentemente encontradas en la BH fueron anemia (38%) y trombocitosis (37%) por el contrario 12 de 20 (60%) pacientes tuvieron un BH normal al diagnóstico.

Como parte del abordaje diagnóstico, se realizaron los siguientes estudios:

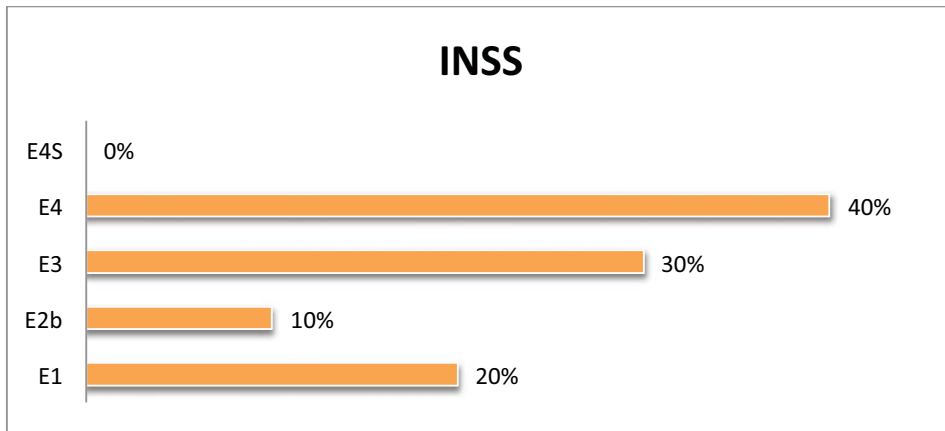


De acuerdo al grado de diferenciación reportado en las muestras de nuestros pacientes, los NB se distribuyen de la siguiente manera:

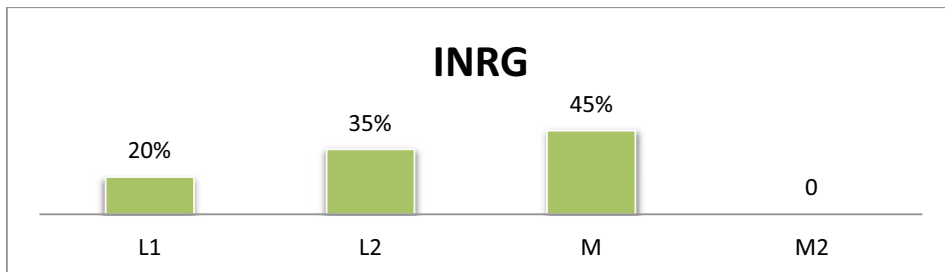
Indiferenciado	3	15%
Poco diferenciado en diferenciación	9	45%
diferenciado	3	15%
no especificado	2	10%
maduro	0	0%

De acuerdo a los factores de riesgo estudiados en nuestra población, se observó un índice de mitosis cariorrexis (MKI) bajo en 5 pacientes (35%), moderado en 4 pacientes (20%) y no especificado en 11 pacientes (55%). En cuanto a la amplificación N-myc se realizó únicamente en un paciente (5%) en el cual no se encontró dicha amplificación.

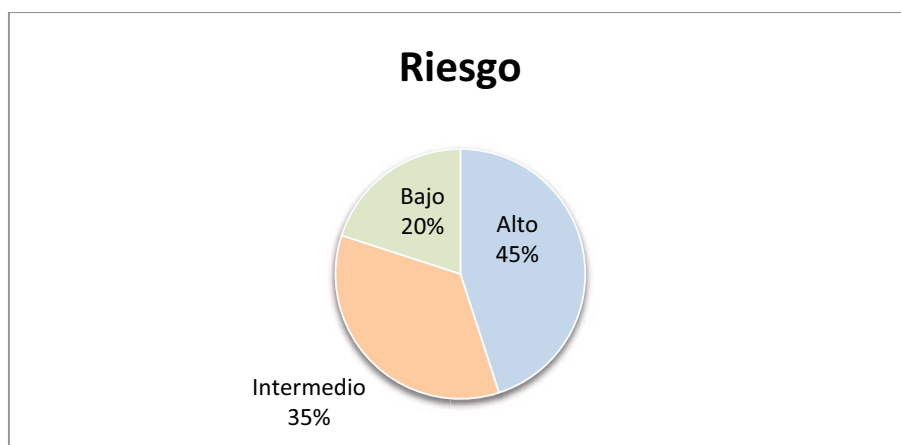
La estadificación de los pacientes se realizó basándose en la evaluación clínica, radiográfica y quirúrgica. Los 3 factores pronósticos clínicos principales son la edad al diagnóstico, es estadio de la enfermedad y la histología. Los estadios que se encontraron en nuestra población con respecto al INSS fueron 8 casos estadio E4 (40%), 6 casos estado E3 (30%), 4 casos estadio E1 (20%) y 2 casos estadio E2b (10%).



En cuanto a la clasificación INRG 9 casos (45%) fueron metastásicos, 7 casos (35%) fueron tumores locorreionales y 4 casos (20%) fueron tumores localizados.



En el HIMFG se emplea un esquema de quimioterapia basado en los protocolos del POG 8104 y 8441 para etapas 1-2 y 3-4 respectivamente. De acuerdo a la evaluación de nuestra población 9 de 20 pacientes (45%) recibieron tratamiento de alto riesgo, 7 de 20 (35%) tratamiento de riesgo intermedio y 4 de 20 (20%) tratamiento para bajo riesgo.



En cuanto al tratamiento neoadyuvante que recibió nuestra población, 15 de 20 pacientes (75%) recibieron quimioterapia neoadyuvante presentando toxicidad por la misma en 12 casos representando el 60% de los niños por lo que se requirió realizar ajuste en dosis de quimioterapia de acuerdo a la edad y peso en 8 de 20 pacientes (40%). La respuesta a la quimioterapia neoadyuvante se registró de la siguiente manera:

Respuesta a quimioterapia neoadyuvante

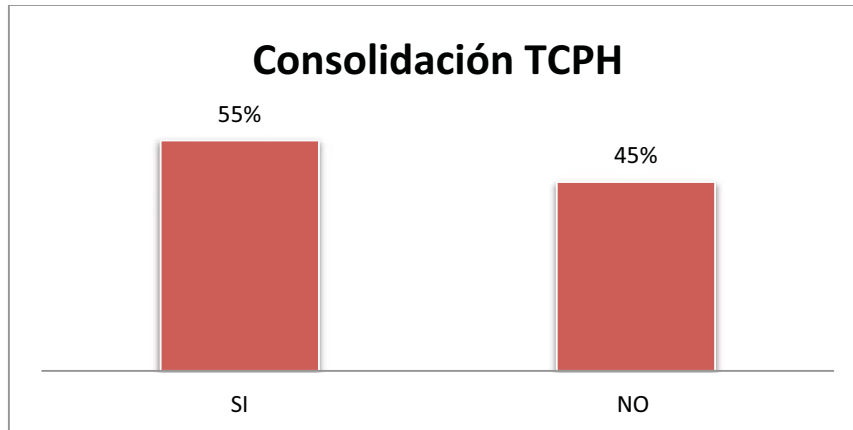
CR	2
VGPR	0
PR	8
MR	2
SD	2
PD	0
No evaluado	1
Sin QT neoadyuvante	5

Posterior a la terapia neoadyuvante, 14 de 20 pacientes (70%) requirieron continuar tratamiento con quimioterapia adyuvante, por el lado contrario 6 pacientes de 20 (30%) recibieron únicamente terapia neoadyuvante. De los pacientes que continuaron con quimioterapia adyuvante el 55% presentó toxicidad asociada. La respuesta a quimioterapia adyuvante fue de la siguiente manera:

Respuesta a quimioterapia adyuvante

CR	6
VGPR	2
PR	2
MR	2
SD	0
PD	2
No evaluado	2
Sin QT adyuvante	6

De los 9 de 20 pacientes que recibieron el protocolo de alto riesgo (45%), 5 de ellos (55%) recibieron terapia de consolidación con trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas y posteriormente 4 de 5 (80%) continuaron con tratamiento post consolidación con ácido 13 cis retinoico por un lapso de 6 meses posterior al trasplante.



Los casos de neuroblastoma de bajo riesgo representan el 20% con un total de 4 casos. Los cuatro pacientes actualmente se encuentran en vigilancia posterior a resección completa del tumor primario. Dos de los cuatro casos al diagnóstico presentaron asociación con síndrome de Kinsbourne, su histología fue de Neuroblastoma 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). 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.

En ninguno de los 20 pacientes se documentó enfermedad refractaria a tratamiento y hasta el momento sólo 1 de 20 pacientes (5%) presentó recaída de la enfermedad ameritando tratamiento de segunda línea.

En cuanto al estado actual de los pacientes de este estudio, 12 de 20 (60%) se encuentran en vigilancia, 6 de 20 (30%) continúan recibiendo tratamiento y dos (10%) fallecieron por cuadro de choque séptico y choque hemorrágico. Durante el periodo de vigilancia, se registró una segunda neoplasia en 1 de 20 pacientes (5%) quien presentó Leucemia aguda linfoblástica actualmente en tratamiento de mantenimiento.

Estado actual de la población de estudio

Vivo sin enfermedad	12	60%
vivo con enfermedad	6	30%
muerto con enfermedad	2	10%
muerto por progresión	0	0%
muerto sin enfermedad	0	0%

XI. DISCUSIÓN

Estudios previos han mostrado asociación del SNP -251 (A/T) como factor pronóstico en pacientes con Neuroblastoma. En nuestro estudio los pacientes analizados presentaron alta frecuencia de alelo T (60%) el cual ha sido asociado con mal pronóstico, niveles elevados de IL-8 en suero y progresión del Neuroblastoma. Al analizar esta frecuencia con los estadios de cada paciente se observó una diferencia entre el genotipo de -251 (A>T) y la estadificación de riesgo (alto, intermedio y bajo riesgo) ya que más del 50% de todos los pacientes con Neuroblastoma presentaron al menos un alelo T, sin embargo es importante mencionar que únicamente el 10% de los pacientes analizados presentó el genotipo AA el cual ha sido asociado con mejor pronóstico, mejores tasas de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Es de crucial importancia 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 que presenta el paciente al momento de hacer el diagnóstico.

Por otro lado al analizar las frecuencias de genotipos para el SNP-251 (A>T) 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. El 60% de los pacientes con Neuroblastoma presentaron el genotipo AT en comparación con 20% en población sana, la frecuencia para este genotipo concuerda con la reportada por Lagmay y cols (57.3% para AT) en un estudio realizado en 96 pacientes con Neuroblastoma. Además en la cohorte de pacientes analizada encontramos únicamente el 10% de pacientes con genotipo AA con la misma proporción para la población sana. Esta relación se observó claramente en el análisis de frecuencias por alelo ya que los pacientes con Neuroblastoma presentaron una frecuencia de 70% para el alelo T en comparación con los individuos sanos en los que se presentó una frecuencia del 30%, estos nos indica que este puede ser un posible biomarcador de riesgo a Neuroblastoma en población mexicana.

El presente es el primer estudio en analizar frecuencias de los SNP's de IL-8 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. Podemos observar que se muestran diferencias considerables tanto en las frecuencias reportadas por alelos y por genotipos, lo cual puede ser un factor importante para el desarrollo y progresión de la enfermedad. Por lo tanto, como parte del seguimiento de este trabajo de investigación, es necesario continuar con el análisis del polimorfismo -251 (A/T) en población mexicana con Neuroblastoma incluyendo una mayor cantidad de pacientes, además de analizar los niveles séricos y tisulares de IL-8. Dentro de los métodos propuestos por diversas series internacionales para la estandarización de los factores pronóstico para neuroblastoma, es importante incorporar a nuestros criterios diversas técnicas de medicina molecular que nos permita identificar la amplificación N-myc para poder establecer el papel pronóstico de estos polimorfismos y comparar nuestros resultados de forma más precisa con lo publicado en series internacionales y así estandarizar un nuevo criterio de estadificación de riesgo para los pacientes con Neuroblastoma.

XII. CONCLUSIÓN

- Se estandarizaron las condiciones metodológicas necesarias para la genotipificación del polimorfismo -251 IL-8 (A>T).
- El alelo T del SNP -251 IL-8 (A>T) se presentó con mayor frecuencia en pacientes con Neuroblastoma que en individuos sanos representando un 60% de los casos.
- Probablemente el alelo T del SNP -251 IL-8 (A>T) puede tener un rol importante en el desarrollo y progresión del Neuroblastoma, como posible biomarcador de mal pronóstico.
- Es necesario incluir un mayor cantidad de pacientes para determinar el impacto pronostico de los polimorfismos -251 IL-8 (A>T).

XIII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

Fecha	Actividad
Octubre a Diciembre 2017	Establecer Metodología
Enero a Marzo de 2018	Revisión de expedientes
Abril a Mayo 2018	Análisis de Resultados
Junio 2018	Entrega de tesis

XIV. ANEXOS.

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

TITULO DEL ESTUDIO:

“Asociación de los polimorfismos -251 IL-8 (A>T) 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 2018 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:T

"Asociación de los polimorfismos -251 IL-8 (A>C) 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 _____, 2018 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

XV. BIBLIOGRAFIA.

1. Navalkele P, O'Dorisio MS, O'Dorisio TM, Zamba GK, Lynch CF. Incidence, survival, and prevalence of neuroendocrine tumors versus neuroblastoma in children and young adults: nine standard SEER registries, 1975-2006. *Pediatr Blood Cancer*. 2011 Jan;56(1):50-7
2. Palma Padilla V, Juárez Ocaña, González Miranda G. Incidencia y tendencia del Neuroblastoma en niños derechohabientes del IMSS. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2010; 48 (2): 151-158.
3. 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
4. Brodeur GM, Hogarty MD, Mosse YP, Neuroblastoma. In: Poplack DG, Pizzo PA, editors. *Principles and Practice of pediatric oncology*, 6th edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins;2011: 886-922.
5. Wen Guang H, Yu Yan, Wen Tang. Clinical and biological features of neuroblastic tumors: A comparison of neuroblastoma and ganglioneuroblastoma. *Oncotarget* 2017; 8(23): 37730- 37739.
6. 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
7. Ward E, Desantis C, Robbins A, et al. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64(2):83–103
8. Heck , J E, Hung , R J and Ritz, B. *The epidemiology of neuroblastoma: a review*. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2009; 23:125–143.
9. Deyell RJ, Attiyeh EF. Advances in the understanding of constitutional and somatic genomic alterations in neuroblastoma. *Cancer Genet* 2011;204(3):113–121.
10. Friedman DL, Kadan-Lottick NS, Whitton J, et al. Increased risk of cancer among siblings of long-term childhood cancer survivors: a report from the childhood cancer survivor study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(8):1922–1927.
11. Chen Y, Takita J, Choi YL, et al. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 2008;455(7215):971–974.
12. Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D, et al. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 2004;75(4):727–730
13. Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, et al. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 2004;74(4):761–764.
14. Deyell RJ, Attiyeh EF. Advances in the understanding of constitutional and somatic genomic alterations in neuroblastoma. *Cancer Genet* 2011;204(3):113–121.
15. Satge D, Moore SW, Stiller CA, et al. Abnormal constitutional karyotypes in patients with neuroblastoma: a report of four new cases and review of 47 others in the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;147(2):89–98.
16. Brodeur GM, Ambros PF, Favrot MC. Biological aspects of neuroblastoma screening. *Med Pediatr Oncol* 1998;31:394–400.
17. Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, et al. Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2009;27(7):1026–1033.
18. Vandesompele J, Baudis M, De Preter K, et al. Unequivocal delineation of clinicogenetic subgroups and development of a new model for improved outcome prediction in neuroblastoma. *J Clini Oncol* 2005;23(10):2280–2299.
19. Schneiderman J, London WB, Brodeur GM, Castleberry RP, Look AT, Cohn SL. Clinical significance of MYCN amplification and ploidy in favorable-stage neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2008 Feb 20;26(6):913-8.
20. Bagatell R, Rumcheva P, London WB, Cohn SL, Look AT, Brodeur GM, Frantz C, Joshi V, Thorner P, Rao PV, Castleberry R, Bowman LC. Outcomes of children with intermediate-risk neuroblastoma after treatment stratified by MYCN status and tumor cell ploidy. *J Clin Oncol*. 2005 Dec 1;23(34):8819-27.
21. George RE, London WB, Cohn SL, Maris JM, Kretschmar C, Diller L, Brodeur GM, Castleberry RP, Look AT. Hyperdiploidy plus nonamplified MYCN confers a favorable

- prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 20;23(27):6466-73.
22. Irwin Meredith S, Park Julioe R., Neuroblastoma. Paradigm for Precision Medicine, *Pediatr Clin N Am* 2015; 62: 225-256.
 23. Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3(10):a014415
 24. Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, et al. Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2009;27(7):1026–33
 25. Schleiermacher G, Mosseri V, London WB, et al. Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project. *Br J Cancer* 2012;107(8):1418–22.
 26. Redden RA, Iyer R, Brodeur GM, Doolin EJ. Rotary bioreactor culture can discern specific behavior phenotypes in Trk-null and Trk-expressing Neuroblastoma cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2014 Mar;50(3):188-93.
 27. Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Varela CR, Light JE, Kolla V, Evans AE. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res*. 2009 May 15;15(10):3244-50.
 28. Schramm A, Schulte JH, Astrahantseff K, Apostolov O, Limpt Vv, Sieverts H, Kuhfittig-Kulle S, Pfeiffer P, Versteeg R, Eggert A. Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2005 Oct 18;228(1-2):143-53.
 29. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003;3(3):203–216
 30. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, et al. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol* 1994;14(1):759–767.
 31. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, et al. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983;305(5931):245–248.
 32. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, et al. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*
 33. Fernandez PC, Frank SR, Wang L, et al. Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 2003;17(9):1115–1129.
 34. Cohn SL, London WB, Huang D, et al. MYCN expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with nonamplified MYCN. *J Clin Oncol* 2000;18(21):3604–3613.
 35. Carpenter EL, Mosse YP. Targeting ALK in neuroblastoma-preclinical and clinical advancements. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9(7):391–399.
 36. Chen Y, Takita J, Choi YL, et al. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 2008;455(7215):971–974.
 37. Islam A, Kageyama H, Takada N, et al. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 2000;19(5):617–623.
 38. Caron H, van Sluis P, de Kraker J, et al. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 1996;334(4):225–230.
 39. Maris JM, Weiss MJ, Guo C, et al. Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol* 2000;18(9):1888–1899.
 40. Shimada H, Chatten J, Newton WA Jr, et al. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:405–413.
 41. McConville CM, Forsyth J. Neuroblastoma - a developmental perspective. *Cancer Lett*. 2003 Jul 18;197(1-2):3-9. Review
 42. Hayward K, Jeremy RJ, Jenkins S, et al. Long-term neurobehavioral outcomes in children with neuroblastoma and opsoclonus-myooclonus-ataxia syndrome: relationship to MRI findings and anti-neuronal antibodies. *J Pediatr* 2001;139(4):552–559.
 43. Rudnick E, Khakoo Y, Antunes NL, et al. Opsoclonus-myooclonus-ataxia syndrome in neuroblastoma: clinical outcome and antineuronal antibodies-a report from the Children's Cancer Group Study. *Med Pediatr Oncol* 2001;36(6):612–622.

44. El Shafie M, Samuel D, Klippel CH, et al. Intractable diarrhea in children with VIP-secreting ganglioneuroblastomas. *J Pediatr Surg* 1983;18:34–36
45. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al. Revisions in the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993;11:1466–1477.
46. Kushner BH, Kramer K, LaQuaglia MP, et al. Neuroblastoma in adolescents and adults: the Memorial Sloan-Kettering experience. *Med Pediatr Oncol* 2003;41(6):508–515.
47. Monsaingeon M, Perel Y, Simonnet G, et al. Comparative values of catecholamines and metabolites for the diagnosis of neuroblastoma. *Eur J Pediatr* 2003;162(6):397–402.
48. Cohn SL, Pearson AD, London WB, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009;27(2):289–297.
49. O. Vo KT, Matthay KK, Neuhaus J, et al. Clinical, biological and prognostic differences based on primary tumor site in neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) project. *J Clin Oncol* 2014;32(28):3169–76.
50. George RE, Perez-Atayde AR, Yao X, London WB, Shamberger RC, Neuberg D, Diller L. Tumor histology during induction therapy in patients with high-risk neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2012 Sep;59(3):506-10
51. Kushner , B and Cohn , S L. N Cheung and S Cohn .Treatment of Neuroblastoma. In *Neuroblastoma*. Berlin : s.n., 2005, Springer-Verlag, pp. 124-138.
52. Kretschmar, C S, Kletzel , M and Murray, K. Response to paclitaxel, topotecan, and topotecan-cyclophosphamide in children with untreated disseminated neuroblastoma treated in an upfront phase II investigational window: a Pediatric Oncology Group study. 22, 2004, *J Clin Oncol*, pp. 4119–4126
53. Frantz , C N, London , W B and Diller , L. Recurrent neuroblastoma: randomized treatment with topotecan + cyclophosphamide (T+C) vs. topotecan alone(T). A POG/CCG Intergroup Study. 2004.ASCO Annual Meeting,. Abstract no. 8512.
54. Bagatell , R, Wagner, L M and Cohn , S L. Irinotecan plus temozolomide in children with recurrent or refractory neuroblastoma: a phase II Children's Oncology Group study. 27, 2009, *J Clin Oncol*, p. 10011.
55. Kushner , B H, Kramer , K and LaQuaglia MP, M P. Curability of recurrent disseminated disease after surgery alone for local-regional neuroblastoma using intensive chemotherapy and anti-G(D2) immunotherapy. 25, 2003, *J Pediatr Hematol Oncol*, pp. 515–519.
56. Perez, C A, Matthay , K K and Atkinson, J B. Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a Children's Cancer Group study. 18, 2000, *J Clin Oncol*, pp. 18–26.
57. Strother , D R, London , W B and Schmidt , M L. Surgery alone or followed by chemotherapy for patients with stages 2A and 2B neuroblastoma: results of Children's Oncology Group Study. Los Angeles 2006. *Advances in Neuroblastoma Research 2006*
58. Perinatal neuroblastoma. Nuchtern , J G. 15, 2006, *Semin Pediatr Surg*, pp. 10–16.
59. Baker, D L, Schmidt , M and Cohn , S. A phase III trial of biologically-based therapy reduction for intermediate risk neuroblastoma. 25, 2007, *J Clin Oncol*, p. 9504
60. Ladenstein, R, Philip , T and Lasset , C. Multivariate analysis of risk factors in stage 4 neuroblastoma patients over the age of one year treated with megatherapy and stem-cell transplantation: a report from the European Bone Marrow Transplantation Solid Tumor Registry. 16, 1998, *J Clin Oncol* , pp. 953–965.
61. Matthay , K K and Castleberry , R P. [ed.] G M Brodeur , T Sawada and Y Tsuchida Treatment of advanced neuroblastoma: the U.S. experience. *Neuroblastoma*. Amsterdam 2000, The Netherlands: Elsevier Science B.V., pp. 417–436.
62. 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.
63. Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Curr Pharm Des*. 2012;18(26):3831-52.
64. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454 (7203):428-35.
65. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of old flame. *Cell* 2010; 19-40 (6):771-6.
66. Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4, 540-550

67. Koizumi, K., Hojo, S., Akashi, T., Yasumoto, K., and Saiki, I. (2007). Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Sci* 98, 1652-1658.
68. De Larco, J.E., Wuertz, B.R., Rosner, K.A., Erickson, S.A., Gamache, D.E., Manivel, J.C., and Furcht, L.T. (2001). A potential role for interleukin-8 in the metastatic phenotype of breast carcinoma cells. *Am J Pathol* 158, 639-646.
69. Fernandez, E.J., and Lolis, E. (2002). Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 469-499.
70. Gales, D., Clark, C., Manne, U., and Samuel, T. (2013). The Chemokine CXCL8 in Carcinogenesis and Drug Response. *ISRN Oncol* 2013, 859154.
71. Waugh, D.J., and Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 14, 6735-6741.
72. Xie, K. (2001). Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 375-391.
73. Martin, D., Galisteo, R., and Gutkind, J.S. (2009). CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. *J Biol Chem* 284, 6038-6042.
74. Qazi, B.S., Tang, K., and Qazi, A. (2011). Recent advances in underlying pathologies provide insight into interleukin-8 expression-mediated inflammation and angiogenesis. *Int J Inflam* 2011, 908468.
75. Matsuo, Y., Takeyama, H., and Guha, S. (2012). Cytokine network: new targeted therapy for pancreatic cancer. *Curr Pharm Des* 18, 2416-2419.
76. Todorovic-Rakovic, N., and Milovanovic, J. (2013). Interleukin-8 in breast cancer progression. *J Interferon Cytokine Res* 33, 563-570.
77. Waugh, D.J., and Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 14, 6735-6741.
78. Xie, K. (2001). Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 375-391