

## Especializaciones

# RELACIÓN INFLAMACIÓN – CÁNCER: Interleucina 6 como componente inflamatorio y su posible implicancia en el desarrollo de Neuroblastoma

**Autores:** Bioq. Olivero Valentina\*, Bioq. Esp. María Alicia Soriano, Bioq. Lucrecia Daniela Barbero, Bioq. Esp. María Mariela Ruiz, Dra. Elizabeth Hiramatsu, Dra. María Daniela Morell, Bioq. Esp. María Cecilia García Oro. Hospital Infantil Municipal de Córdoba – Lavalleja 3050.

\*Olivero Valentina, valeolivero@hotmail.com, tel: 3564-506538

### Resumen

El Neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más común en la infancia. En pacientes de alto riesgo, la infiltración de macrófagos en el microambiente tumoral y la IL-6 producida podrían ser cruciales para su crecimiento y proliferación.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la posibilidad de una interrelación entre los niveles de IL-6, grado y extensión tumoral en pacientes pediátricos con Neuroblastoma del Hospital Infantil Municipal de Córdoba.

Se midió IL-6 por ELISA en dos muestras de sangre periférica por cada paciente: la primera en el momento del diagnóstico sin tratamiento, y la segunda luego del segundo ciclo de quimioterapia. Se procesaron dieciséis muestras de pacientes sanos.

Para el análisis de los resultados se utilizaron test de comparación no paramétricos, Curvas ROC y estudios de potencia.

No se encontraron diferencias significativas entre pre tratamiento y controles sanos, pero sí entre post tratamiento y estos últimos. A pesar de observar un gran aumento de IL-6 entre pre y post tratamiento, éste no fue estadísticamente significativo. Las limitaciones se adjudicaron al escaso número de pacientes.

Dado que los pacientes presentaron neoformaciones tumorales durante y posterior al tratamiento, se pensó que los niveles elevados de IL-6 tendrían un papel no protector, protumoral y metastásico, confiriendo resistencia a las terapias utilizadas.

Se propone que serían necesarios estudios a gran escala para evaluar la fuente principal de IL-6 en pacientes con neuroblastoma, y su relación directa con estadios de riesgo y mal pronóstico. Así podría postularse el desarrollo de terapias sinérgicas de bloqueo selectivo que se dirijan a la otra mitad del tumor: la inflamación.

### Abstract

*Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumor in childhood. In high-risk patients, tumor associated macrophages and IL-6 produced by them may be crucial for growth and proliferation of tumor cells.*

*The goal of this study was to evaluate the existence of a relationship between levels of IL-6, degree and tumor extension in pediatric patients with Neuroblastoma of the Hospital Infantil Municipal (Córdoba).*

*IL-6 was measured by ELISA in two serum samples for each patient studied: the first one at the time of diagnosis before any treatment, and the second after two cycles of chemotherapy. Sixteen samples from healthy patients were processed.*

*The results were analyzed through nonparametric comparison tests, ROC curves and power studies. No significant differences were found between pre-treatment and healthy controls, but between post-treatment and the latter. Despite a large increase in IL-6 levels between pre- and post-treatment, this was not statistically significant. Narrow circumstances were thought to be due to the small number of patients.*

*Given that all the patients presented tumor neoformations during and after treatment, it was thought that elevated IL-6 levels would have a non-protective, protumoral and metastatic role, conferring therapy resistance.*

*Large-scale studies would be necessary to evaluate the main source of IL-6 in patients with neuroblastoma, and the direct relationship between its levels and risk and prognosis. This could allow the development of selective blocking synergistic therapies that target the other half of the tumor: inflammation.*

**Palabras Claves:** \* Interleucina 6 \* Neuroblastoma \* Inflamación \* Cáncer \* Tumor sólido

## Introducción

Durante los últimos años ha crecido significativamente el número de investigaciones dirigidas a la relación existente entre inflamación y cáncer (1). La conexión entre ambos tiene dos puntos de vista: uno que muestra cómo las condiciones inflamatorias, principalmente las de tipo crónicas, facilitan el desarrollo de cáncer; y otro en el cual se plantea que ciertas alteraciones genéticas estimulan un proceso inflamatorio que contribuye a un microambiente favorable para el crecimiento y expansión del tumor (2). La biología de dichos tumores no puede ser enteramente comprendida a través de la simple enumeración de las cualidades de las células cancerígenas, sino que debe abarcar también las contribuciones del microambiente tumoral (MT) a la tumorigénesis (3).

Aunque el sistema inmune juega un rol importante en el control y la eliminación del cáncer, existen evidencias de que las células de dicho sistema también pueden contribuir tanto a la iniciación como a la promoción, y aún más a la progresión del tumor. Esto ocurre porque las células neoplásicas evaden la inmunovigilancia, principalmente, generando una gran cantidad de factores solubles capaces de cambiar la funcionalidad de las células del sistema inmunológico (Fenómeno de Inmunoedición) (4, 5).

Entre las células que componen el microambiente que rodea el tumor se encuentran: fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, mastocitos, células dendríticas, células asesinas naturales (NK), neutrófilos, eosinófilos, y linfocitos. Este grupo de células produce una gran variedad de mediadores citotóxicos tales como especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, cisteína-proteasas y serin-proteasas, metaloproteinasas, eicosanoides, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL) como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, IL-10, IL-17, IL-12, IL-23, factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF $\beta$ ) y enzimas que activan o son activadas por el factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) y por el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT-3), factores que controlarán la transcripción de ciertos genes involucrados en procesos de proliferación, crecimiento, supervivencia e inflamación (2). Los recién mencionados son algunos de los mediadores endógenos claves presentes en el MT que han sido vinculados tanto en cáncer "experimental" como en ensayos con seres humanos, y pueden contribuir como así también inhibir el desarrollo del tumor (1, 6).

Dichas células y mediadores están presentes en el MT de la mayoría de los tumores, independientemente del gatillo que favoreció su desarrollo (1). Una de las poblaciones más importantes en ese MT está representada por células mononucleares, particularmente los macrófagos asociados a tumor (TAMs) (2, 4, 5). Existe evidencia de que ellos son fundamentales en la progresión de muchos tipos de tumores, tanto en niños como en adultos (5).

Los tumores sólidos en niños difieren ampliamente de los observados en adultos, incluso algunos de ellos solo aparecen en población pediátrica como el Tumor de Wilms, Sarcoma de Ewing y Neuroblastoma (NB) (7).

El NB es el tumor sólido extracraneal más común en la infancia (8). Es un cáncer de tejido nervioso que tiene origen en la cresta neural. El 30% de estos tumores surge en la médula adrenal; el 60% nace en los ganglios paraespinales abdominales, y el resto de los mismos lo hará en los ganglios simpáticos del tórax, cabeza/cuello y pelvis (9).

Se clasifica según la extensión de la enfermedad en estadios 1, 2A, 2B, 3, 4 y 4S (estos dos últimos pueden incluir metástasis en médula ósea); y según el riesgo de cada estadio en muy bajo, bajo, intermedio y alto riesgo (8, 10, 11).

Por lo general se desarrolla en niños menores de 5 años (5, 10, 12, 13). En Argentina, el promedio anual de casos diagnosticados es de 72, siendo 7 el promedio anual específico para la Provincia de Córdoba (14). Actualmente es la causa primaria de muerte por cáncer pediátrico en niños entre 1 y 5 años de edad y representa aproximadamente el 13% de la mortalidad por cáncer en pediatría, de allí la importancia de mejorar las terapéuticas utilizadas (9, 15).

En pacientes con NB de riesgo intermedio y alto, existe evidencia de que la infiltración de TAMs está asociada a pronóstico desfavorable, y que la IL-6 producida por estas células puede ser crucial para la invasión, crecimiento y proliferación de las células tumorales de NB (5, 12).

La IL-6 es una citocina pleiotrópica proinflamatoria producida por una gran variedad de células, tales como linfocitos T y B, fibroblastos, monocitos, queratinocitos, células mesangiales y endoteliales, y también muchas células tumorales (16).

Algunas de sus funciones más importantes son: iniciar y mantener el proceso inflamatorio al facilitar el reclutamiento de leucocitos al sitio de inflamación, estimular la producción de otros mediadores inflamatorios, regular la activación y diferenciación de linfocitos T y células mieloides, estimular la síntesis de inmunoglobulinas al promover la maduración de los linfocitos B, inducir la producción de factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF), y promover la neo-angiogénesis (17).

Existen dos vías de señalización para la IL-6 que comienzan con la unión de esta IL a su receptor (IL-6R): la vía clásica y la vía de trans-señalización (18). En la vía clásica de señalización, la IL-6 ejerce su actividad principalmente a través de dos moléculas: IL-6Rm (receptor de membrana) y gp130 que conforma un homodímero anclado a la superficie celular; mientras que la vía de trans-señalización se inicia con la unión de la IL a su receptor soluble IL-6Rs, el cual se encuentra libre en la circulación (19, 20). La proteína gp130 se expresa en forma ubicua en las células sean o no

del sistema inmune; mientras que la expresión de IL-6Rm está restringida a la membrana de hepatocitos, células T y B, megacariocitos, neutrófilos y monocitos (19, 21). La mayoría de las funciones proinflamatorias de la IL-6 son atribuidas a la vía de trans-señalización, mientras que las señales antiinflamatorias y regenerativas se atribuyen a la activación de la vía clásica (22, 23, 24, 25).

En la carcinogénesis, luego de la unión de la IL-6 a su receptor ya sea por la vía clásica o bien la trans-señalización, se activan tres vías principales de señalización intracelular: *JAK/STAT*, *ERK(Ras)/MAP* y *PI3K/AKT* (19), que promueven a la iniciación y progresión tumoral, a través de la angiogénesis, metástasis y la resistencia a tratamiento (17).

En la última década, la IL-6 ha surgido como un importante factor contribuyente al MT y a la inflamación, favoreciendo la actividad pro-tumorigénica (2). Es interesante destacar que la IL-6 parece tener un papel fundamental en el desarrollo específico de metástasis óseas de NB (5, 12). Por este motivo, ha sido intensa su investigación, estudiando su inhibición de manera directa o bloqueando el receptor que media su señalización (26).

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la posibilidad de existencia de una interrelación entre mecanismos pro-

inflamatorios, grado y extensión tumoral en pacientes pediátricos con Neuroblastoma del Hospital Infantil Municipal (HIM) de Córdoba.

Específicamente, a través de este proyecto se intentó comparar los niveles de IL-6 en diferentes momentos de la enfermedad especialmente entre pacientes de alto riesgo, sabiendo que este grupo es el que se presenta con mayor frecuencia.

**Materiales y Métodos**

Pacientes

Se realizó un estudio prospectivo longitudinal, en el cual participaron 4 pacientes que fueron diagnosticados con Neuroblastoma según el protocolo establecido en el Servicio de Oncohematología del Hospital Infantil Municipal de Córdoba (basado en criterios diagnósticos determinados por protocolos internacionales y del Instituto Nacional del Cáncer). Para la elección de su tratamiento, los pacientes se clasificaron según extensión de la enfermedad considerando lo establecido en el Sistema de Estratificación Internacional de Neuroblastoma (*INSS, por sus siglas en Inglés*), y según

Paciente	Sexo	Edad al momento diagnóstico	Clasificación	Riesgo	Protocolo de tratamiento
1	M	4 años	Neuroblastoma diferenciado	Alto	Los dos primeros ciclos de quimioterapia fueron coincidentes en las drogas utilizadas: Ciclofosfamida, Vincristina y Doxorubicina.
2	M	1 año y 11 meses	Neuroblastoma diferenciado	Alto	
3	M	7 años y 11 meses	Neuroblastoma diferenciado	Alto	
4	F	1 año y 9 meses	Neuroblastoma indiferenciado	Alto	

**Tabla 1** Descripción de los pacientes, tumores y clasificación de riesgo.

estadio de riesgo a partir del Sistema de Clasificación Internacional de Grupos de Riesgo de Neuroblastoma (*INRG, por sus siglas en Inglés*).

Los 4 pacientes del estudio fueron clasificados como de alto riesgo. Los datos se muestran en la **Tabla 1**.

Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Infantil Municipal de Córdoba.

Muestras

Se tomaron 2 muestras por cada uno de los pacientes con Neuroblastoma. Uno de los mismos debió ser excluido del presente análisis por haber fallecido antes de culminar con su segundo ciclo de quimioterapia, por lo que se lo consideró pérdida de seguimiento.

La primera muestra (*NB pre tratamiento = NB 1º*) se obtuvo inmediatamente luego de realizarse el diagnóstico de la enfermedad, y previo al comienzo del tratamiento indicado.

La segunda muestra (*NB post tratamiento = NB 2º*) se obtuvo luego de terminado el segundo ciclo de quimioterapia, momento en el cual se realiza la re-estadificación de la enfermedad y su pronóstico, y se analiza el estado general previo al tercer ciclo.

Controles

Ante la ausencia de valores de referencia validados para IL-6 en sangre periférica, y como punto de partida para la

posterior comparación de pacientes con NB, se decidió procesar 16 muestras de pacientes controles sanos.

Se incluyeron pacientes con rango etario coincidente con los de NB, que se realizaron estudios pre-quirúrgicos en el nosocomio. Se excluyeron aquellos con enfermedad de base autoinmune y con patologías inflamatorias que pudieran alterar los niveles de IL-6.

Las muestras de suero fueron fraccionadas en alícuotas y colocadas rápidamente en freezer a -25 °C hasta el momento de su procesamiento.

Determinación de IL-6

La determinación de IL-6 fue realizada por ELISA (Set de ELISA IL-6 humano desarrollado por *BD Biosciences*) de acuerdo a las especificaciones metodológicas del fabricante. Los testigos proporcionados por el equipo para la posterior curva de calibración, muestras controles y muestras incógnitas fueron procesadas en la misma corrida analítica. Las muestras del grupo de controles sanos fueron medidas por duplicado, mientras que las muestras de pacientes con NB tanto pre tratamiento como post tratamiento fueron medidas por triplicado (para todos los casos se informó la media de las repeticiones).

Aquellos casos en que los valores de IL-6 obtenidos fueron menores a 4,7 pg/mL (límite de detección de la metodología



de ELISA utilizada) se informaron como *no dosables*, y se utilizó para el análisis estadístico un valor de 0 pg/mL.

**Método estadístico**

Para el análisis de los datos se utilizaron los siguientes programas: Infostat (versión profesional), Medcalc (versión demo) e InStat (versión 3.01). Dado que los valores obtenidos tanto para las muestras control, como para las pre y post tratamiento no se distribuyeron de manera normal, entonces se procedió a trabajar con  $p > 0,05$  tipo no paramétricos.

Para la comparación entre los grupos 1) *sanos - pre tratamiento* y 2) *sanos - post tratamiento*, se realizó un test estadístico para muestras independientes (U de Mann-Whitney). Para la comparación entre 3) *pre tratamiento - post tratamiento* se utilizó un test no paramétrico para muestras apareadas (Wilcoxon).

El *n* de pacientes control fue de \* mientras que el de pacientes con NB fue 3. Se consideró como significativo  $p < 0,05$ .

A pesar del escaso número de muestras, se realizaron también Curvas ROC con el objetivo de establecer el mejor punto de corte para diferenciar un valor realmente patológico de IL-6 en sangre periférica.

Se realizaron además estudios de potencia  $p = 0,0021$  para establecer el número mínimo de muestras necesario.

**Resultados**

Los niveles de IL-6 para el grupo de *Controles sanos*, fueron desde indetectables ( $n=15$ ) hasta 34,10 pg/mL ( $n=1$ ).

Los resultados obtenidos para cada paciente de los restantes 2 grupos de muestras (*NB 1º* y *NB 2º*) se muestran en la **Tabla 2**.

Paciente	NB 1º (pg/mL)	NB 2º (pg/mL)	Diferencia (post - pre)
1	125,13	-	*
2	23,54	366,71	343,17
3	nd**	253,86	253,86 $p > 0,05$
4	nd**	196,08	196,08

**Tabla 2** Niveles de IL-6 por paciente y por muestra.

\*Pérdida de seguimiento – Excluido para el análisis estadístico.

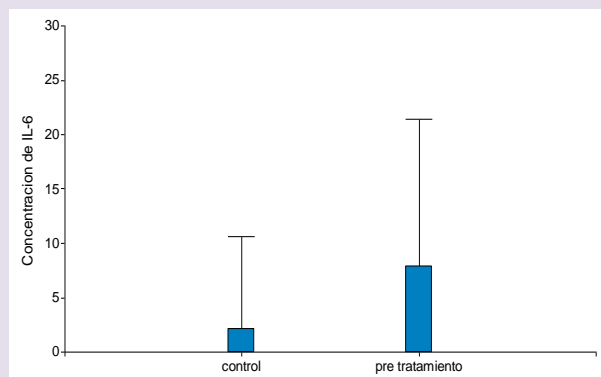
\*\*nd: no dosable= 0 pg/mL.

Los niveles de IL-6 obtenidos para las muestras tomadas en el momento del diagnóstico (*NB 1º*) fueron desde 0 pg/mL hasta 23,54 pg/mL. Estos valores no mostraron diferencias significativas con el grupo de *Controles sanos* ( $p > 0,05$ ).

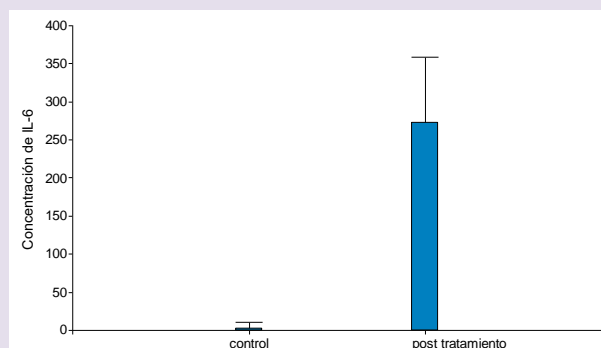
**Gráfico 1.**

Los niveles de IL-6 post tratamiento, obtenidos en la muestra posterior al segundo ciclo de quimioterapia (*NB 2º*), mostraron diferencias significativas respecto del grupo control ( $p = 0,0021$ ). **Gráfico 2.**

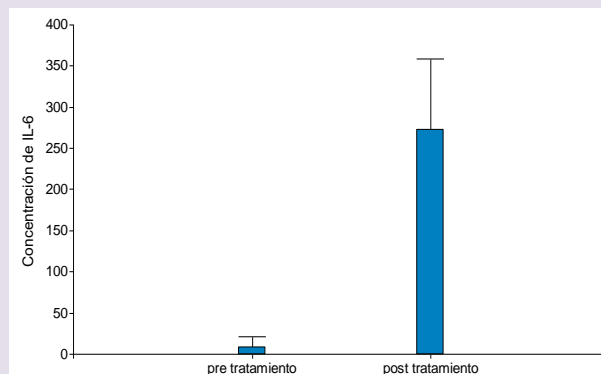
En el seguimiento de los pacientes con NB, a pesar de visualizarse una gran diferencia entre las primeras y las segundas muestras, las mismas no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). **Gráfico 3.**



**Gráfico 1**  
*Pre tratamiento vs. Controles Sanos.*



**Gráfico 2**  
*Post tratamiento vs. Controles Sanos.*

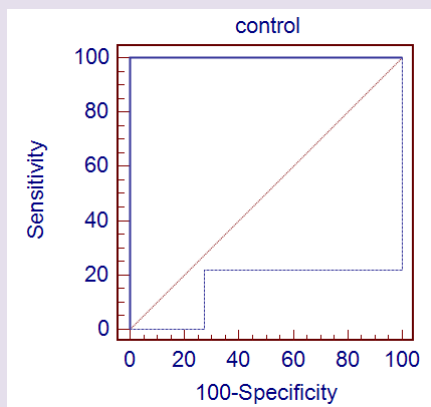


**Gráfico 3**  
*Pre tratamiento vs. Post tratamiento.*

A través del análisis con Curvas ROC se pudo establecer que el mejor punto de corte para definir un valor de IL-6 como patológico es 34,10 pg/mL, con una sensibilidad y especificidad del 100%. **Gráfico 4.**

El fabricante no informa punto de corte.

El estudio de potencia realizado arrojó, con un error  $\alpha$  de 0,05 y un error  $\beta$  de 0,20, que para mostrar diferencias significativas entre *Controles Sanos* y *NB 1º* sería necesario analizar como mínimo un total de 62 pacientes.



**Gráfico 4**

Curva ROC – Punto de corte: 34,10 pg/mL (100% Sensibilidad y Especificidad).

### Discusión y conclusiones

El comportamiento que mostraron los resultados obtenidos para los *Controles sanos* fue similar al del estudio realizado por *Eagler y col.* en el año 2008, en el cual informaron que los niveles encontrados de IL-6 en pacientes sanos fueron indetectables en 26 de 28 niños (aproximadamente el 93%), y que los dos valores restantes fueron de 10 pg/mL y 82 pg/mL (27). Resultados comparables fueron demostrados también para niños asintomáticos sanos en España en un trabajo realizado en el año 2005 en el cual además, no encontraron diferencias significativas en la distribución por sexo y edad (28). A partir de lo mencionado podríamos inferir entonces que para una población de niños sanos sólo el 6% de los pacientes presentaría un nivel de IL-6 dosable. El objetivo inicial de nuestro trabajo fue demostrar una relación directa entre los niveles de IL-6, el estado proinflamatorio que genera a nivel sistémico y el grado de extensión tumoral con metástasis del NB.

Diversos estudios han comparado los niveles de IL-6, medidos en sangre periférica y médula ósea de pacientes con diferentes estadios de NB, siendo estos valores mayores en aquellos pacientes considerados de mayor riesgo y particularmente, en aquellos con metástasis (27). En sus mediciones, los niveles de IL-6 mostraron diferencias significativas con los controles sanos sólo para el grupo de pacientes con NB de alto riesgo y no para aquellos clasificados como riesgo bajo o intermedio (27).

En nuestro caso, no logramos demostrar lo mismo, ya que para los pacientes con NB en la muestra *pre tratamiento* los niveles de IL-6 no fueron diferentes a los encontrados para el grupo de *Controles sanos*. Esto difiere ampliamente de lo observado por *Eagler y col.* con NB; y de otros trabajos realizados sobre distintos tipos de cáncer y tumores, en los que constatan que la IL-6 se encuentra elevada al momento del diagnóstico, lo que facilita el desarrollo y la progresión de la malignidad (29, 30, 31, 32, 33, 34, 35), y se asocia además a mal pronóstico (27, 36).

Algo que pudimos observar fue que el paciente que tuvo el nivel más alto de IL-6 al momento del diagnóstico (no incluido en las estadísticas) fue el que tuvo un peor desenlace (Paciente 1). Esto podría mostrarnos que, quizás, con un *n* mayor al estudiado, hubiésemos podido obtener

diferencias significativas. Para evaluar esta posibilidad, se realizó el estudio de potencia, obteniendo que para ello sería necesario un *n* mínimo de 62 pacientes recién diagnosticados con NB, un número difícil de alcanzar dada la baja incidencia de la enfermedad en estudio.

En nuestro estudio se encontraron niveles de IL-6 elevados luego del segundo ciclo de quimioterapia (NB 2º) para los 3 casos estudiados, y a pesar de que este aumento fue claramente visible respecto a los valores encontrados al momento del diagnóstico, la diferencia fue estadísticamente significativa sólo al contrastar estos valores con los *Controles sanos*.

Existe evidencia de que pacientes con NB de intermedio y alto riesgo disminuyen sus niveles de IL-6 luego de comenzar un tratamiento combinado con diferentes agentes quimioterápicos (ácido zoledrónico y ciclofosfamida en bajas dosis). La causa de esta disminución aún es motivo de investigación de diferentes grupos (37). Las diferencias encontradas con el estudio en comparación radican en el tratamiento, las edades de los pacientes estudiados y también los momentos de medición de la IL-6. Si bien el nivel de IL-6 en esta segunda muestra, podría verse elevado por la apoptosis celular y posterior inflamación generada por la quimioterapia, dicha muestra fue tomada en todos los casos al menos 21 días después del segundo ciclo de quimioterapia, una vez que cada paciente superó el valor absoluto de 750 neutrófilos/mm<sup>3</sup> y de 75.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> en sangre periférica (según el protocolo utilizado en el Servicio de Oncología del nosocomio – “*Children’s oncology group A3973*” - *Protocolo Alto riesgo*), tiempo suficiente para que se encuentre clínicamente estable y que la inflamación causada por la muerte celular del tratamiento ya no sea relevante.

El oncogén NMYC tiene un papel clave en el desarrollo de NB y define un subtipo agresivo. La amplificación del mismo se encuentra aproximadamente en el 20% de los casos y confiere un pobre pronóstico (9). Un grupo de estadounidenses afirma que la sola desregulación de la expresión del oncogén NMYC relacionada al desarrollo de la cresta neural, es suficiente para la tumorigénesis del NB (38). Sin embargo, existen también muchos casos de alto riesgo que conllevan mínima expresión de NMYC, sugiriendo la presencia de mecanismos adicionales independientes de lo descrito (9,11). Los pacientes participantes del estudio no presentaron amplificación NMYC, por lo cual no pudimos inferir conclusiones propias respecto a esto.

Teniendo en cuenta que los 3 pacientes estudiados tuvieron neoformaciones tumorales durante y posterior a los tratamientos, podríamos pensar que los niveles elevados de IL-6 estarían tomando un papel no protector, protumoral y metastásico. Ese aumento de IL-6 a nivel sistémico podría estar ocasionado tanto por los monocitos circulantes como así también por los TAMs, o las células estromales de médula ósea. A través del estudio de 71 tumores de NB, marcando con CD163 se logró demostrar que existe una mayor concentración de TAMs en aquellos NB metastásicos en comparación con aquellos limitados a la enfermedad local (39). Un grupo de Estados Unidos probó que las células

de NB tienen el potencial de dirigir la diferenciación de monocitos a TAMs y que estas células mielo-monocíticas favorecen el crecimiento del tumor y la metástasis a través de la liberación de IL-6 (36).

Un mecanismo que sostiene la idea del rol pro-metastásico de la IL-6 en NB, está respaldada por el hecho de que las células de NB no son capaces de producir factores activadores de osteoclastos, pero pueden liberar galectina-3 (gal-3) soluble la cual estimula a las células estromales de médula ósea para que produzcan IL-6 (40, 41). La proteína gal3 se encontró en células tumorales y en la matriz extracelular adyacente en el 96% de 78 tumores primarios de NB que fueron examinados por inmunohistoquímica (41). Además, mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* se logró mostrar que la IL-6 derivada de células estromales de la médula ósea promueve un crecimiento más rápido y sobrevida de líneas celulares de NB a través de la fosforilación de ERK y de STAT3, demostrando su efecto parácrino en dichas células tumorales (12).

Se mostró además que existe una vía interactiva IL-6/IL-6R/STAT3 entre las células de NB y las de su MT, que contribuye a la resistencia a las drogas terapéuticas (42) a través de la resistencia a la apoptosis (43, 44). La inhibición selectiva de la cascada de señalización de IL-6 podría lograr modular sus efectos patológicos, aunque su inhibición sistémica inevitablemente llevaría a neutralizar también sus funciones protectoras (45). Las terapias actuales de pacientes con NB de alto riesgo mejoran la sobrevida, sin embargo, aproximadamente el 40% de los pacientes recae durante o al finalizar su tratamiento (46).

Dependiendo del MT, las citocinas pueden modular una respuesta antitumoral, o inducir transformación celular y malignidad, obedeciendo al balance entre el perfil pro o anti-inflamatorio de las mismas, su concentración relativa, la expresión de sus receptores y el estado de activación de las células circundantes (47). Conociendo que cada IL es interferida directa o indirectamente por la acción de otra, el efecto aislado de sólo una, puede no ser tan relevante a menos que sea evaluada en el contexto de su posición en una cascada definida, considerando retroalimentaciones tanto positivas como negativas, homeostasis y control inmunológico (48). Identificando los mecanismos por los cuales la inflamación está desregulada en los procesos tumorigénicos como en NB, se puede llegar a obtener nuevos enfoques terapéuticos.

En base a todo lo mencionado, conociendo que la IL-6 promueve la angiogénesis (49) y que ésta favorece la progresión y metástasis de los tumores sólidos como el NB (50) principalmente a través de la vía de trans-señalización; teniendo en cuenta que la cantidad de muestras analizadas fue escasa, queda abierta la discusión sobre la posibilidad de proponer estudios a gran escala en los cuales se evalúe la fuente principal de IL-6 en pacientes con NB, se establezca un valor de corte adecuado para población pediátrica y se puedan relacionar directamente los niveles de la IL con estadios de riesgo.

Sería fundamental estudiar a IL-6 como factor pronóstico, y posible blanco terapéutico valorando la posibilidad del

bloqueo selectivo, cooperando con las terapias citocidas ya existentes, a fines de lograr una disminución de la resistencia al tratamiento, evitar las neoformaciones tumorales y alcanzar una mayor sobrevida libre de eventos.

### Agradecimientos

- .A mi esposo y mi familia, por su apoyo continuo.
- .A Cecilia García Oro (directora del proyecto y tutora) y a María Alicia Soriano, por colaborar con su conocimiento y por su guía en el camino de la Inmunología aplicada.
- .A Lucrecia Barbero, por su colaboración constante durante todo el proceso que duró la realización de este proyecto.
- .A los integrantes del Servicio de Oncohematología del Hospital Infantil Municipal.
- .A la comisión de la Especialidad en Bioquímica Clínica en Inmunología por su colaboración para llevar a cabo este trabajo.
- .A Adriana Gruppi por su colaboración con el reactivo utilizado, y su apoyo constante.
- .Al Servicio de Laboratorio de Serología e Inmunología del Hospital Nacional de Clínicas.
- .A Lourdes Aparicio, por su colaboración con la Estadística mostrada.

### Referencias bibliográficas

1. Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* (2008); 454: 436-444.
2. Vendramini-Costa D.B., Carvalho J.E. Molecular links between Inflammation and Cancer. *Current pharmaceutical Design* (2012); 18: 3831-3852.
3. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* (2011); 144 (5): 646-674.
4. Maccioni M., Nocera D. Relaciones peligrosas: inflamación, inmunidad y cáncer. *Bitácora digital UNC* (2013); 1 (3).
5. Morgenstern D., Anderson J. Inflammation: what role in pediatric cancer?. *Pediatr Blood Cancer* (2012); 58: 659-664.
6. Candido J., Hagemann T. Cancer related inflammation. *J Clin Immunol.* (2013); 33 (1): 79-84.
7. Kline N., Sevier N. Solid Tumors in children. *Journal of Pediatric Nursing* (2003); 18 (2).
8. NIH, Instituto Nacional del Cáncer (2016) página web oficial: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/neuroblastoma/pro/t ratamiento-neuroblastoma-pdq#>
9. Louis C., Shohet J. Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy. *Annu. Rev. Med.* (2015); 66: 49-63.
10. Cohn S. y col. Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma. *Journal of Clin. Oncol.* (2015).
11. Equipo médico del Hospital Infantil Municipal. Manual de Protocolos del Servicio de Oncología del Hospital Infantil Municipal, Córdoba (Argentina); pág. 256-263.
12. Ara T. y col. Interleukin-6 in the bone marrow microenvironment promotes the growth and survival of neuroblastoma cells. *Cancer Res.* (2009); 69 (1): 329-337.



13. Schulte J., Eggert A. Neuroblastoma. *Critical Reviews TM in Oncogenesis* (2015); 20 (3-4): 245-270.
14. Moreno F., Dussel V., Abriata G., Loria D., Orellana L. *Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino*. (2012); 1ra edición. Buenos Aires, Instituto Nacional del Cáncer. Neuroblastoma: pág. 81-85.
15. Ratner N., Brodeur G., Dale R., Schor N. The 'Neuro' of Neuroblastoma: Neuroblastoma as a Neurodevelopmental Disorder. *Ann. Neurol* (2016).
16. Ataie-Kachoe P., Pourgholami M.H., Morris D.L. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2013); 24: 163-173.
17. Ataie-Kachoe P. y col. Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). *J Clin Pathol* (2014).
18. Kishimoto T. Interleukin 6: from basic science to medicine – 40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* (2005); 23: 1-21.
19. Rath T. y col. From physiology to disease and targeted therapy: interleukin-6 in inflammation and inflammation-associated carcinogenesis. *Arch Toxicol* (2015).
20. Tanaka T., Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol. Res.* (2014); 2 (4).
21. Hunter C., Jones S. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology* (2015); 16 (5).
22. Wolf J. y col. Interleukin-6 and its receptors: A highly regulated and dynamic system. *Cytokine* (2014).
23. Scheller J. y col. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta* (2011); 1813: 878-888.
24. Chalaris A. y col. The soluble interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *European Journal of Cell Biology* (2011); 90: 484-494.
25. Fisher D.T., Appenheimer M.M., Evans S.S. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin Immunol.* (2014); 26 (1): 38-47.
26. Ara T., DeClerck Y. Interleukin-6 in bone metastasis and Cancer progression. *Eur J Cancer.* (2010); 46 (7): 1223-1231.
27. Egler R.A., Burlingame S., Nuchtern J., Russell H. Interleukin-6 and soluble IL-6 receptor levels as markers of disease extent and prognosis in neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* (2008); 14 (21): 7028-7034.
28. Marugan Miguelsanz J.M., y col. Niveles normales de interleucinas 6 y 8 en suero y orina de niños sanos asintomáticos. *Bol Pediatr* (2005); 45: 177-184.
29. Gomes M., Coelho A., Araújo A., Azevedo A., Teixeira A.L., Catarino R., y col. IL-6 polymorphism in non-small cell lung cancer: A prognostic value?. *Tumour Biol* (2015); 36: 3679-3684.
30. Dethlefsen C, Højfeldt G, Hojman P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* (2013); 138: 657-664.
31. Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6 – A key regulator of colorectal cancer development. *Int J Biol Sci* (2012); 8: 1248-1253.
32. Macciò A, Madeddu C. The role of interleukin-6 in the evolution of ovarian cancer: Clinical and prognostic implications - A review. *J Mol Med (Berl)* (2013); 91: 1355-1368.
33. Quirui Wang y col. Vascular niche IL-6 induces alternative macrophage activation in glioblastoma through HIF-2 $\alpha$ . *Nature Communications* (2018); 9: 559.
34. Rosean, Timothy y col. Preclinical validation of interleukin 6 as a therapeutic target in multiple myeloma. *Immunol. Res.* (2014); 59(0): 188-202.
35. Vlad-Vasile Pop y col. IL-6 – Molecular pathway and clinical implication in pancreatic cancer – A systemic review. *Immunology Letters* (2017); 181: 45-50.
36. Song L., Asgharzadeh S., Salo J., y col. Valpha24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. *J Clin Invest* (2009); 119: 1524-1536.
37. Russell H.V., Ara T., y col. A Phase I Study of Zoledronic Acid and Low Dose Cyclophosphamide in Recurrent/Refractory Neuroblastoma: A New Approaches to Neuroblastoma Therapy (NANT) Study. *Pediatr Blood Cancer* (2011); 57 (2): 275-282.
38. Hansford L.M. y col. Mechanisms of embryonal tumor initiation: distinct roles for MycN expression and MYCN amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004); 101: 12664-12669.
39. Asgharzadeh S. y col. Clinical significance of tumor-associated inflammatory cells in metastatic neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* (2012); 30: 3525-3532.
40. Fukaya Y., Shimada H. y col. Identification of galectin-3-binding protein as a factor secreted by tumor cells that stimulates interleukin-6 expression in the bone marrow stroma. *The Journal of biol. Chemistry* (2008); 283 (27): 18573-18581.
41. Silverman A.M. y col. A galectin-3-dependent pathway upregulates interleukin-6 in the microenvironment of human neuroblastoma. *Cancer Res* (2012); 72 (9).
42. Ara T. y col. Critical role of STAT3 in IL-6-mediated drug resistance in human neuroblastoma. *Cancer Res.* (2013); 73 (13): 3852-3864.
43. Chung T.D. y col. Interleukin-6 activates phosphatidylinositol-3 kinase, which inhibits apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Prostate.* (2000); 42 (1): 1-7.
44. Garcia-Tunon I. y col. IL-6, its receptors and its relationship with bcl-2 and bax proteins in infiltrating and in situ human breast carcinoma. *Histopathology* (2005); 47 (1): 82-89.
45. Drutskaya M.S. y col. Interleukin-6: from molecular mechanisms of signal transduction to physiological properties and therapeutic targeting. *Molecular Biology* (2015); 49 (6): 837-842.
46. Yu A.L., Gilman A.L. y col. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* (2010); 363: 1324-1334.
47. Landskron G., De la Fuente M., Thuwajit P., Thuwajit C., Hermoso M. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of Immunol. Research* (2014).

48. Lippitz B. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.* (2013); 14: 218-228.
49. Middleton K. y col. Interleukin-6: an angiogenic target in solid tumors. *Critical Rev. in Oncology/Hematology* (2014); 89: 129-139.
50. Sohara y col. Mechanism of bone invasion and metastasis in human neuroblastoma. *Cancer Letters* (2005); 228: 203-209.