



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



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UMAE HOSPITAL DE PEDIATRIA
"DR SILVESTRE FRENK FREUND"
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

**P53 POR INMUNOHISTOQUIMICA EN TUMOR DE WILMS CORRELACIONADO COMO
FACTOR DE MAL PRONOSTICO EN PACIENTES PEDIATRICOS**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN PEDIATRIA

PRESENTA

Dr. Jesús Mario Cárdenas Ocón
Residente del tercer año de Pediatría

TUTORES DE TESIS

Dra. Yadira Betanzos Cabrera
Servicio de Oncología

Dr. Horacio Márquez González
Asesor Metodológico
Cardiólogo Pediatra

INVESTIGADORES ASOCIADOS

Dr. Marco Antonio Rodríguez Florido
Servicio de Patología

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Título del proyecto:

**P53 POR INMUNOHISTOQUIMICA EN TUMOR DE WILMS CORRELACIONADO COMO
FACTO DE MAL PRONOSTICO EN PACIENTES PEDIATRICOS**

HOJA DE RECOLECCIÓN DE FIRMAS

Nombre	Cargo	Firma
Dra. Abigail Hernández Cabezza	Encargada de la División de Educación e Investigación en Salud UMAE Hospital de Pediatría CMN SXXI	
Dr. Leoncio Peregrino Bejarano	Profesor Titular del Curso de Especialización en Pediatría UMAE Hospital de Pediatría CMN SXXI	
Dra. Yadira Betanzos Cabrera	Médico adscrito del servicio de Oncología Pediátrica UMAE Hospital de Pediatría CMN SXXI	
Dr. Horacio Márquez González	Asesor metodológico	

Información de los Investigadores

Dr. Jesús Mario Cárdenas Ocón
Investigador principal
Residente del tercer año de Pediatría
Email: jmco_260292@hotmail.com
Teléfono: 834 100 48 63

Dra. Yadira Betanzos Cabrera
Tutora de tesis
Médico adscrito al servicio de oncología
Email: yadirabc_77@hotmail.com
Teléfono. 55 562769 00 extensión 22499/22500

Dr. Horacio Márquez González
Asesor metodológico
Email: horaciohimfg@gmail.com
Teléfono: 55 3754 15 62

Dr. Marco Antonio Rodríguez Florido
Servicio de Patología
Teléfono: 55 56275900 extensión 22350

Índice

Agradecimientos	5
Resumen	6
Antecedentes	7-14
Justificación	15
Planteamiento del Problema	16
Pregunta de Investigación	16
Hipótesis	16
Objetivo	16
Material y Métodos	17
Tipo de estudio	17
Diseño de estudio	17
Población de estudio	17
Criterios de inclusión y exclusión	18
Desarrollo del estudio	18
Cálculo de tamaño de muestra	19
Plan de análisis estadístico	19
Definición y clasificación de las variables	20
Factibilidad y recursos financieros	21
Aspectos éticos	21
Procedimientos	22-23
Cronograma de actividades	24
Anexos	25
Resultados	26-30
Discusión	31-32
Conclusión	33
Bibliografía	34-38

Agradecimientos

Principalmente a Dios por permitirme estar en este momento de mi vida, por siempre darme la fuerza para seguir adelante y por darme la bendición de poner en mi vida a las mejores personas para poder sobrellevar este camino de la mejor manera.

A mi compañera de vida, mi esposa, por siempre ser mi más grande apoyo en este camino que decidimos emprender, por siempre tener palabras de aliento para mi y por motivarme día a día para ser mejor persona y mejor profesionalista; por ayudarme día y noche a seguir adelante a pesar de las dificultades que se han presentado y por ser mi más grande motivación y mi más fuerte pilar.

A mis padres y hermano por todo el apoyo que me han dado durante toda mi vida, por todo el sacrificio hecho para que pueda cumplir mi sueño. Eternamente agradecido con ellos porque son el mayor ejemplo de que todo lo que te propones lo puedes cumplir.

A mis profesores que desde el primer día de mi residencia me impulsaron a ser mejor y me dieron las herramientas para lograrlo. A la Dra. Yadira Betanzos por confiar en mi para este gran proyecto y por apoyarme para realizarlo; al Dr. Horacio Márquez por todos sus consejos y herramientas para lograr llevar a cabo la presente tesis; al Dr. Miguel Ángel Villasis por todas sus clases impartidas, por todos sus consejos y por siempre estar motivándonos a seguir adelante con los proyectos que emprendimos. Al Dr. Leoncio Peregrino por ser un gran líder, por enseñarnos a amar lo que hacemos, a ser grandes pediatras y mejores seres humanos y por siempre motivarnos a nunca rendirnos y cumplir nuestras metas.

P53 por inmunohistoquímica en tumor de Wilms correlacionado como factor de mal pronóstico en pacientes pediátricos

Antecedentes: El tumor de Wilms (TW) es la neoplasia renal más frecuente en la edad pediátrica, representa un tercio del cáncer infantil, más frecuente en el sexo femenino con una proporción 0.8/1, asintomático, de etiología desconocida en la mayoría de los casos, sin embargo, en 5 % de los pacientes se identifica una mutación genética: alteraciones del cromosoma 11, alteración del gen GPC3 y alteración del p53, entre otras. Se considera una neoplasia embrionaria, histológicamente 3 tipos celulares (blastemal, estromal y epitelial) es bifásica o trifásica dependiendo de su contenido de la estirpe histológica. Los factores pronósticos más importantes continúan siendo la histología y el estadio. El gen p53 considerado el guardián del genoma, es el gen más frecuentemente mutado en los cánceres humanos, en más de un 50% de los tumores produciéndose una proteína alterada. El papel de la expresión de p53 en el TW todavía no es muy claro, pero muchos estudios han confirmado su vinculación con anaplasia y estadios avanzados de la enfermedad, lo cual confiere un mal pronóstico pese que este tumor tiene una supervivencia global del 95%. La identificación de estos cambios genéticos puede redefinir los criterios para el diagnóstico del cáncer y abrir nuevas posibilidades para su detección y tratamiento precoz e individualizado.

Objetivo: Determinar la supervivencia global y libre de enfermedad de aquellos pacientes con diagnóstico de tumor de Wilms de acuerdo a la expresión del marcador tumoral p53 por inmunohistoquímica.

Material y métodos: Estudio de casos y controles anidados en una cohorte. Se incluyeron a todos los pacientes con diagnóstico de certeza por patología de TW atendidos en la UMAE Hospital de pediatría del Centro Médico Nacional SXXI, desde el 1° de Enero del 2009 al 31° de Enero del 2017, edad entre 1 y 17 años, diagnosticados de primera vez en esta institución sin tratamiento al momento del diagnóstico y que contaran con la muestra de parafina suficiente para realizar la tinción por inmunohistoquímica.

Análisis estadístico: Para la estadística descriptiva, se realizó medidas de tendencia central (media, mediana y moda) y dispersión para variables cuantitativas (curvas de tendencia central). Para las variables nominales y ordinales se calcularon frecuencias. Se calculó el riesgo relativo o razón de riesgos (RR), para buscar asociaciones entre dos variables de carácter cualitativo (dicotómicas) y Chi cuadrada (estadística no paramétrica). Para las curvas de supervivencia global y libre de enfermedad se usó método Kaplan y Meier.

Resultados: Se incluyeron 44 pacientes de los cuales 43% eran preescolares, con predominio del sexo femenino con una proporción 1.9:1. En cuanto a la estirpe histológico el más frecuente fue el blastemal en 40 pacientes (50.6%) y anaplasia en 8 pacientes (10.1%). 10 pacientes (22.8%) se encontraron en Estadio III y 24 pacientes (54.5%) se encontraron en Estadio IV al momento del diagnóstico. De los 44 pacientes que tuvieron P53 positivo 21 (47.7%) tuvieron una supervivencia a 36 meses de 70%. La supervivencia libre de enfermedad en pacientes con estirpe anaplasica 8(10.1%) fue del 30% $p=0.05$. 6 pacientes presentaron anaplasia y P53 positivo, de los cuales todos fallecieron en un seguimiento de 36 meses.

Conclusiones: La realización de la determinación de P53 en pacientes con anaplasia es una opción para complementación diagnóstica en paciente con Tumor de Wilms de histología desfavorable. Es indispensable continuar realizando estudios multicentricos que nos permitan obtener un mejor tamaño de muestra.

P53 por inmunohistoquímica en tumor de Wilms correlacionado como factor de mal pronóstico en pacientes pediátricos

Antecedentes

El tumor de Wilms (TW) es la neoplasia renal más frecuente en la edad pediátrica, representa un tercio de las neoplasias embrionarias en los niños. A nivel internacional constituye el 6 a 7% de las neoplasias infantiles.¹⁻⁴ En Estados Unidos de América ocurre en 1 de cada 250 000 niños, la incidencia total fue estimada alrededor de 500 casos por año, 80% de los casos se presentan antes de los 5 años, y rara vez aparece después de los 8 años. Discretamente más frecuente en niños que en niñas siendo la proporción entre 0.8/1². Cuando se diagnostica el TW 80% de los niños son menores de cinco años.^{2,4}. En series de Europa y EUA las tasas más altas se presentan en los menores de 5 años de edad (10-20 x 10⁶).^{5,6}

Generalmente es asintomático y se detecta en pacientes de manera incidental como una masa abdominal palpable no dolorosa que condiciona distensión abdominal detectada por los cuidadores primarios durante el baño o al cambiarlos de ropa o pañal. Las manifestaciones clínicas más frecuentes incluyen: masa abdominal palpable (75%), dolor abdominal (28%), hipertensión (26%), hematuria microscópica (24%), fiebre (22%) y hematuria macroscópica (18%).³

La etiología es desconocida en la mayoría de los casos, sin embargo en 5 % de los pacientes se identifica una mutación genética: estas pueden estar relacionadas a tres mutaciones principales: asociados a alteraciones del cromosoma 11 - mutación del gen WT1 (11p13) que incluyen Síndrome de WAGR (aniridia, malformaciones genitourinarias, retraso mental y Tumor de Wilms), Síndrome de Denys- Drash (pseudohermafroditismo, enfermedad degenerativa renal y Tumor de Wilms) – mutación del gen WT2 (11P15) se asocia con hemihipertrofia, así como síndrome de Beckwith–Wiedemann.

Alteración del gen GPC3 (Síndrome de Simpson–Golabi-Behmel) y alteración del p53 (Síndrome de Li-Fraumeni). Así mismo se han presentado de manera aislada alteración del gen NF1 (Neurofibromatosis), alteración del NSD1 (Síndrome de Sotos) y alteración del gen BLM (Síndrome de Bloom), así como de los pacientes con Síndrome de Perlman cuya alteración genética no es bien conocida del cual entre 1-3% de los pacientes presentan tumor de Wilms familiar.

Se considera una neoplasia embrionaria, derivado del blastema metanéfrico (Nefroblastoma), es una masa bien definida, de apariencia hemorrágica de tamaño variable. Los factores pronósticos más importantes para el tumor de Wilms actualmente siguen siendo la histología y el estadio de la enfermedad al diagnóstico. Respecto a la histología consta de dos tipos: la clásica o favorable; compuesta por 3 tipos celulares (trifásico), con predominio siempre de algunos de ellos (el blastemal el cual se caracteriza por ser muy invasiva en estadios avanzados pero muy quimiosensible, el epitelial que se relaciona con quimiorresistencia en estadios tempranos y el estromal). Una pequeña porción aproximadamente el 8% de los TW presenta anaplasia, la constituyen células con marcada atipia nuclear, siendo un marcador importante en la resistencia a la quimioterapia pero no aumentado la agresividad ni la diseminación, esto es lo que hace distinto a aquellos tumores con cambios anaplásicos de los que son focal (las células atípicas están confinadas en uno solo o en escasos focos localizados en el interior del área tumoral) a los que son difusos (diseminada y se detecta en más del 10% de 400 campos examinados con el microscopio), ya que la distinción entre ambos ha demostrado un pronóstico significativo. En el NWTSG-1 el 66.7% de los pacientes con anaplasia presentaron recaídas.¹⁰

El segundo factor pronóstico más importante en esta patología es el estadio de la enfermedad al diagnóstico; los cuales deben incluir una exploración mediante tomografía computarizada (TC) del abdomen/pelvis y el tórax. La evaluación preoperatoria de la extensión intravascular del tumor de Wilms es imprescindible para guiar el tratamiento. La presencia de trombos tumorales intravenosos, que se encontraron en hasta 11,3% de los casos de tumor de Wilms, pueden llevar a diferencias en su tratamiento.⁷

El estadio se determina de acuerdo con los resultados de los estudios de imagenología, así como con los hallazgos quirúrgicos y patológicos de la nefrectomía, tanto para los tumores con características histológicas favorables o anaplásicas.^{8,9} De acuerdo al National Wilms Tumor Study Group (NWTSG) formuló el sistema de estadificación en 4 estadios. ⁹

Estadio I (43% de los pacientes), tumor limitado al riñón y se resecó por completo, La cápsula renal está intacta, El tumor no se rompió ni se sometió a biopsia antes de la extracción, Los vasos del seno renal no están afectados, no hay prueba del tumor en los márgenes de la resección o más allá de estos). Para que un tumor se califique en estadio I para ciertos protocolos terapéuticos, los ganglios linfáticos regionales se deben examinar con microscopio.

Estadio II (20% de los pacientes), el tumor está resecado por completo y no hay prueba de tumor en o más allá de los márgenes resecados. El tumor se extiende más allá de los riñones como lo muestra cualquiera de los criterios siguientes: (Hay una extensión regional del tumor, es decir, penetración de la cápsula del seno renal o invasión extensa del tejido blando del seno renal, según se explica a continuación: Los vasos sanguíneos dentro de la muestra de nefrectomía fuera del parénquima renal, incluso aquellos del seno renal, contienen tumor).

Estadio III (21% de los pacientes), se encuentra un tumor residual no hematógono limitado al abdomen después de llevarse a cabo una cirugía.

Se puede presentar cualquiera de las siguientes situaciones. (Los ganglios linfáticos dentro del abdomen o la pelvis están afectados por tumor, el tumor penetró la superficie peritoneal, se encuentran implantes tumorales sobre la superficie peritoneal, el tumor macroscópico o microscópico permanece después de la operación, el tumor no es completamente resecable debido a la infiltración local en las estructuras vitales, se produce un derrame del tumor antes o durante la cirugía, el tumor se trata con quimioterapia preoperatoria y se sometió a una biopsia (biopsia con aguja gruesa, biopsia abierta o aspiración con aguja fina) antes de extirparlo.

Estadio IV (11% de los pacientes), se encuentran metástasis hematógenas (pulmones, hígado, hueso, cerebro) o presencia de metástasis ganglionares fuera de la región abdominal. (La presencia de un tumor dentro de la glándula suprarrenal no se interpreta como metástasis y la estadificación depende de todos los otros parámetros de estadificación presentes. Al tumor primario se le debe asignar un estadio local siguiendo los criterios arriba mencionados lo cual determina la terapia local.)

Estadio V y aquellos con predisposición a presentar tumor de Wilms (5% de los pacientes), tumor bilateral en el momento del diagnóstico. Se debe intentar clasificar cada lado según los criterios señalados de manera previa, de acuerdo con el alcance de la enfermedad.¹⁰

El tratamiento depende del estadio de la enfermedad, así como la clasificación del tumor de acuerdo a grupos de riesgo, incluye quimioterapia, cirugía y radioterapia (terapia multimodal).

En base al estadio en que se encuentra la enfermedad se ha asociado la supervivencia de la siguiente manera:

- ✓ Estadio I-II: 100%
- ✓ Estadio III-IV: 80%
- ✓ Estadio V: 50-60%

El tiempo de mortalidad desde el momento del diagnóstico se encuentra en 10-11 meses, mientras que se ha visto que las recurrencias en meses van desde 5 a 23 meses con una media de 12 meses²⁸.

Actualmente uno de los factores pronóstico estudiados, es el gen supresor tumoral p53 se ha encontrado mutado en más del 50% de los cánceres humanos, por lo cual ha atraído el interés de numerosos investigadores.

La capacidad de este para múltiples funciones biológicas puede ser atribuida a su capacidad de actuar como un factor de transcripción, específico para regular la expresión de más de cien objetivos diferentes, y por lo tanto para modular diversos procesos celulares como la apoptosis de células, detención del ciclo celular y de reparación del ADN. Las mutaciones de p53 pueden llevar o bien a la pérdida o cambio de la actividad en sus objetivos intermedios y por lo tanto puede inducir la proliferación celular aberrante, con consiguiente transformación celular maligna

La prevalencia de mutaciones de p53 varía entre tipos de tumores, de un 0 a un 60% en los principales tipos de cáncer y más del 80% en algunos subtipos histológicos. El espectro de las mutaciones de p53 en los cánceres está proporcionando claves sobre la etiología y patogénesis molecular de las neoplasias. Los cánceres con mutaciones en p53 son más agresivos, con mayor capacidad metastásica y a menudo fatales.

Por tanto, la detección de las anomalías de p53 puede revelar aspectos del origen y evolución del cáncer humano. ^{14,15}.

El papel de la expresión de p53 en el TW todavía no es muy claro, pero muchos estudios han confinado su vinculación con anaplasia y estadios avanzados de la enfermedad y algunos estudios han demostrado que la expresión de p53 detectado por inmunohistoquímica en el TW se asocia a enfermedad avanzada y recurrencia. Aunque las mutaciones constitucionales del p53 se relacionan con el síndrome familiar de predisposición a múltiples cánceres o síndrome de Li-Fraumeni no hay una verdadera asociación entre este síndrome y la relativamente alta frecuencia de TW, por otro lado la incidencia de mutaciones de p53 en el TW esporádico es relativamente baja, probablemente menos de 10%: los resultados de algunos estudios sugieren que las alteraciones del p53 en el TW se vinculan con histología anaplásica. ¹⁶

Las mutaciones del gen WT1 se asocian con tumor de Wilms.^{9 18-20}

Chitra L., Paul Thorner, y David Malkin, et al. en el American Journal of Pathology en el año de 1996 concluyeron en un estudio de pronóstico desfavorable para el tumor de Wilms que la detección por inmunohistoquímica de p53 se consideró un indicador de pronóstico fuerte en Tumor de Wilms. Además de contribuir a la malignidad del mismo y la progresión del tumor, en especial la proteína p53 de tipo salvaje, considerando que también puede estar involucrada en eventos previos de tumorigénesis en pacientes con Tumor de Wilms.

Nayaran y cols 2012 realizaron un estudio de 20 casos de TW donde determinaron la expresión de marcadores de proliferación tumoral como ki67, además de P53 por inmunohistoquímica, no encontrando con esta última significancia estadística entre la estirpe histológica y la expresión del gen.

De León Bojorge y colaboradores en el año 2000 realizaron un estudio en el que se incluyeron 207 pacientes con diagnóstico confirmado por histopatología de tumor de Wilms en el cual se concluyó que los pacientes con anaplasia expresaron p53 en un 86%, mientras que en histología favorable se expresaron en menos del 1%. La expresión de dicho gen se asoció con mal pronóstico: los pacientes sin expresión de p53 tiene una supervivencia del 90%, mientras que en los pacientes con expresión del gen se reduce a 50%²⁷.

Se realizó un estudio en Valencia en el año 2018 por Rodríguez Iglesias, Serrano Durbá y colaboradores donde se encontró que de acuerdo al tipo de histología que presentará el tumor de Wilms, el riesgo de recurrencia en anaplasia era del 50%, mientras que en histología favorable solamente del 15%. En base a la mortalidad, no se evidenció diferencia considerable, con un 50% de mortalidad en anaplasia, contra un 47% en histología favorable²⁸.

Para determinar la significancia de la expresión de p53 en diferentes estadios del tumor de Wilms, 1996 Chitra y colaboradores, estudiaron 28 pacientes en los que en bloques de parafina por inmunohistoquímica se detectó tanto el p53 como el mutado por Western blot. La positividad de los mismos fue mayor para los tumores metastásicos y recurrentes en comparación con los tumores primarios. La pérdida de la proteína p53 o la mutación de p53 son indicativos de progresión y sirven como un marcador de pronóstico desfavorable en una amplia variedad de tumores.

La diferencia en la detección por inmunohistoquímica de p53 en tumor de Wilms entre los no recurrentes - no metastásicos y los recurrentes - metastásicos es estadísticamente significativa con una chi cuadrada que evidencia una $p < 0.01$. (21)

Farzaneh y colaboradores en el 2011; Al comparar la expresión de p53 con la histología, en el estudio llamado Immunohistochemical Detection of p53 Protein Expression as a Prognostic Factor in Wilms Tumor demostraron que los tumores con histología desfavorable mostraron fuerte positividad para p53 con una ($p < 0,001$). El porcentaje de células tumorales positivas para p53 correlacionó significativamente con los hallazgos histológicos; todos los casos de histología desfavorable demostraron inmunopositividad. En este estudio no se observó correlación significativa clinicopatológica entre la etapa del tumor y la expresión de p53. Los pacientes con estadio IV (metastásico) fueron p53 positivo, mientras que los estadios I a III (no metastásico) fueron positivos por inmunohistoquímica para p53 ($P = 0,02$ y $P = 0,40$ tanto para la intensidad como para el porcentaje de positividad de las células para p53). ⁽²²⁾

Sredni et al. encontró que la supervivencia global fue mayor para pacientes que resultaron negativos para p53 que para casos resultantes como positivos. En dicho estudio se llegó a la conclusión de que el aumento de la expresión de p53 parece estar asociada tanto con la enfermedad avanzada como con la recaída. ⁽²³⁾

Huang et al. mostró que la acumulación de p53 se asocia por histología con la angiogénesis y clínicamente con enfermedad agresiva. ⁽²⁴⁾

En el estudio Lahoti c, thorne P, Malkin D, Yeger H. Immunohistochemical detection of p53 in wilms' tumors correlates with unfavourable outcome publicado en Am J Pathol de 1996 se demostró que la mutación de p53 correlacionada con la recurrencia y las metástasis. ⁽²⁵⁾.

Justificación

Debido a los avances en el tratamiento de niños con cáncer, la supervivencia de los pacientes con tumor de Wilms se ha incrementado hasta un 95% a 5 años. Al momento actual, la respuesta tumoral y la evolución de los pacientes con tumor de Wilms se evalúa de acuerdo al estadio de la enfermedad y a la histología. Dado la heterogeneidad de estos tumores, el 7% de estos pacientes continúan teniendo poca respuesta a protocolos de tratamiento internacionales. Los conocimientos acerca de los mecanismos moleculares implicados en la génesis del tumor de Wilms son necesarios para conducir nuevos protocolos terapéuticos más eficaces y útiles en el tratamiento de las numerosas formas de presentación de esta entidad. Por lo cual es necesario e importante conocer los marcadores moleculares y su relación con la histología y pronóstico de estos tumores que nos permitan tener una terapia dirigida e individualizadas en estos pacientes y con ello permitirnos la identificación de aquellos que tengan peor pronóstico y tratarlos de manera más intensiva.

Planteamiento del problema

En las últimas décadas, los avances en quimioterapia y radioterapia han mejorado considerablemente las posibilidades de supervivencia de los niños afectados de patología oncológica. Sin embargo, el riesgo de recurrencia continúa siendo el obstáculo principal para su curación en estos tumores, ya que los factores pronósticos para los pacientes con tumor de Wilms se limitan a la extensión de la enfermedad y variante histológica. Actualmente se han visto involucrados otros marcadores tumorales que pudieran estar involucrados en la recurrencia de este tumor, por lo cual nos planteamos la siguiente pregunta:

Pregunta de investigación

¿Existe correlación en la sobreexpresión de P53 por inmunohistoquímica con la supervivencia en niños con tumor de Wilms?

Hipótesis

Los pacientes pediátricos con tumor de Wilms que tenga sobreexpresión p53 disminuirán su supervivencia en un 40% comparados con quienes no lo hacen.

Objetivos

Objetivo general:

Determinar la supervivencia global y libre de enfermedad de aquellos pacientes con diagnóstico de tumor de Wilms de acuerdo a la expresión del marcador tumoral p53 por inmunohistoquímica.

Material y métodos

1.-Tipo de estudio

Respecto a la intervención del investigador: observacional

Respecto a la interpretación de resultados: analítico

Respecto a la temporalidad: retrospectivo

Respecto a la medición: longitudinal

Estudio observacional, analítico, retrospectivo y longitudinal.

2.- Diseño del estudio:

Casos y controles anidado a una cohorte retrospectiva.

3.- Población en estudio:

Todos los pacientes con diagnóstico de certeza con tumor de Wilms atendidos en la UMAE Hospital de pediatría del Centro Médico Nacional SXXI, desde el 1° de Enero del 2009 al 31° de Enero del 2017

4.- Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión

- Pacientes de cualquier sexo, entre 1 y 17 años de edad con diagnóstico de certeza (por patología) de tumor de Wilms, realizado durante el periodo comprendido entre el 1° de Enero del 2009 y el 31° de Enero del 2017.
- Pacientes de primera vez sin tratamiento al momento del diagnóstico.
- Paciente que cuenten con expediente completo para establecer curso clínico de la enfermedad.
- Pacientes que completen tratamiento en esta unidad.

Criterios de exclusión

- Paciente con diagnóstico y tratamiento previo en otra unidad
- Pacientes que no cuenten con realización de P53 por inmunohistoquímica.

A) Desarrollo del estudio:

1. Se identificaron a los pacientes con diagnóstico de primera vez de Tumor de Wilms en el periodo comprendido entre el 1° de Enero del 2009 y el 31° de Enero del 2017.
2. Se solicitó la determinación de P53 por el método de inmunohistoquímica e los cortes obtenidos de los bloques de parafina, dicho procedimiento se llevará a cabo por el personal del laboratorio de tumores del Hospital de Pediatría de CMN Siglo XXI. (anexo 1)
3. Se registraron por el tesista los datos de interés de cada expediente clínico en la hoja de recolección de datos.

B) Cálculo de tamaño de muestra:

Se realizó el cálculo de tamaño de muestra con una prueba de diferencia de dos proporciones de acuerdo al diseño del estudio por lo que requiere estudiar al menos **34 pacientes**

C) Plan de análisis estadístico.

Se utilizó para la estadística descriptiva; medidas de tendencia central (media, mediana y moda) y dispersión para variables cuantitativas (curvas de tendencia central).

Para las variables nominales y ordinales se calcularon, frecuencias y porcentajes

El riesgo relativo o razón de riesgos (RR), se usó para buscar asociaciones entre dos variables de carácter cualitativo (dicotómicas) y chi cuadrada (estadística no paramétrica).

Se realizó curvas de supervivencia de acuerdo a curvas de Kaplan y Meir y cálculo de long Rank test para determinar las diferencias entre las sobrevividas.

Definición y clasificación de las variables

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	UNIDADES DE MEDICIÓN	CONTROL
Supervivencia global	Dependiente	Cuantitativa discreta	Tiempo transcurrido en número de meses que viven los pacientes después de iniciar la quimioterapia	Tiempo transcurrido en número de meses que viven los pacientes después de iniciar la quimioterapia	Meses	meses
Supervivencia libre de enfermedad	Dependiente	Cuantitativa discreta	Tiempo transcurrido en número de meses que viven los pacientes posterior al control de la enfermedad	Tiempo transcurrido en número de meses que viven los pacientes posterior al control de la enfermedad	Meses	meses
Variable Histológica	independiente	Cualitativa ordinaria	Características de malignidad con la clasificación histopatológica	presencia o no de anaplasia en la muestra de tumor	Anaplasia Favorable	1 2
Sexo	Independiente	Cualitativa: Nominal	Características fenotípicas que califican al sujeto en femenino o masculino	Sexo Fenotípico	Femenino Masculino	Si No
Edad	Independiente	Cuantitativa: Continua	Tiempo de vida en meses	Edad cumplida en meses	Meses	Fecha de nacimiento
p53	Independiente	cualitativa Nominal	Observación por inmunohistoquímica	Tinción de inmunohistoquímica de las muestras, observación por patólogo	Si No	Si No
Estadificación	Confusión	Cualitativa Nominal	Grado de extensión de la enfermedad	Grado de extensión de la enfermedad	EI EII EIII EIV	1 2 3 4

Factibilidad y recursos humanos físicos y financieros

Recursos humanos:

Tesista médico residente de pediatría médica, tutor médico adscrito, asesor metodológico, médico patólogo. química y técnica en inmunohistoquímica

Recursos materiales:

Hojas blancas, lápices, computadora, impresora, reactivo para p53, paquete estadístico SPSS, equipo para realizar la técnica de inmunohistoquímica.

Aspectos éticos de la investigación

El diseño y proceso de investigación estará supeditada al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y a los principios básicos para toda investigación médica de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (1964) y sus modificaciones en Venecia (1983), Hong Kong (1989) y Tokio (1995), Cumple con los principios éticos de investigación de justicia, beneficencia y autonomía

Según el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud este estudio se considera sin riesgo ya que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos y no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en el estudio. Al ser un estudio sin riesgo no se requiere consentimiento informado.

El presente estudio se realiza en base a lo establecido en la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos: Artículo 4º publicado en el Diario Oficial de la Federación el día 6 de Abril de 1990.

Procedimientos:

Se recolectaron las laminillas teñidas con H&E y los bloques de parafina con suficiente tejido para la elaboración del estudio de inmunohistoquímica. Las laminillas fueron revisadas por el Dr. Marco Antonio Rodríguez Florido y reclasificadas de acuerdo a las variables histológicas, realizándose al mismo tiempo la selección de la laminilla y bloque mejor preservado, esto es con menos necrosis celular y mayor cantidad de componente tumoral.

Inmunohistoquímica:

Posterior a la selección del material se realizó el estudio de inmunohistoquímica con sistema peroxidasa-antiperoxidasa, por un biólogo capacitado en la técnica de acuerdo a las recomendaciones de los proveedores.

Se realizaron cortes de 3 a 4 μ m de tejido incluido en parafina, previamente fijado en formol amortiguado al 10%, utilizando porta objetos con poly-L lysina. (0.1% en agua destilada). El tejido fue desparafinado en la estufa a 56° C durante 30 minutos y rehidratado desde xilol hasta agua destilada pasando por alcoholes a concentraciones menores (5 minutos en cada uno de las soluciones). Posteriormente se efectuó la recuperación antigénica con DAKO target retrieval solution al 10% durante 10 minutos en olla express. Una vez que se enfrió (temperatura ambiente) se retiró del recuperador y se enjuagó con agua destilada ó PBS.

La peroxidasa se bloqueó por 10 minutos con DAKO peroxidase blocking al 3% (se mantuvo cubierto para evitar el contacto con la luz) y se lavó con agua destilada ó PBS.

Los cortes fueron incubados en cámara húmeda durante 20 minutos con los anticuerpos primarios: P53 (1:100 DAKO corporation, Carpinteria Ca.

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-p53 humano Clona DO-7 Isotipo IgG2B kappa. Código No IR616/IS616).

El anticuerpo primario fue detectado con un anticuerpo secundario biotinilado. Una vez aplicado, se incubó durante 30 minutos streptavidina conjugada (peroxidasa de rábano). Posteriormente se reveló con el cromógeno diamino-bencidina (DAB) por 5 minutos y finalmente se contrastó con hematoxilina.

El tejido fue deshidratado con alcoholes de menor a mayor concentración (70%, 90% y 100%) y xilol. Las preparaciones se montaron con resinas.

En cada caso se incluyó un control positivo conocido, para p53 se utilizó el tejido de carcinoma de mama. Cabe señalar que la calidad del tejido fue evaluada con la expresión del Ki-67, marcador que debe ser positivo en todos los nefroblastomas en menor o mayor grado, sin excepción. Por lo cual el hecho de que un espécimen no salga positivo nos indicará la mala preservación del tejido, evitando de esta manera falsos negativos. La evaluación se realizó semicuantitativamente

Cronograma de actividades

ITEM	ACTIVIDAD	1				2				3				4				5				6			
		Jul-Nov 18				Dic18-Jun19				Jul 19				Ago-Oct 19				Oct-Dic19				Ene-Feb20			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Delimitación del tema. Recolección y selección bibliográfica	■	■	■	■																				
2	Elaboración del protocolo					■	■	■	■																
3	Envío a Comité Local de Investigación									■	■	■	■												
4	Recolección de los datos y análisis de las muestras Por inmunohistoquímica.													■	■	■	■								
5	Análisis de resultados																	■	■	■	■				
6	Informe y elaboración de tesis																					■	■		
7	Presentación de tesis																							■	■

Anexo

Hoja recolección de datos

Nombre			
Afiliación			
Edad			
Diagnóstico Histopatológico			
Fecha de Diagnósticos			
Localización de tumor			
Quimioterapia			
Estadificación			
Radioterapia	Si	No	Gy
P53	Si	No	
Estado actual	Vivo	muerto	

Resultados

En nuestro estudio se incluyeron 44 pacientes con diagnóstico histopatológico de Tumor de Wilms de los cuales el mayor porcentaje corresponde a los preescolares 19 (43%), siendo el sexo femenino más frecuente con una proporción de 1.7:1. La estirpe histológica más frecuente fue el blastemal en 20 pacientes (45.4%), y 8 pacientes presentaron anaplasia (18.1%), el resto correspondió al epitelial y estromal.

En esta muestra el 41.7% se encontraban en estado avanzado (Estadio IV) al momento del diagnóstico, y ningún paciente en estadio temprano de la enfermedad, tal como se aprecia en la tabla 1.

Tabla 1. Características demográficas

	Total n (%)
Edad del paciente	
12 – 23 meses	6 (13.6)
24 – 47 meses	19 (43.1)
48 – 71 meses	8 (18.1)
72 – 96 meses	7 (15.9)
97-156 meses	4 (9)
Sexo del paciente	
Femenino	28 (63.6)
Masculino	16 (36.3)
Histología	
Blastemal	20 (45.4)
Epitelial	10 (22.7)
Estromal	6 (13.6)
Anaplasia	8 (18.1)
Estadio	
Estadio I	0 (0)
Estadio II	9 (20.4)
Estadio III	10 (22.7)
Estadio IV	24 (54.5)
Estadio V	1 (2.2)
Expresión p53	
Si	21 (47.7)
No	23 (52.2)

Del total de la muestra a los cuales se le realizaron inmunohistoquímica, 21 pacientes (55.6%) salieron positivos. La expresión del P53 se reportó en el 75% ($p=0.05$) de los pacientes con estirpe anaplasico, de los cuales 83% fallecieron en el lapso establecido de seguimiento.

Tabla 2.

La estirpe menos afectada con expresión de p53 fue la epitelial, con un 30%.

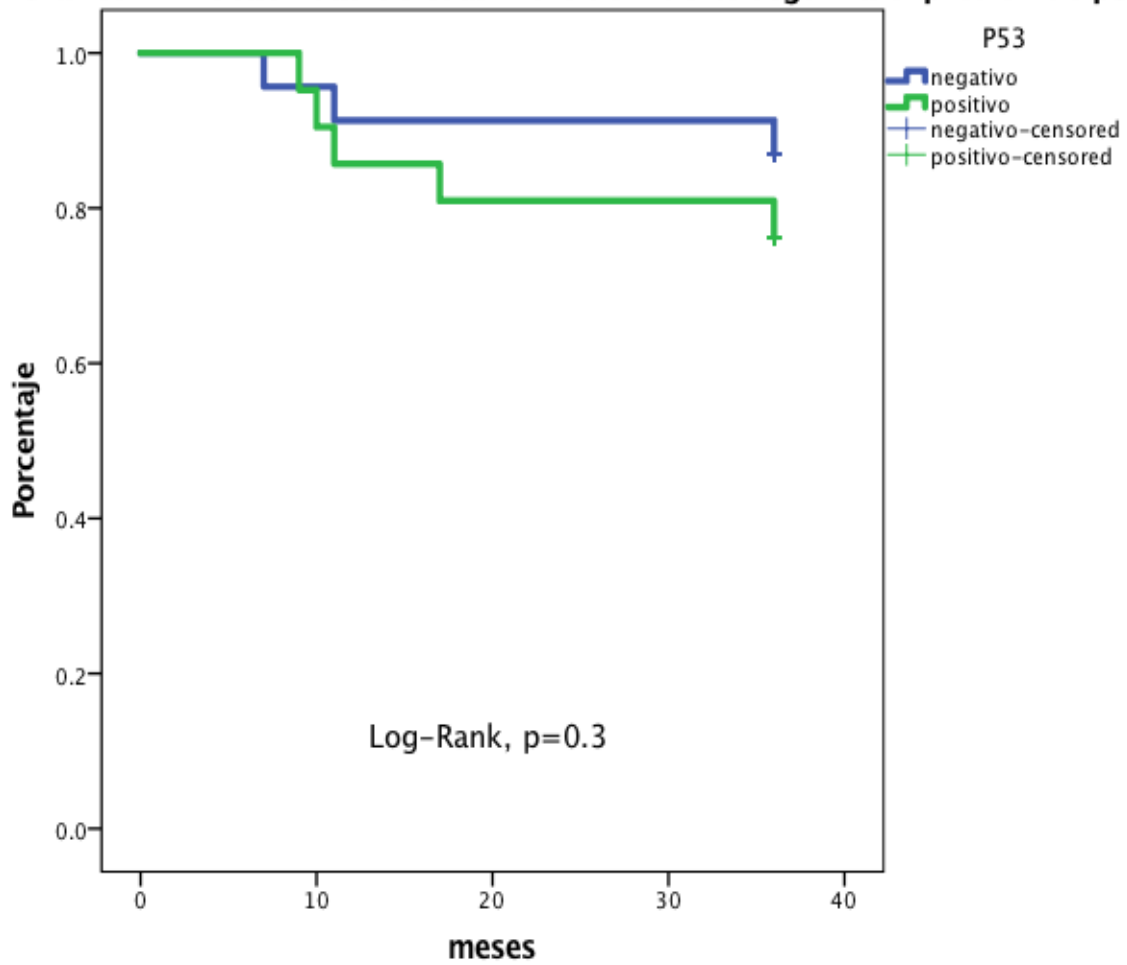
Tabla 2: Diferencias de la expresión de P53 y las variables clínicas según la estirpe histológica									
	Blastemal		Epitelial		Estromal		Anaplásico		valor de p
	n	20	n	10	n	6	n	8	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	
Sexo									
Mujer	12	60.00%	5	50.00%	5	83.30%	6	75.00%	0.3
Hombre	8	40.00%	5	50.00%	1	16.70%	2	25.00%	
Estadio*									
I	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0.2
II	6	30.00%	3	30.00%	0	0.00%	0	0.00%	
III	4	20.00%	3	30.00%	1	16.70%	2	25.00%	
IV	9	45.00%	4	40.00%	5	83.30%	6	75.00%	
V	1	5.00%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	
P53 positivo*	10	50.00%	3	30.00%	2	33.30%	6	75.00%	0.05
Mortalidad	0	0.00%	2	20.00%	1	16.70%	5	62.50%	0.002

Así mismo encontramos que existe mayor riesgo de fallecer en un lapso de 3 años en aquellos con estirpe anaplásico (OR 18), mientras que brinda mayor supervivencia la estirpe blastemal (OR 0.6). De acuerdo a los estadios que se presenten de la enfermedad existe más riesgo de fallecer si se debuta con estadios III-V (OR 1.2). Basado en la expresión de p53 los pacientes que lo expresen por inmunohistoquímica, tendrán 2 veces más probabilidad de fallecer en un periodo de 3 años en comparación con quienes no lo expresen.

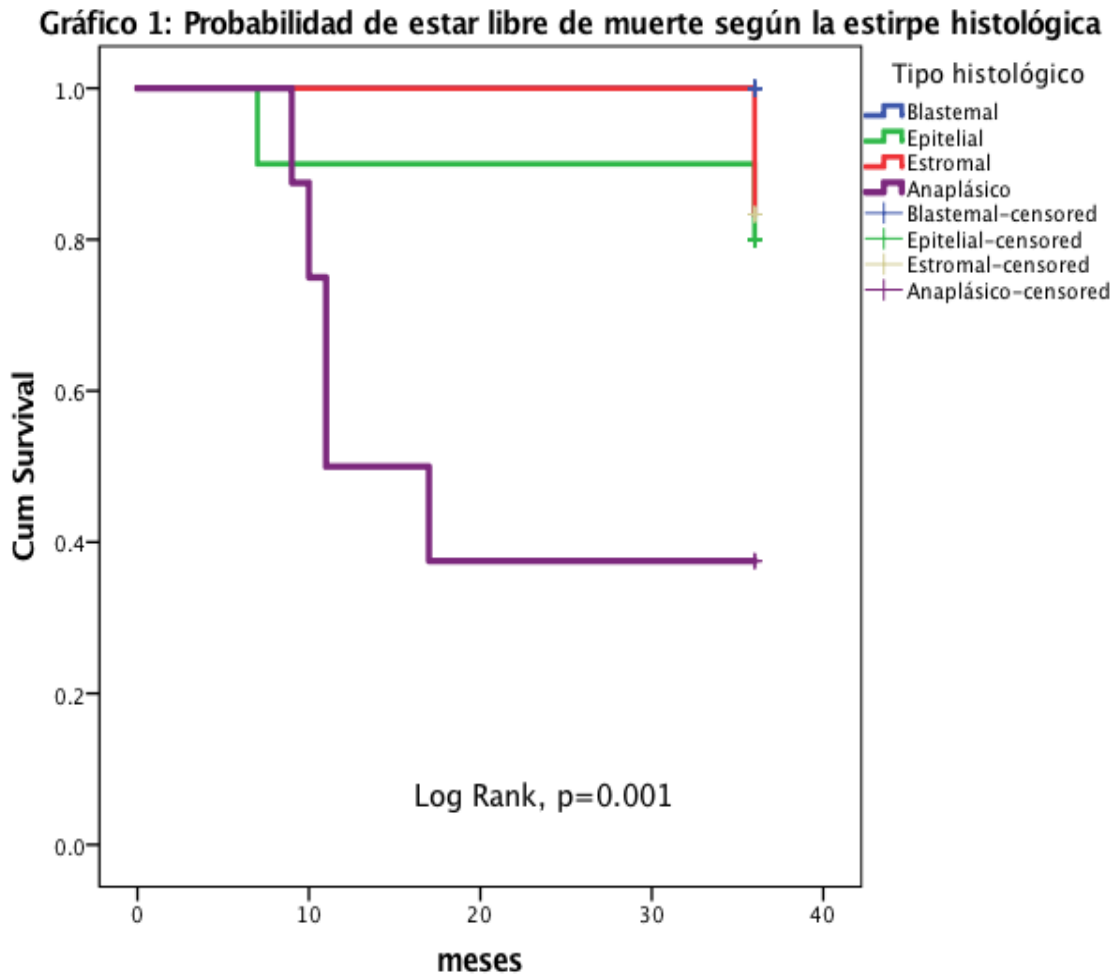
Comparación y cálculos de riesgos entre sobrevivientes y no sobrevivientes					
	sobreviviente		no sobreviviente		OR(IC-95%)
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	
Sexo					
Mujer	21	58.30%	7	87.50%	0.2(0.02-1.8)
Hombre	15	41.70%	1	12.50%	
Tipo histológico					
Blastemal	20	55.60%	0	0.00%	0.6(0.5-0.8)
Epitelial	8	22.20%	2	25.00%	1.1(0.1-6.9)
Estromal	5	13.90%	1	12.50%	0.8(0.08-8.8)
Anaplásico	3	8.30%	5	62.50%	18(2.8-117)
Estadio					
I-II	9	25.00%	0	0.00%	0.7(0.6-0.9)
III-V	27	75.00%	8	100.00%	1.2(1.1-1.5)
P53 positivo	16	44.40%	5	62.50%	2(0.4-10)

La mortalidad en aquellos que expresan P53 fue del 30%, mientras que los pacientes que no lo expresan tienen una mortalidad del 15% (p 0.3).

Gráfico 1: Probabilidad de estar libre de muerte según la expresión de p53



Los pacientes con estirpe anaplásica al momento del diagnóstico presenta una supervivencia del 60% a 36 meses, mientras que la estirpe estromal presenta una supervivencia libre de enfermedad superior al 90% ($p = 0.001$).



Discusión

Actualmente el Tumor de Wilms continúa siendo unos de los tumores donde se han logrado mantener una sobrevida del 95% a 5 años, con algunas modificaciones en los protocolos que ayude a disminuir los efectos adversos a largo plazo. Una de los grandes avances, es el estudio más minucioso de la biología molecular de estos tumores, que hacen se dirijan estos tratamientos. El P53 ha sido estudiado ya en varios tumores infantiles el cual que atribuyen un factor de mal pronóstico en muchos de ellos, el cual complementa los factores de mal pronóstico ya conocidos como el estadio de la enfermedad y la histología del tumor. *Perlman EJ y colaboradores*, establecen en su estudio que el estadio que más se expresa al momento del diagnóstico es el estadio I con un porcentaje por arriba del 40%, y en cuanto a mortalidad, se observa que ésta incrementará a medida que se presenta un estadio avanzado de la enfermedad (III-V). Nosotros encontramos que el 77% de nuestros pacientes se encontraban en estadios avanzados al diagnóstico (III-IV) con una sobrevida esperada del 70 por ciento, comparada con los estadios tempranos que tienen una sobrevida esperada del 90%, siendo muy similar a la literatura internacional.

En nuestro estudio pudimos observar que el 75% de los pacientes con estirpe anaplasia expresaron el gen P53, tal como algunos autores los reportan en la literatura. En el año 2000 se realizó un estudio por *De León Bojorge y colaboradores* donde se concluyó que los pacientes con anaplasia expresaron p53 en un 86%²⁶.

~~En nuestro estudio se confirmó dicha afirmación mostrando que el 75% de los pacientes estudiados con estirpe anaplásica expresaron p53. De igual manera el estadio IV de la enfermedad es el que más expresó dicho gen.~~

~~En el año 2012, *Khanna G, Rosen N, Anderson JR, et al*, realizaron un estudio donde abordaban a los pacientes con tumor de Wilms mediante estudios tomográficos para determinar el estadio de la enfermedad y asociarlo como factor de mal pronóstico encontrando que a medida que se diagnosticaban estadios avanzados de la enfermedad existía mayor riesgo de mortalidad. En nuestra muestra de pacientes, englobamos los 2 factores pronósticos más estudiados como son el estadio y estirpe histológica de la enfermedad y lo asociamos con la expresión de p53 mediante inmunohistoquímica.~~

-Dentro de los resultados se encontró que la expresión de p53 por si sola en la enfermedad no tiene impacto estadísticamente significativo en la mortalidad, ya que los pacientes que lo expresan tuvieron una supervivencia a 3 años del 70%, mientras que en los pacientes que no lo expresaron, la supervivencia en el mismo lapso de tiempo fue del 85% (p 0.3). Sin embargo, si la expresión de p53 se asocia

a estirpe histológica de anaplasia la mortalidad se incrementa significativamente a 83%.

Se realizó un estudio en Valencia en el año 2018 por Rodríguez Iglesias, Serrano Durbá y colaboradores donde se encontró que de acuerdo al tipo de histología que presentará el tumor de Wilms, el riesgo de recurrencia en anaplasia era del 50%, mientras que en histología favorable solamente del 15%. En base a la mortalidad, no se evidenció diferencia considerable, con un 50% de mortalidad en anaplasia, contra un 47% en histología favorable.

Basado en la estirpe histológica encontramos que, si es desfavorable (anaplasia) tendrá una mortalidad del 60% a 3 años independientemente del estadio que se encuentre la enfermedad o de la expresión de p53.

~~Las fortalezas del estudio radican en las características del diseño, al reclutar sujetos en las etapas iniciales al momento del diagnóstico de la enfermedad y la medición de este marcador pronóstico en el tejido.~~

~~Las debilidades son, como ya se mencionaron, relacionados al tamaño de la muestra, lo que en consecuencia condiciona la posibilidad de error tipo 2, y que ameritaría recalcular el poder actual para incrementar el número de pacientes y su seguimiento.~~

~~Es necesario considerar que debe extenderse el periodo de seguimiento y complementar con las mediciones de otros marcadores pronósticos conocidos con el fin de determinar relación independiente del p53 con el fenómeno.~~

CONCLUSIONES

Todos los pacientes que expresen P53 con histología desfavorable tendrán una mortalidad del 30%. Si bien pareciera que la sobreexpresión del P53 puede ser un mal pronóstico sobre todo en aquellos pacientes con estirpe histológica anaplasiamanaplasica, nuestra principal limitante fue el tamaño de muestra, por lo que es indispensable continuar realizando estudios multicéntricos Es necesario considerar que debe extenderse el periodo de seguimiento y complementar con las mediciones de otros marcadores pronósticos conocidos con el fin de determinar relación independiente del p53 con el fenómeno.

Bibliografía

1. Benítez BL, Quiñones SG. El cáncer. ¿Un problema de salud pública en México? Rev Med IMSS (Mex) 1991;29:195-213.
2. Fajardo-Gutiérrez A, Mejía-Aranguré M, Gómez-Delgado A, Mendoza-Sánchez H, Garduño-Espinoza J, Martínez-García MC. Epidemiología de las neoplasias malignas en niños residentes en el Distrito Federal (1982-1991). Bol Med Hosp Infant Mex 1995;52:507-16.
3. Green DM, D'Angio GJ, Beckwith JB, Breslow EN, Finkfestein JZ, Keialis P, Thomas PRM. Wilms' tumor (Nephroblastoma, renal embryoma). In: Pizzo PA, Popiack OG, editors. Principles and practice of pediatric oncology. 2nd ed. Philadelphia, PA, USA: JB Lippincott Company; 1993. p. 713-37.
4. Danglot-Banck C, de la Rosa-Morales V, Gómez-Gómez M, Hernández-Cruz L, Fajardo-Gutiérrez A. Epidemiología del tumor de Wilms en la edad pediátrica. Bol Med Hosp Infant Mex 1996;53:202-8.
5. Kaatsch P, Haaf G, Michaelis J. Childhood malignancies in Germany. Methods and results of a nationwide registry. Eur J Cancer 1995;31A:993-9.
6. Gurney JG, Davis S, Severson RK, Jang JY, Ross JA, Robison LL. Trends in cancer incidence among children in the US. Cancer 1996;78: 532-41.

7. Khanna G, Rosen N, Anderson JR, et al.: Evaluation of diagnostic performance of CT for detection of tumor thrombus in children with Wilms tumor: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 58 (4): 551-5, 2012
8. Wilms' tumor: status report, 1990. By the National Wilms' Tumor Study Committee. *J Clin Oncol* 9 (5): 877-87, 1991
9. Perlman EJ: Pediatric renal tumors: practical updates for the pathologist. *Pediatr Dev Pathol* 8 (3): 320-38, 2005 May-Jun
10. Breslow NE, Collins AJ, Ritchey ML, et al.: End stage renal disease in patients with Wilms tumor: results from the National Wilms Tumor Study Group and the United States Renal Data System. *J Urol* 174 (5): 1972-5, 2005
11. D'Angio GJ, Breslow N, Beckwith JB, et al.: Treatment of Wilms' tumor. Results of the Third National Wilms' Tumor Study. *Cancer* 64 (2): 349-60, 1989.
12. Jereb B, Burgers JM, Tournade MF, et al.: Radiotherapy in the SIOP (International Society of Pediatric Oncology) nephroblastoma studies: a review. *Med Pediatr Oncol* 22 (4): 221-7, 1994.
13. Green DM: The treatment of stages I-IV favorable histology Wilms' tumor. *J Clin Oncol* 22 (8): 1366-72, 2004.
14. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083-1093, 1989.

15. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 60: 6788-6793, 2000.
16. Perry ME, Levine AJ. Tumor suppressor p53 and the cell cycle. *Curr Opin Genet Devel* 1993;3:50.
17. Pezella F, Micklem K, Turley H, Pulford K, Jones M, Kocialkowski S, Delia D, Aiello A, Bicknell R, Smith K, Harris L, Gattner KC, Mason DY: Antibody for detecting p53 protein by immunohistochemistry in normal tissues. *J Clin Pathol* 1994, 47:592-96
18. Kusafuka T, Fuzukawa M, Oue T, Komoto Y, Yoneda A, Okada A. Mutation analysis of the p53 gene in childhood malignant solid tumors. *J Pediat Surg* 1997;32:1175-80.
19. Malkin D, Sexsmith E, Yeger H, Williams BRG, Coppes MJ. Mutations of the p53 tumor suppressor gene occur infrequently in Wilms' tumor. *Cancer Res* 1994;54:2077-9.
20. Bardeesy N, Falkoff D, Petruzzi M, et al. Anaplastic Wilms' tumor: a subtype displaying poor prognosis harbors p53 gene mutations. *Nature Genet* 1994;7:91-7.
21. Chitra L, Paul T, David M, et al. Immunohistochemical Detection of p53 in Wilms' Tumors Correlates with Unfavorable Outcome. *American Journal of Pathology*, Vol. 148, No. 5, May 1996: 1577-1589.

22. Farzaneh J, Delaram S, Mohammad R, et al. Immunohistochemical Detection of p53 Protein Expression as a Prognostic Factor in Wilms Tumor. Iranian Journal of Kidney Diseases. Volume 5, Number 3, May 2011: 149-153.
23. Sredni St, De camargo B, et al. Immunohistochemical detection of p53 protein expression as a prognostic indicator in wilms tumor. Med Pediatr Oncol 2001;37:455-8.
24. Huang J, Soffer SZ, Kim eS, et al. p53 accumulation in favourable histology wt is associated with angiogenesis and clinically aggressive disease. J Pediatr Surg 2002;37:523-7.
25. Das RN, Chatterjee U, Sinha SK, et al. Study of histopathological features and proliferation markers in cases of Wilms' tumor. Indian J Med Paediatr Oncol 2012;33:102-6.
26. De León Bojorque, Mejía Hernández et al. Tumor de Wilms, distribución de patrones histológicos y frecuencia de anaplasia. Instituto Nacional de Pediatría. 2000. Pag 1-32
27. P. Rodriguez Iglesias, A. Serrano Durbá. Nefroblastoma: experiencia a largo plazo en el abordaje multidisciplinario. Cir. Pediatr. 2018; 31: 46-51