

Valor pronóstico de los niveles séricos de la Interleukina-6 en Linfoma No Hodgkin

Priva Zabner de Oziel, Claudia Galizia, Rosa Somoza, Valentina Wallis, Jean Desenne, Marina González, Antonieta Natale, Gretta Acquatella, Marisela Morales, Yasmín Ordóñez, María Alejandra Torres, Ana Monzón de Orozco, Aixa Müller

RESUMEN

La Interleukina-6 (IL-6) es una potente citoquina inmunomoduladora identificada como factor pronóstico en Linfoma No Hodgkin (LNH). El objetivo del trabajo fue investigar el valor pronóstico de la IL-6 en pacientes con LNH, su correlación con las características clínico-patológicas, los marcadores biológicos: lactato deshidrogenasa (LDH), Beta 2 microglobulina (B2M), Proteína C reactiva (PCR), Velocidad de sedimentación globular (VSG), Aspartato aminotransferasa (AST), Alanina amino transferasa (ALT) y Fosfatasa alcalina (FALC); el Índice Pronóstico Internacional (IPI), la evolución clínica y sobrevida. Se recolectaron muestras de suero de 61 pacientes con Linfoma No-Hodgkin (LNH) antes de iniciar el tratamiento, de edad promedio 52 años (rango 19-78 años), de los cuales 46 casos (76%) se clasificaron como linfomas agresivos y 15 casos (24%) como linfomas indolentes. Según el IPI, 13 casos (21%) se categorizaron de alto riesgo y 48 (79%) de bajo riesgo. El tiempo promedio de seguimiento de la enfermedad correspondió a 30 meses (rango 3-48 meses). Se procesaron 20 muestras de controles sanos donantes del Banco de Sangre. Las muestras de los pacientes y los controles se conservaron a -70°C hasta su procesamiento. La IL-6 se determinó aplicando el método de inmunoensayo enzimático adsorbente (ELISA), sensibilidad <0,7 pg/ml y los marcadores biológicos: B2M, PCR, VSG, LDH, ALT, AST y FALC, por métodos de Inmunoensayo enzimático sobre micropartículas (MEIA), aglutinación directa, Wintrobe, y cinético, respectivamente. Los niveles séricos de IL-6 en los pacientes con LNH (mediana 3,03 pg/ml, rango <0,7-267), fueron significativamente superiores al grupo control (mediana <0,7 pg/ml, rango <0,7-1,99) $p < 0,05$. Resultaron significativamente elevados en pacientes con: >2 regiones extraganglionares ($p = 0,03$), enfermedad voluminosa >10cm ($p=0,04$) y niveles elevados de: LDH ($p=0,0001$), B2M ($p=0,0001$), PCR ($p=0,0001$), AST ($p=0,0001$), y VSG ($p=0,01$). Los pacientes de alto riesgo presentaron niveles de IL-6 significativamente superiores al grupo de bajo riesgo ($p=0,04$). Las concentraciones de IL-6 se correlacionaron significativamente de forma lineal y directa con: síntomas B, IPI, LDH, B2M, PCR y AST ($p<0,05$). Se detectaron niveles elevados de IL-6 (> 1,99 pg/ml) en el 46% de los pacientes que entraron en remisión completa, el 52% de los que entraron en remisión parcial, el 75% con progresión de enfermedad y el 63% de los fallecidos. En el grupo total de los pacientes con LNH, la sobrevida global de los pacientes con niveles elevados de IL-6 fue significativamente inferior comparada con el grupo de pacientes con niveles séricos de IL-6 normales ($p=0,007$). Los resultados obtenidos sugieren la significancia de niveles elevados de IL-6 como marcador pronóstico adverso en pacientes con LNH.

Palabras clave: Interleukina-6, Linfoma No Hodgkin, factores pronósticos.

Prognostic value of serum interleukin-6 in Non Hodgkin's Lymphoma

SUMMARY

Interleukin-6 (IL-6) is a potent immunomodulatory cytokine being identified as a prognostic factor for Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL). The aim of this study was to investigate the prognostic value of IL-6 in patients with NHL, its correlation with the clinical - pathological - characteristics, and the biological markers: Serum Lactate Dehydrogenase (LDH), Beta 2 microglobulin (B2M), C-Reactive Protein (CRP), Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR), Serum Aspartate Transaminase (AST), Serum Alanine Transaminase (ALT), Serum Alkaline Phosphatase (ALP); the International Prognostic Index (IPI), the clinical following-up and the survival. 61 serum samples were collected from patients with NHL before starting the treatment; the mean age of the patients group was 52 years (range 19-78 years old), 46 cases (76%) were classified as aggressive lymphomas and 15 cases (24%) as indolent lymphomas. According to the IPI, 13 cases (21%) were classified as high risk group and 48 cases (79%) as low risk group. The average time of following-up was 30 months (range 3-48 months). 20 healthy control samples, coming from blood bank donors were taken. All patients and control samples were kept at -70°C until their processing. The IL-6 was determined applying the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) sensitivity < 0.7 pg/ml, and the biological markers: B2M, CRP, ESR, LDH, AST, ALT and ALP by the method of micro particle enzyme immunoassay (MEIA), direct agglutination, wintrobe and kinetic respectively. The IL-6 serum levels in the patients (median 3.03 pg/ml, range < 0.7-267), were significantly higher than the control group (median < 0.7 pg/ml, range < 0.7-1.99) $p < 0.05$. The IL-6 serum concentrations resulted significantly elevated in patients with: more than 2 extranodal sites ($p=0.03$), bulky disease > 10 cm ($p=0.04$) and increased values of: LDH ($p=0.0001$), B2M ($p=0.0001$), CRP ($p=0.0001$), AST ($p=0.0001$) and ESR ($p=0.01$). The high risk patients showed up IL-6 levels significantly higher than the low risk group

Dirección: Instituto de Oncología y Hematología (IOH), U.C.V.- M.S.: Unidad de Linfoma, Laboratorio de Inmunología, Laboratorio General.
Solicitar copia a: Priva Zabner de Oziel: privaoziel@hotmail.com

($p=0.04$). The IL-6 levels were significantly correlated in a linear and direct way with: B symptoms, IPI, B2M, LDH, CRP and AST ($p<0.05$). The IL-6 levels were elevated (> 1.99 pg/ml) in the following groups of patients: 46% of the patients who had a complete remission, 52% of the patients who had a partial remission response, 75% with disease progression and 63% of the non survivors. In the whole group, patients with elevated serum IL-6 levels had inferior overall survival ($p= 0.007$) compared with those with normal serum IL-6 levels. Our research results suggest that IL-6 elevated levels can be helpful as a prognostic marker in NHL patients.

Key words: Interleukin-6, Non Hodgkin's Lymphoma, prognostic factors.

Introducción

Los Linfomas No Hodgkin (LNH) son un grupo heterogéneo de neoplasias linfoides que presentan una diversidad de cuadros clínicos y diferentes respuestas al tratamiento. Su incidencia ha aumentado notablemente en los últimos 30 años. En la mayoría de los casos las causas del LNH son desconocidas, aún cuando se han asociado factores de riesgo como inmunodeficiencias, agentes infecciosos, infección por VIH-SIDA, enfermedades autoinmunes, desórdenes linfoproliferativos post-transplante, alteraciones genéticas, edad, sexo, medio ambiente, exposición ocupacional, dietas y otras exposiciones (1-8).

En cuanto a la patogénesis, los LNH resultan de la expansión clonal de linfocitos B ó T que son transformados en diferentes etapas durante el proceso de diferenciación y maduración (1-4).

La aplicación de marcadores clínicos y biológicos de significancia pronóstica son útiles para el abordaje de los pacientes con LNH. En este sentido, el Índice Pronóstico Internacional (IPI) (9), comprende cinco (5) factores de riesgo: edad mayor de 60 años, estadio clínico III - IV (enfermedad avanzada), número de áreas extraganglionares > 1 , estado funcional alterado (Karnofsky $< 70\%$) y niveles elevados de lactato deshidrogenasa (LDH $> 100\%$ del valor referencial), permitiendo la categorización de los pacientes en cuatro (4) grupos de riesgo, en base al número de factores adversos: bajo riesgo (ninguno o un solo factor), riesgo intermedio bajo (dos factores), intermedio alto (tres factores) y alto riesgo (cuatro o cinco factores). Este modelo predictivo originalmente fue establecido para los LNH agresivos y posteriormente fue validado para todos los grados de malignidad, siendo útil para el diseño y selección de protocolos terapéuticos (10).

En los años subsiguientes a la publicación del IPI se han estudiado una variedad de marcadores biológicos que pudieran complementar la información aportada por el IPI. En relación a la patogénesis de los LNH, las citoquinas juegan un rol de importancia, como factor pronóstico relacionado con la respuesta del paciente frente al tumor y su respuesta inmunológica (11). Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, producidas por linfocitos y macrófagos y actúan en forma autocrina y paracrina. Funcionan regulando las

respuestas inmune e inflamatoria, la hematopoyesis, las respuestas de fase aguda y otros procesos biológicos (12).

La Interleukina-6 (IL-6) es una potente citoquina inmunomoduladora y pleiotrópica, originalmente identificada como el factor 2 estimulante de células B, y ha mostrado tener un significado patogénico y pronóstico en LNH. Es un potente factor de crecimiento y diferenciación, producido por varios tipos celulares que incluyen linfocitos T y B normales y neoplásicos, monocitos, macrófagos, fibroblastos y hepatocitos. Estimula la secreción de reactantes de fase aguda, induce fiebre y sudoración, siendo un inductor de la síntesis de fibrinógeno hepático e inhibidor de la síntesis hepática de la albúmina y raramente es detectada o se encuentra en muy bajas concentraciones en el suero de individuos sanos. Los niveles de IL-6 se han correlacionado con el pronóstico y la sobrevida en pacientes con LNH de diferentes grados de malignidad (13-15).

En el presente estudio nos proponemos investigar el valor pronóstico de los niveles de la IL-6 en pacientes con Linfoma No Hodgkin, su correlación con las características clínico patológicas y marcadores biológicos tales como: Lactato deshidrogenasa (LDH), Beta 2 Microglobulina (B2M), Proteína C reactiva (PCR), Aspartato Amino Transferasa (AST/SGOT), Alanina Amino Transferasa (ALT/SGPT), Fosfatasa alcalina (FALC), y Velocidad de sedimentación globular (VSG), así como su relación con la evolución clínica y sobrevida de los pacientes.

Materiales y métodos

Pacientes

Se evaluaron 61 pacientes con diagnóstico de Linfoma No-Hodgkin (LNH) confirmado clínica e histopatológicamente, los cuales acudieron a la consulta de linfoma del Instituto de Oncología y Hematología U.C.V.- Ministerio de Salud, durante el período 1999 al 2004, siendo el tiempo promedio de seguimiento de la enfermedad de 30 meses (rango 3 - 48 meses). Se incluyeron pacientes sin recibir tratamiento previo y con serología VIH negativo. Se excluyeron del estudio pacientes con enfermedades asociadas tipo diabetes, insuficiencia renal y otras, con LNH previamente tratado y pacientes VIH positivo.

Los pacientes se clasificaron histopatológicamente según la

clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (16). Para la estadificación de los pacientes se aplicó el sistema de clasificación de ANN ARBOR: siendo los estadios I- II (enfermedad localizada), y estadios III- IV (enfermedad avanzada) (17). El estado funcional de los pacientes se determinó aplicando la escala de Karnofsky (18). De acuerdo al IPI se clasificaron los grupos de riesgo: bajo riesgo (favorable e intermedio bajo) y alto riesgo (intermedio alto y alto riesgo). En la práctica clínica con fines pronósticos los LNH se subdividieron en dos categorías: linfomas indolentes y agresivos.

Grupo control:

Se incluyeron 20 individuos aparentemente sanos, donantes de Banco de Sangre, para establecer los valores de referencia (VR) de la determinación de los niveles séricos de la IL-6.

Evolución clínica:

Los pacientes se trataron con esquemas de primera línea establecidos internacionalmente para los Linfomas No Hodgkin.

La evaluación clínica se consideró bajo los siguientes criterios (19):

Remisión completa (R.C.): se define como la desaparición de todas las manifestaciones clínicas y signos de la enfermedad, con normalización de las alteraciones radiológicas y de los datos bioquímicos que fueran anormales antes de iniciar la quimioterapia. Una vez finalizado el tratamiento, la respuesta se mantendrá, al menos tres meses. En caso de infiltración de la médula ósea, la desaparición de la enfermedad morfológica/histológica, deberá ir unida a normalización de las cifras hematológicas periféricas (<12 g/dl de Hb, > 100.000 plaquetas/mm³ y > 1.500 granulocitos/mm³).

Remisión Parcial (R.P > 50%): Se define como la reducción del 50% o más de la enfermedad medible durante al menos un mes. Debe haber ausencias de citopenias periféricas.

Progresión: Aumento en la frecuencia o en la severidad de los síntomas, o aparición de nuevas áreas afectadas, o progresión de mas de un 25% en las localizaciones tumorales iniciales.

Sobrevida Global (S.G.): Es el tiempo transcurrido desde que se hace el diagnóstico y se inicia o no un tratamiento hasta la muerte ocasionada por la enfermedad inicial que se esta evaluando o hasta la fecha del último control.

Sobrevida Libre de Enfermedad (S.L.E.): Es el tiempo transcurrido entre la fecha de RC y la nueva aparición de síntomas y signos de enfermedad (recaída).

Métodos:

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa, antes de la administración del tratamiento. Para la muestra de sangre total se utilizaron tubos con anticoagulante EDTA y para la obtención del suero tubos estériles sin anticoagulante, los cuales se centrifugaron a 2500 rpm, por 10 min y se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento. Las muestras de suero de pacientes y controles se procesaron bajo las mismas condiciones.

Interleukina - 6 (IL-6):

Los niveles de IL-6 se determinaron en las muestras de suero de pacientes, estándares y controles, aplicando un ensayo inmunoabsorbente (ELISA), cuantitativo tipo sándwich (Quantikine: R&D Systems, catalogo D6050).

Se adicionaron 100 µl de las muestras, controles y estándares, a una microplaca de poliestireno de 96 pozos, presentando un anticuerpo monoclonal murino anti-IL-6 fijado a la fase sólida (anticuerpo de captura), y se incubó por dos (2) horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron cuatro (4) ciclos de lavados con solución de buffer para remover las proteínas no fijadas. Seguidamente se agregaron 200 µl de un anticuerpo policlonal anti - IL-6 conjugado con peróxidasa de rábano y se incubó por dos (2) horas. Terminado este periodo, se realizaron cuatro (4) lavados para remover el reactivo anticuerpo policlonal - enzima, no fijado al complejo antígeno- anticuerpo formado en la primera fase del ensayo. A continuación, se añadieron a los pozos 200 µl de la solución sustrato (peróxido de hidrógeno - cromógeno tetrametilbenzidina) y se incubó por 20 min a temperatura ambiente, produciéndose el desarrollo de color proporcional a la concentración de IL-6 originalmente presente en la muestra. El desarrollo de color se detuvo por la adición de 50 µl de la solución de parada (Acido sulfúrico 2N) y la intensidad del color se cuantificó mediante un lector de microplacas a una longitud de onda de 450nm.

Nivel de sensibilidad del ensayo: 0,70 pg/ml.

LDH, AST, ALT Y FALC: Las enzimas se analizaron por métodos cinéticos UV, utilizando un Autoanalizador de química sanguínea (Hitachi modelo 704 Roche): LDH (VR: 80-285 u/l, Invelab catálogo N 89289), ALT (VR: ≤ 38 u/l, Roche catalogo 851121), AST (VR: ≤ 41 u/l, Roche catálogo 851132), FALC (VR: ≤ 290 u/l, Roche catálogo N° 816388)

PCR: Se utilizó el método semicuantitativo, prueba directa de aglutinación en placa (Wiener Lab. Lot.006531). VR: ≤ 6 mg/dl.

B2M: Se determinó mediante el método de Inmunoensayo enzimático sobre micropartículas (MEIA), sistema IMX. (Abbot, cat. N 69-2197/R11). VR: $\leq 3,4$ mg/dl.



Indicadores hematológicos: VSG por el método Wintrobe 1h, VR: 0-15 mmh.

Analisis estadístico:

Se aplicaron las pruebas estadísticas no paramétricas: Test U-Mann-Whitney para determinar las diferencias en la distribución de los marcadores entre los grupos, expresadas por la mediana y el Coeficiente de correlación de Spearman rank-sum para determinar la correlación entre los factores pronósticos. Se aplicó la prueba exacta de Fisher para el análisis de las frecuencias; las curvas de supervivencia se analizaron por el método de Kaplan-Meier y la prueba de Log-rank, para establecer la significancia estadística de los factores pronósticos.

La significancia estadística se estableció como $p = 0,05$.

Resultados:

Características clínico-patológicas y marcadores biológicos de los pacientes con LNH:

En el presente estudio se evaluaron 61 pacientes con LNH. En la Tabla 1 se muestran las características clínico-patológicas: 69% de los pacientes con edad $>$ de 60 años (rango 19-84 años), 59% del sexo femenino, 61% correspondió al subtipo histológico linfoma difuso de células grandes tipo "B". En relación a las categorías pronósticas el 75% correspondió a LNH agresivos y el 25% a LNH indolentes. El 56% de los pacientes presentaron enfermedad avanzada (estadio clínico III-IV), 10% estado funcional alterado, 66% con afectación extraganglionar $>$ 1 región, 46% presentaron síntomas B, 66% enfermedad voluminosa $>$ 10 cm. El 18% presentaron compromiso de médula ósea y el 54% enfermedad abdominal. Respecto al IPI, el 79% correspondió a LNH de bajo riesgo y el 21% de alto riesgo.

En la Tabla 2 se observan los marcadores biológicos evaluados en la población estudiada. El 15%, 21%, 13%, 13%, 18%, 41% y el 43% de los pacientes evaluados presentaron respectivamente niveles elevados de LDH, B2M, AST, ALT, FALC, PCR y VSG, en base a los valores de referencia establecidos. Se consideraron niveles elevados de LDH a los valores mayores al 100% del límite superior del valor de referencia (9).

Niveles séricos de IL-6 en controles sanos:

La distribución de los niveles séricos de IL-6 determinados en la población de controles sanos no correspondió a una distribución gaussiana, estableciéndose el rango de referencia de $< 0,7 - 1,99$ pg/ml, con un valor de mediana de 0,7 pg/ml. Valores de IL-6 superiores al criterio de positividad (1,99 pg/ml) se consideraron elevados.

Tabla 1. Características clínico-patológicas de los pacientes con Linfoma No Hodgkin.

Características		N (61)	%
Edad	≤ 60 años	19	31
	> 60 años	42	69
Sexo	Masculino	25	41
	Femenino	36	59
Clasificación histológica	Difuso de células grandes	37	61
	Células del manto	1	1
	Parecido Burkitt	1	2
	Células grandes anaplásicas T	3	5
	Células T periféricas	2	3
	Inmunoblastico	2	3
	Folicular	6	10
	Linfocítico pequeño	4	7
	Tipo maltoma	2	3
Categorías	Micosis fungoide	3	5
Categorías	Agresivos	46	75
	Indolentes	15	25
Estadio clínico	I-II	27	44
	III-IV	34	56
Estado funcional Karnofsky	$\leq 70\%$	6	10
	$> 70\%$	55	90
Enfermedad extraganglionar	≤ 1	21	34
	> 1	40	66
Síntomas B	Ausente	33	54
	Presente	28	46
Enfermedad voluminosa	≤ 10 cm	21	34
	> 10 cm	40	66
Compromiso de médula ósea	Ausente	50	82
	Presente	11	18
Enfermedad abdominal	Ausente	28	46
	Presente	33	54
IPI	Bajo riesgo	48	79
	Alto riesgo	13	21

IPI: Índice pronóstico internacional
Bajo riesgo (bajo e intermedio bajo)
Alto riesgo (intermedio alto y alto riesgo)

Niveles séricos de IL-6 en pacientes con LNH:

Los pacientes con LNH presentaron niveles de IL-6 (mediana 3,03 pg/ml, rango $< 0,7-267$), significativamente superiores al grupo control (mediana 0,7 pg/ml, rango $< 0,7-1,99$) $p < 0,05$.

Tabla 2. Valores de los marcadores biológicos en pacientes con Linfoma No Hodgkin.

Marcadores		Nº pacientes (61)	%
LDH*	≤ 570 U/L	52	85
	> 570 U/L	9	15
B2M	≤ 3,4 mg/l	48	79
	> 3,4 mg/l	13	21
AST	≤ 38 U/L	53	87
	> 38 U/L	8	13
ALT	≤ 41 U/L	53	87
	> 41 U/L	8	13
FALC	≤ 290 U/L	50	82
	> 290 U/L	11	18
PCR	≤ 6 mg/dl	36	59
	> 6 mg/dl	25	41
VSG	≤ 15 mmh	20	57
	> 15 mmh	15	43
Valor desconocido		26	

PCR: Proteína C Reactiva
FALC: Fosfatasa alcalina
B2M: Beta 2 microglobulina
ALT: Alanina amino transferasa
AST: Aspartato amino transferasa
VSG: Velocidad de sedimentación globular
LDH*: Lactato deshidrogenasa
(100% del límite superior del valor de referencia)

De los 61 pacientes evaluados, 35 (57%) presentaron niveles séricos de IL-6 significativamente elevados (> 1,99 pg/ml) y 26 (43%) niveles indetectables o por debajo del nivel de sensibilidad del ensayo (0,70 pg/ml) $p < 0.05$ (Tabla 3).

Tabla 3. Niveles séricos de IL-6 en pacientes con Linfoma No Hodgkin.

Niveles séricos de IL-6	≤ 1,99 pg/ml	> 1,99 pg/ml	p*
No. Total de Pacientes = 61			
No. de pacientes (%)	26 (43%)	35 (57%)	
Mediana	0,22	8,03	< 0,05
Rango	< 0,7 - 1,99	< 0,7 - 267	

*p significativa = 0,05. Prueba U-Mann-Whitney.

Asociación de niveles séricos de IL-6 con las características clínico-patológicas y los marcadores biológicos en los pacientes con LNH:

La Tabla 4 presenta la asociación de los niveles séricos de IL-6 con las características clínico – patológicas de los pacientes evaluados. Los niveles de IL-6 resultaron significativamente elevados en los pacientes que presentaron las siguientes características clínico-

patológicas: afectación de mas de 1 área extranodal (mediana 3,03 pg/ml, rango 0,7-70,8) $p=0.03$ y enfermedad voluminosa > de 10 cm (mediana 3,70 pg/ml, rango 3.87-267) $p=0.03$.

Tabla 4. Asociación de los niveles de IL-6 con las características clínico-patológicas de los pacientes con Linfoma No Hodgkin.

Características		N (61)	Mediana (pg/ml)	Rango	p *
Edad	≤ 60 años	19	2,72	1,47-74,8	0,81
	> 60 años	42	3,29	3,87-66,83	
Estadio clínico	I-II	27	1,79	1,68-66,8	0,07
	III- IV	34	3,60	0,7-267	
Estado Funcional Karnofsky	≤ 70 %	6	9,64	23,7-66,8	0,15
	> 70 %	55	2,72	0,7-70,78	
Enfermedad extraganglionar	≤ 1	21	1,93	1,68-74,8	0,03
	> 1	40	3,03	0,7-267	
Enfermedad voluminosa	≤ 10 cm	21	1,68	1,47-70,7	0,04
	> 10 cm	40	3,70	3,87-267	
Enfermedad abdominal	Ausente	28	3,20	1,68 -267,1	0,80
	Presente	33	2,41	1,47 - 70,7	
IPI	Bajo riesgo	48	2,60	0,7-74,8	0,04
	Alto riesgo	13	8,03	3,55-267	
Síntomas B	Ausente	33	1,00	3,03-74,8	0,80
	Presente	28	7,30	1,68-23,7	
Compromiso de medula ósea	Ausente	50	3,29	0,7-74,8	0,59
	Presente	11	2,93	1,68-40,29	

IPI: Índice pronostico internacional
p* significativa = 0,05. Test U-Mann-Whitney
Bajo riesgo (bajo e intermedio bajo)
Alto riesgo (intermedio alto y alto riesgo)

En relación a los marcadores biológicos (Tabla 5), los niveles de IL-6 se asociaron significativamente con niveles elevados de: LDH (mediana 12,61 pg/ml, rango 0,7-267) $p=0,0001$, B2M (mediana 9,17 pg/ml, rango 3,87-70,8) $p=0,0001$, PCR (mediana 8,86 rango 1,47-74,8) $p=0,0001$ y AST (mediana 11,30 pg/ml, rango 4,8-267) $p=0,0001$.

Tabla 5. Asociación de los niveles de IL-6 con las características biológicas de los pacientes con Linfoma No Hodgkin.

Variables		N (61)	Mediana (pg/ml)	Rango	p *
LDH	≤570 U/L	52	2,36	6,05-40,29	0,0001
	> 570 U/L	9	12,61	0,7-267	
B2M	≤3,4 mg/l	48	1,79	0,7-66,8	0,0001
	> 3,4 mg/l	13	9,17	3,87-70,8	
AST	≤ 38 U/L	53	2,05	1,68-74,8	0,0001
	> 38 U/L	8	11,30	4,8-267	
ALT	≤ 41 U/L	53	2,87	0,7-74,8	0,55
	> 41 U/L	8	4,59	1,47-70,9	
FALC	≤ 290 U/L	50	2,93	0,7-267	0,94
	> 290 U/L	11	3,03	3,03-74,8	
PCR	≤6 mg/dl	36	0,85	0,7-25,1	0,0001
	>6 mg/dl	25	8,86	1,47-74,8	
VSG	≤ 15 mmH	20	49	0,7-3,66	0,01
	> 15 mmH	15	25	0,7- 70,79	
Valor desconocido		26			

FALC: Fosfatasa alcalina

VSG: Velocidad de sedimentación globular

PCR: Proteína C reactiva

AST: Aspartato amino transferasa

B2M: Beta 2 microglobulina

ALT: Alanina amino transferasa

LDH: Lactato deshidrogenasa

(100% del límite superior del valor de referencia)

*p significativa = 0,05. Test U-Mann-Whitney

Asociación de los niveles séricos de IL-6 con los grupos de riesgo de acuerdo al IPI:

Los niveles de IL-6 resultaron significativamente elevados en los pacientes del grupo pronóstico de alto riesgo (mediana 8,03 pg/ml, rango 3,55-267) respecto al grupo pronóstico de bajo riesgo (mediana 2,60 pg/ml, rango 0,7-74,8) p=0,04.

Correlación de los niveles de IL-6 con las características clínico-patológicas y los marcadores biológicos en pacientes con LNH:

Los niveles de IL-6 se correlacionaron con las características clínico- patológicas (Tabla 6) y con los marcadores biológicos (Tabla 7). Se observó una correlación significativa directa y lineal con los siguientes marcadores: IPI p= 0,05, síntomas B p=0,0001, LDH p= 0,02 (Figura 1), B2M p=0,0001 (Figura 2), AST p= 0,05 (Figura 3), PCR p= 0,0001 (Figura 4) y VSG p= 0,0003.

Tabla 6. Correlación de los niveles séricos de IL-6 con las características clínico-patológicas en pacientes con Linfoma No Hodgkin.

Características	r	p*
Edad	0,07	0,62
Estadio Clínico	0,21	0,12
Estado Funcional	0,18	0,17
Enfermedad Extraganglionar	0,01	0,97
Enfermedad voluminosa	0,20	0,15
IPI	0,26	0,05
Síntomas B	0,50	0,0001
Enfermedad Abdominal	0,01	0,93
Medula ósea	0,10	0,46

IPI: Índice pronóstico internacional

p* significativa = 0,05. Coeficiente de correlación de Spearman rank-sum

Tabla 7. Correlación de los niveles séricos de IL-6 con los marcadores biológicos en pacientes con Linfoma No Hodgkin.

Características	r	p*
LDH	0,31	0,02
B2M	0,49	0,0001
AST	0,27	0,05
ALT	0,22	0,11
FALC	0,20	0,14
PCR	0,68	0,0001
VSG	0,62	0,0003

LDH : Lactato deshidrogenasa

PCR: Proteína C Reactiva

B2M: Beta 2 microglobulina

VSG: Velocidad de sedimentación globular

AST: Aspartato amino transferasa

FALC: Fosfatasa alcalina

ALT: Alanina amino transferasa

p* significativa = 0,05. Coeficiente de correlación de Spearman rank-sum

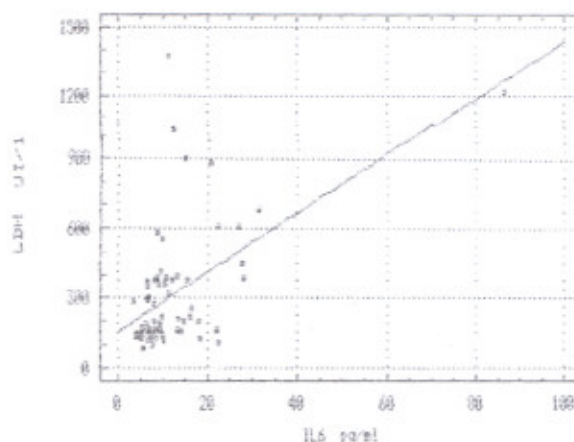


Figura 1. Correlación de los niveles séricos de IL- 6 con los niveles de LDH (r= 0,31, p= 0,02) Coeficiente de correlación Spearman rank-sum.

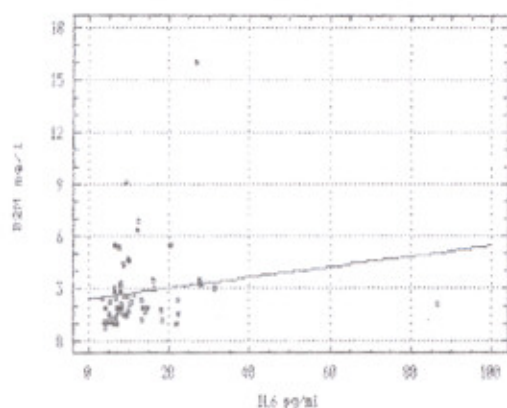


Figura 2. Correlación de los niveles séricos de IL-6 con las concentraciones de B2M ($r = 0.49$, $p = 0.0001$) Coeficiente de correlación Spearman rank sum.

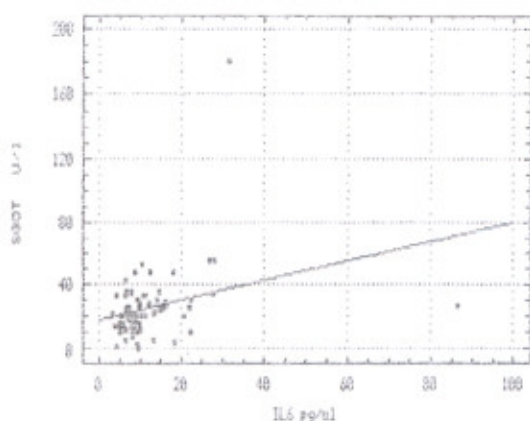


Figura 3. Correlación de los niveles séricos de IL-6 con los niveles de AST (SGOT) ($r = 0.27$, $p = 0.05$) Coeficiente de correlación Spearman rank sum.

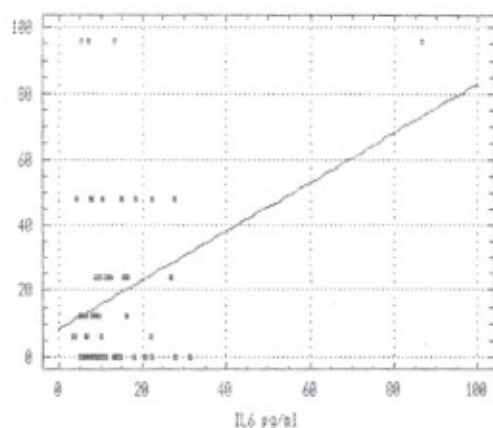


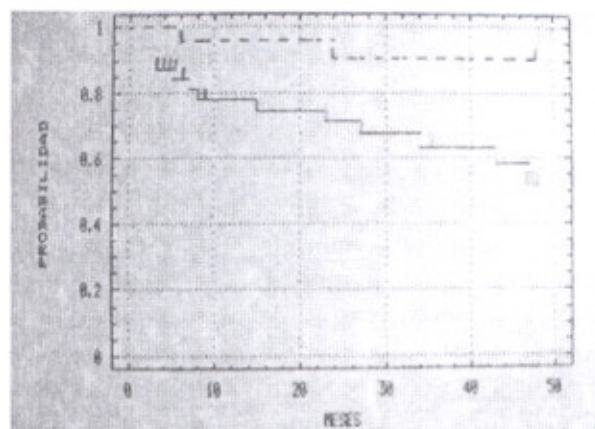
Figura 4. Correlación de los niveles séricos de IL-6 con las concentraciones de PCR ($r = 0.68$, $p = 0.0001$) Coeficiente de correlación Spearman rank sum.

Niveles séricos de IL-6 y evolución clínica de los pacientes con LNH:

En la Tabla 8 se observan los niveles de IL-6 antes de iniciar el tratamiento. Aunque no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos, se observaron niveles elevados de IL-6 (> 1.99 pg/ml) en el 46% de los pacientes que entraron en remisión completa, el 52% de los pacientes que respondieron parcialmente, 75% de los pacientes con progresión de la enfermedad y el 63 % de los pacientes que fallecieron.

Análisis univariado y sobrevida

Para el análisis de la sobrevida, el tiempo promedio del seguimiento clínico fue de 30 meses (rango 3- 48 meses). En el grupo total de los pacientes evaluados, el análisis univariado de la sobrevida mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a los niveles de la IL-6. La probabilidad de la SG de los pacientes con niveles elevados de IL-6 (> 1.99 pg/ml) fue significativamente inferior ($p = 0.007$) comparada con la del grupo de pacientes con niveles normales o indetectables (Figura 5). No se obtuvieron resultados significativos respecto a la SLE en el grupo total.



	N	Eventos
— Mayor de 1,99 pg/ml	35	15
- - - Menor de 1,99 pg/ml	26	3

$P = 0.007$

Figura 5. Curva de sobrevida global de acuerdo a los niveles séricos de IL-6 en el grupo total de pacientes con LNH. $p = 0.007$ Método Kaplan-Meier.

Se realizó el análisis univariado de las curvas de sobrevida global respecto a las diferentes variables pronósticas en los grupos de pacientes con LNH agresivos (Tabla 9) e indolentes (Tabla 10). En relación a la IL-6, el análisis univariado de las curvas de SG para el grupo de pacientes con LNH agresivos y LNH indolentes no mostraron diferencias estadísticamente significativas. No se obtuvieron resultados significativos en el análisis univariado de la SLE para ninguno de los grupos pronósticos anteriormente evaluados.

Tabla 8. Niveles séricos de IL-6 y evolución clínica de los pacientes con LNH.

Evolución clínica	Nº pacientes	%	Nº pacientes (IL-6 > 1,99 pg/ml)	%	Nº pacientes (IL-6 ≤ 1,99 pg/ml)	%	p*
Remisión completa (RC)	28	46	13	46	15	54	NS
Remisión parcial (RP)	25	41	13	52	12	48	NS
Respuesta global (RC+RP)	53	87	26	49	27	51	NS
Progresión	8	13	6	75	2	25	NS
Muerte	24	39	15	63	9	37	NS

P* significativa = 0,05 Prueba exacta de Fisher. NS: no significativa

Tabla 9. Análisis univariado de la sobrevida global en pacientes con LNH agresivos.

Variables		Nº pacientes (n = 46)	4 años SG (%)	p*
Edad	≤60 años	31	68	NS
	>60 años	15	53	
Estadio clínico	I-II	20	65	NS
	III-IV	26	62	
Estado funcional Karnofsky	≤70 %	2	50	NS
	>70%	44	64	
Enfermedad extraganglionar	≤1	17	62	NS
	> 1	29	63	
Enfermedad voluminosa	Ausente	13	69	NS
	Presente	33	64	
IPI	Bajo riesgo	39	72	0,0013
	Alto riesgo	7	14	
LDH	≤ 570 U/L	43	92	0,04
	> 570 U/L	3	33	
B2M	≤3,4 mg/dl	36	69	0,02
	> 3,4 mg/dl	10	50	
AST	≤38 U/L	41	63	NS
	> 38 U/L	5	60	
ALT	≤41 U/L	41	59	NS
	> 41 U/L	5	100	
FALC	≤290 U/L	31	65	NS
	> 290 U/L	15	60	
PCR	≤ 6 mg/dl	19	68	NS
	> 6 mg/dl	27	59	
VSG	≤15 mmH	1	100	NS
	> 15 mmH	25	72	
Valor desconocido		20		
IL-6	≤ 1,99 pg/ml	20	72	NS
	> 1,99 pg/ml	26	0	

p* significativa = 0,05. NS: no significativa. Prueba de Log-rank
 AST: Aspartato Amino Transferasa LDH : Lactato deshidrogenasa
 ALT: Alanina amino transferasa FALC: Fosfatasa alcalina
 B2M: Beta 2 microglobulina
 VSG: Velocidad de sedimentación globular
 IL-6: Interleukina 6
 SG: sobrevida global

Tabla 10. Análisis univariado de la sobrevida global en pacientes con LNH indolentes.

Variables		Nº pacientes (n = 15)	4 años SG (%)	p*
Edad	≤60 años	10	45	NS
	>60 años	5	40	
Estadio clínico	I-II	5	40	NS
	III-IV	10	45	
Estado funcional Karnofsky	≤70 %	3	33	NS
	>70%	12	46	
Enfermedad extraganglionar	≤ 1	4	50	NS
	> 1	11	42	
Enfermedad voluminosa	Ausente	9	50	NS
	Presente	6	33	
IPI	Bajo riesgo	15	38	NS
	Alto riesgo	0		
LDH	≤ 570 U/L	12	54	0,008
	> 570 U/L	3	0	
B2M	≤ 3,4 mg/dl	11	42	NS
	> 3,4 mg/dl	4	50	
AST	≤ 38 U/L	14	47	NS
	> 38 U/L	1	0	
ALT	≤ 41 U/L	14	47	NS
	> 41 U/L	1	0	
FALC	≤ 290 U/L	11	50	NS
	> 290 U/L	4	25	
PCR	≤ 6 mg/dl	7	38	NS
	> 6 mg/dl	8	50	
VSG	≤ 15 mmH	1	100	0,01
	> 15 mmH	3	57	
Valor desconocido		11		
IL-6	≤ 1,99 pg/ml	7	50	NS
	> 1,99 pg/ml	8	43	

p* significativa = 0,05. NS: no significativa. Prueba de Log-rank
 AST: Aspartato amino transferasa LDH : Lactato deshidrogenasa
 ALT: Alanina amino transferasa FALC: Fosfatasa alcalina
 B2M: Beta 2 microglobulina
 VSG: Velocidad de sedimentación globular
 IL-6: Interleukina 6
 SG: sobrevida global

Las variables pronósticas asociadas significativamente con la SG en el grupo de pacientes con LNH agresivos (Tabla 9) fueron: IPI ($p = 0,0013$), LDH ($p = 0,04$), y B2M ($p = 0,02$), mientras que las variables: edad, estadio clínico, enfermedad extraganglionar, estado funcional, enfermedad voluminosa, PCR, AST, ALT, FALC, y VSG no resultaron significativas. El análisis univariado de las curvas de SG de los pacientes con LNH indolentes (Tabla 10) fue estadísticamente significativo respecto a los niveles de LDH ($p = 0,008$) y VSG ($p = 0,01$).

En relación al análisis univariado de los marcadores pronósticos respecto a la SLE en el grupo de pacientes con LNH agresivos, el IPI fue la única variable con significancia estadística entre los grupos de bajo riesgo y alto riesgo ($p = 0,001$).

Discusión

La IL-6 ha sido objeto de estudio como marcador pronóstico en pacientes con LNH. Se ha demostrado que desempeña un papel preponderante en los procesos metabólicos, inmunológicos y de respuesta inflamatoria, además de su injerencia en la regulación del sistema inmune, hematopoyético y otros procesos biológicos (11-12).

En el presente estudio evaluamos los niveles séricos de IL-6 pretratamiento en un grupo de pacientes con LNH, los cuales resultaron significativamente elevados en los pacientes comparados con el grupo de controles sanos. El criterio de positividad establecido para los niveles elevados de IL-6 ($> 1,99$ pg/ml) determinado en el grupo control, coincidió con valores similares reportados en estudios de población sana, aplicando el mismo método (13,15).

El 57% de los pacientes con LNH presentaron niveles séricos de IL-6 significativamente elevados ($> 1,99$ pg/ml) y el 43% mostraron niveles normales o por debajo del nivel de sensibilidad del ensayo (0,70 pg/ml), sugiriendo su importancia como factor pronóstico en el abordaje de nuevos casos de LNH, tal como ha sido reportado en trabajos previamente publicados (13-15).

Niveles elevados de IL-6 se asociaron significativamente con factores pronósticos adversos tales como: afectación extranodal > 1 , enfermedad voluminosa > 10 cm, IPI y niveles elevados de: LDH, B2M, AST, PCR y VSG. Las evidencias de la literatura sugieren que la IL-6 puede ser producida tanto por las células malignas como por linfocitos benignos reactivos, relacionándose su expresión con la reacción del paciente frente al tumor y su respuesta inmune (11, 21). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Seymour J.F. y col. (13), Preti H.A. y col. (22) y Niitsu N. y col. (23), quienes estudiando

pacientes con LNH obtuvieron una asociación significativa de niveles elevados de IL-6 con características clínico-patológicas como: enfermedad voluminosa, IPI, y niveles elevados de LDH y B2M. En relación al IPI, los pacientes con pronóstico de alto riesgo presentaron niveles de IL-6 significativamente superiores al grupo de bajo riesgo. Estos resultados sugieren la utilidad pronóstica de los niveles séricos de la IL-6, aportando información sobre la actividad de la enfermedad y para la toma de decisiones de protocolos terapéuticos apropiados (20).

Los niveles séricos de IL-6 correlacionaron significativamente de forma directa y lineal con el IPI, síntomas B, LDH, B2M, AST, PCR, y VSG. Similarmente los trabajos de El Far M. y col. (14) reportaron la correlación de niveles elevados de IL-6 en pacientes con LNH con la presencia de síntomas B. Los resultados de Niitsu y col. (23) sugieren que niveles elevados de IL-6 pudieran relacionarse con la diseminación de la enfermedad o crecimiento tumoral, determinado por la correlación significativa de la IL-6 con los síntomas B, enfermedad voluminosa, estado funcional y niveles elevados de LDH. La fuerte correlación entre los niveles de IL-6 y la presencia de síntomas B, estaría basada en los efectos pirogénicos y metabólicos de la IL-6. Esta molécula por sí sola pudiera causar fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso. Debido al efecto pirogénico de la IL-6, la mediación de la inhibición de las enzimas lipogénicas y/o el desarrollo de anorexia, pudieran causar la pérdida de peso (24-26). La correlación entre los niveles elevados de IL-6 y B2M pudiera ser secundaria a la proliferación incrementada de las células linfomatosas debido a la estimulación por la IL-6, causando un incremento en el recambio de la molécula de B2M unida a la membrana celular. Además, se ha reportado que la IL-6 puede incrementar la expresión de los genes de las moléculas clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) en fibroblastos humanos y la expresión de las proteínas del CMH clase I en células de carcinoma de colon. Dado que la B2M es el componente de la cadena liviana de las moléculas clase I del CMH, la IL-6 pudiera incrementar la cantidad de B2M liberada de la membrana de las células tumorales o del tejido no maligno (27-29). Estudios previos han demostrado que la IL-6 es un potente inductor de la síntesis de fibrinógeno hepático, el mayor determinante de la VSG (24). Estudios clínicos en los cuáles se ha administrado a pacientes IL-6 recombinante muestran que esta molécula incrementa los niveles de PCR y disminuye los niveles de albúmina sérica (30). La correlación significativa de la IL-6 con marcadores de respuesta inflamatoria como la PCR pudiera explicarse por la acción reguladora de la IL-6 sobre las proteínas de fase aguda producidas en el hígado, reflejando los niveles de PCR la actividad de la IL-6 en los pacientes con LNH (31). Los niveles de IL-6 correlacionaron significativamente con la AST, enzima que refleja la alta actividad metabólica hepática.

En relación a la repuesta al tratamiento y los niveles iniciales de IL-6, no se obtuvieron resultados significativos. Los trabajos de Fayad L. y col (15), Seymour JF. y col (13) y Chopra y col. (11) tampoco reportaron resultados significativos respecto a los niveles de IL-6 pretratamiento y la tasa de remisión completa.

La expresión de los niveles elevados de IL-6 fue indicativo de mal pronóstico, asociado a una disminución de la SG (análisis univariado) en el grupo total de los pacientes con LNH y no fue significativa para la SLE en el mismo grupo. No se obtuvieron resultados significativos para SG y SLE en los grupos de pacientes con LNH agresivos e indolentes, probablemente influenciado por la heterogeneidad y el tamaño de la población estudiada.

Nuestros resultados permitieron confirmar el valor pronóstico internacionalmente reconocido del IPI, y de los niveles elevados de LDH y B2M, los cuales se asociaron significativamente a una disminución de la SG en el grupo de pacientes con LNH agresivos (1-3,9). En relación a la SLE en el grupo de pacientes con LNH agresivos, el IPI fue la única variable con significancia estadística entre los grupos de bajo riesgo y alto riesgo. En el grupo de pacientes con LNH indolentes, el análisis univariado respecto a los niveles de LDH y VSG fue significativamente predictivo para la SG, pero no para la SLE. El tamaño de la muestra fue limitante en el análisis de las curvas de SLE.

En nuestro estudio analizamos los niveles séricos de IL-6 pretratamiento en pacientes con LNH. Los resultados obtenidos sugieren una significativa asociación entre los niveles séricos de IL-6 y factores pronósticos adversos, clínicos y biológicos. El IPI sigue siendo la principal herramienta de aplicación pronóstica en pacientes con LNH, no obstante pudiera ser complementando con la determinación de marcadores biológicos adicionales tales como la IL-6.

Agradecimiento

Agradecemos al Profesor Leovigildo García, profesor jubilado de la Cátedra de Matemática y Bioestadística de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, por la asesoría estadística.

Agradecemos a la Fundación BADAN por el financiamiento del estudio estadístico.

Referencias

1. Hennessy B, Narran E, Meter A. Non-Hodgkin Lymphomas: An update. *The Lancet Oncology*. 2004; 5: 341-352.
2. Evans LS, Hancock BW. Non-Hodgkin Lymphoma. *Lancet* 2003; 362 (9378): 139-46.

3. Fisher RI. Overview of Non Hodgkin's Lymphoma Biology: Staging and Treatment. *Semin Oncol*. 2003; 30: 3-9.
4. Clarke C, Glaser S, Dorfman R, Bracci P, Eberle E, y col. Expert Review of Non-Hodgkin's Lymphoma in a Population-Based Cancer Registry: Reliability of Diagnosis and Subtype Classifications. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2004; 13: 138-143.
5. Chatterjee N, Hartge P, Cerhan J, Cozen W, Davis S, y col. Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma and Family History of Lymphatic, Hematologic and Other Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2004; 13:1415-1421.
6. La Vecchia C, Negri E, Franceschi S. Medical History and the Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1992; 1: 533-536.
7. Maartense E, Kluin-Nelemans, Noordijk E. Non-Hodgkin's Lymphoma in the elderly. *Ann Hematol*. 2003;82: 661-670.
8. Vose JM, Chiu B, Cheson JD, Wright J. *Hematology* 2002 (1): 241-262.
9. Shipp MA, Harrington, Anderson J, Bonadonna G, Brittinger G, y col. A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *The New England Journal of Medicine*. 1993; 329 (14): 987-94.
10. Hermans J, Krol ADG, Van Groningen K, Kluin, Kluin-Nelemans, y col. International Prognostic Index for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma Is Valid for All Malignancy Grades. *Blood*. 1995; 86 (4): 1460-1463.
11. Chopra C, Chitalkar, Maj Gen MP Jaiprakash. Cytokines: AS useful Prognostic Markers in Lymphoma Cases. *MJAFI*. 2004; 60: 45-49.
12. Skinnider B, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin Lymphoma. *Blood*. 2002; 99 (12): 4283-4297.
13. Seymour J, Talpaz M, Cabanillas F, Meir Wetzler, Kurrock R. Serum Interleukin-6 levels correlate with prognosis in Diffuse Large- Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 1995; 13 (3): 575-582.
14. El Far M, Fouda M, Yahya R, El Baz H. Serum IL-10 and IL-6 levels at diagnosis as independent predictors of outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *J. Physiol. Biochem*. 2004; 60: 253-258.
15. Fayad L, Cabanillas F, Talpaz M, McLaughlin P, Kurzrock R. High serum interleukin-6 levels correlate with a shorter failure-free survival in Indolent Lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*. 1997; 30: 561-571.
16. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J y col. The World Health Organization Classification of Neoplasms of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting - Airlie House. *The Hematology Journal*. 2000 (1): 53-66.
17. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res*. 1971. 31: 1860-1.
18. Karnofsky y col. *Clinical Oncology*. P Rubin. Ed. American Cancer Society 1983.
19. Fuente: Manual de quimioterapia antineoplásica, 3ra. Edición, 1995. Editor Gretta de Acquatella.
20. Aydin F, Yilmaz M, Ozdemir F, Kavgaci H, Yavuz MN. y col. Correlation of Serum IL-2, IL-6 and IL-10 levels with International Prognostic Index in Patients with aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *American Journal of Clinical Oncology*. 2002; 25: 570-572.

21. Nicolaides C, Dimos S, Pavlidis N. Prognostic factors in aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas. *The Oncologist*. 1998; 3: 189-197.
22. Preti HA, Cabanillas F, Talpaz M, Tucker SL, Seymour JF, Kurzrock R. Prognostic Value of Serum Interleukin-6 in Diffuse Large-cell Lymphoma. *Annals of Internal Medicine*. 1997; 127(3): 186-194.
23. Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, Yoshino T, Tamaura J-i, Nakamura S, Higashihara M, Hirano M. Simultaneous elevation of the serum concentrations of vascular endothelial growth factor and interleukin- 6 as independent predictors of prognosis in aggressive non- Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol*. 2002;68:91-100.
24. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990; 265: 621-636.
25. Black K, Garrett IR, Mundy GR. Chinese hamster ovarian cells transfected with the murine interleukin-6 gene cause hypercalcemia as well as cachexia, leukocytosis and trombocytosis in tumor bearing nude mice. *Endocrinology*. 1991; 128:2675-2659.
26. Strassman G, Fong M, Kenney JS, y col. Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest*. 1992; 89: 1681 – 1684.
27. Ni K, O'Neill. Proliferation of the BCL1 B cell lymphoma induced by IL-4 and IL-5 is dependent on IL-6 and GM-CSF. *Immunol Cell Biol*. 1992; 70: 315-322.
28. Yee CY, Biondi A, Wang XH, y col. A possible autocrine role for inteleukin-6 in two lymphoma cell lines. *Blood*. 1989; 74: 798-804.
29. Shimizu S, Hirano T, Yoshioka R, y col. Interleukin -6 (B-cell stimulatory factor 2)-dependent growth of a lennert's lymphoma- derived T-cell line (KT-3). *Blood*. 1988; 72: 1826-1828.
30. Weber J, Yang JC, Topalian SL, y col. Phase I trial of subcutaneous interleukin-6 in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol*. 1993; 11: 499-506.
31. Maat M, Kluft C. Determinants of C- Reactive Protein Concentration in blood. *Ital Hearh J*. 2001; 2(3): 189-195.