

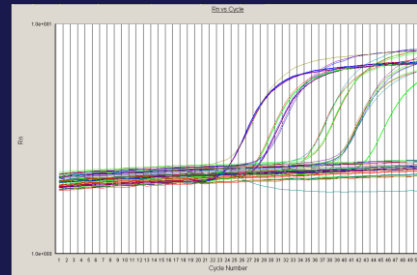
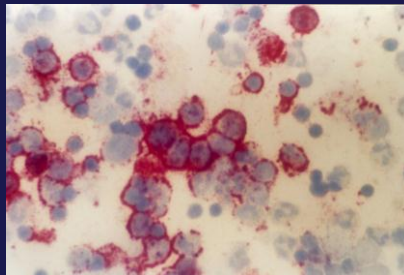


VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques

Departament de Genètica

Estudio de marcadores de enfermedad mínima residual en neuroblastoma y de su posible aplicación clínica



Tesis Doctoral
Juan Silvestre Oltra Soler

Valencia 2015

DEPARTAMENT DE GENÈTICA
FACULTAT DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Estudio de marcadores de enfermedad mínima residual en neuroblastoma y de su posible aplicación clínica

Tesis doctoral presentada para optar al título de Doctor por la Universitat de València por el Licenciado en Biología

Juan Silvestre Oltra Soler

Programa de doctorado
Genética Molecular y Evolutiva

Directores de Tesis

Dra. Victoria Castel Sánchez

Jefa del Grupo de Investigación Clínica y Traslacional en Cáncer, IIS La Fe

Dr. Francisco Martínez Castellano

Jefe del Grupo de Investigación Traslacional en Genética, IIS la Fe

Dra. Carmen Orellana Alonso

Investigadora del Grupo de Investigación Traslacional en Genética, IIS la Fe



Hospital Universitario i Politècnic La Fe



La Fe
Hospital
Universitari
i Politècnic

Título de la tesis:

Estudio de marcadores de enfermedad mínima residual en neuroblastoma y de su posible aplicación clínica

Programa de Doctorado

Genética Molecular y Evolutiva (194-B)

Directores de la tesis

Dra. Victoria Castel Sánchez
Dr. Francisco Martínez Castellano
Dra. Carmen Orellana Alonso

Realizada por

Juan Silvestre Oltra Soler



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA



La Dra. Victoria Castel Sánchez, el Dr. Francisco Martínez Castellano y la Dra. Carmen Orellana Alonso del IIS La Fe,

CERTIFICAN

Que la memoria titulada “ESTUDIO DE MARCADORES DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN NEUROBLASTOMA Y DE SU POSIBLE APLICACIÓN CLÍNICA”, ha sido realizada bajo su codirección en la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital Universitari i Politècnic La Fe por el Licenciado en Biología por la Universitat de València D. Juan Silvestre Oltra Soler.

Que la memoria se considera satisfactoria y apta para ser presentada como Tesis Doctoral en el Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de València.

Y para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Valencia a 20 de octubre de 2015.

Fdo. Dra. Victoria Castel Sánchez

Fdo. Dr. Francisco Martínez Castellano

Fdo. Dra. Carmen Orellana Alonso

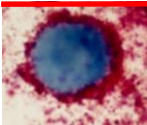
**A mis padres
A mi hermana y mis sobrinos
Al resto de mi familia**

A los pacientes y sus familias

**Como el camino está sembrado de espinas,
Dios ha dado al hombre tres dones:
la sonrisa, el sueño, y la esperanza.**

Immanuel Kant

Agradecimientos



Agradecimientos

Al final, ha llegado el momento que piensas que nunca llegarás, el escribir los agradecimientos. Este paso significa que después de muchos, pero muchos años, he conseguido acabar la redacción de la tesis doctoral. Siempre he pensado que en mi tesis no habría agradecimientos, no porque no haya nada que agradecer, todo lo contrario, sino porque al final, es como desnudar un poco tus sentimientos hacia toda la gente que ha estado durante todos estos años apoyándote en esta tarea y como saben los que me conocen bien, aunque no lo parezca, soy una persona profundamente introvertida. Precisamente este hecho, es el que al final me ha impulsado a escribir, lo que tanto me cuesta expresar en vivo y en directo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis su trabajo durante todos estos años y ahora en la recta final, para que este proyecto haya llegado a su fin. Por una parte agradecer a Victoria todos sus esfuerzos por conseguir siempre financiación, tanto para poder sobrevivir como para toda la formación que he adquirido durante estos años, y por otra, por haberme enseñado tanto sobre el Neuroblastoma y haber conseguido que sea un tema que me entusiasme. Eres una persona entrañable, trabajadora, luchadora, lo has demostrado y lo sigues demostrando día a día. Por otra parte a Paki y a Carmen, por todo lo que me han enseñado y lo que me siguen enseñando a diario. En este proyecto, mis directores de tesis, y ahora compañeros de trabajo, con los que comparto el andar del camino. Son muchos años, muchos días, muchas cosas compartidas, que os han convertido en mucho más que compañeros, sois amigos y como tales, os aprecio un montón.

Tras los directores, es de justicia agradecer a las personas que han dedicado su esfuerzo a conseguir que todo funcionara y siga funcionando en el estudio de la enfermedad mínima residual en neuroblastoma. A Elena y a Yánia, que junto conmigo hemos sido los que nos hemos ido dedicado durante todo este tiempo a llevar a cabo el esfuerzo en el laboratorio. Al final, parece que todo acabará teniendo la recompensa de tres tesis doctorales. Gracias a las dos, sin vosotras este trabajo no hubiera llegado a buen puerto. No me quiero olvidar de Desi, que ha estado ahí, escondida en un despacho, trabajando como la que más, ayudándonos con todos los datos clínicos, con lo que hemos necesitado y ella nos ha podido ayudar, muchas gracias. Finalmente a todo el personal de la Unidad de Oncología Pediátrica del Hospital La Fe, Adela, Chema, Amparo, todo el personal de enfermería, que siempre han colaborado con una sonrisa a que avanzaran estos proyectos.

En tercer lugar, pero no menos importante, me gustaría agradecer a los pacientes y a sus familiares, que inmersos en su sufrimiento permiten que podamos disponer de todas las muestras para poder llevar a cabo los

estudios. Ellos son los verdaderos héroes de esta tesis. En este apartado, agradecer también a todos los profesionales sanitarios, de todos los hospitales que han contribuido a reunir la colección de muestras, porque son el nexo de unión con los padres y sin ellos tampoco hubiera sido posible.

Ahora toca agradecer a todo el personal de la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital La Fe la cálida acogida que tuvieron conmigo cuando llegué hace un montón de años y todo el cariño que me han seguido mostrando día a día. Muchas son las personas que han pasado por la Unidad, listarlas sería muy muy largo y podría cometer el error de olvidarme de alguna, así que gracias a todos. En estos años me habéis ayudado y enseñado mucho, me habéis demostrado mucho cariño y habéis conseguido que me sintiera muy a gusto. Hemos compartido tanto buenos como malos momentos, pero así es la vida, y me habéis ayudado a vivirla. Ya sabéis que os tengo un gran cariño a todos (a alguna persona un poquito más, pero no voy a levantar celos, ellas ya lo saben).

Mención especial merecen mis compañeros del Grupo de Investigación Traslacional en Genética. Agradecerles a Paki, Carmen, Mónica, Sandra, Sonia, Alfonso, Cristina y Anabel, todos los momentos de trabajo emocionante que hemos compartido y espero seguir compartiendo, y cómo no, los momentos de ocio y desconexión que hemos vivido y que espero que sigan ocurriendo en los años venideros. Gracias por compartir tantas y tantas cosas. Quiero hacer una referencia especial a Sonia, con la que he andado en esta carrera final de la escritura de la tesis, gracias por todo tu apoyo y ayuda y por haberme animado en los momentos más bajos. Finalmente lo hemos conseguido.

No me gustaría olvidarme de mis comienzos en el mundo de la investigación, en el Departamento de Genética de la Facultad de Biología de dónde salí y he vuelto a ratitos. Gracias a Loli, y al grupo de Genética Molecular, por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de iniciarme en este mundo. Muchas son las personas con las que compartí muy buenos ratos en el laboratorio, gracias a todos por vuestras enseñanzas y apoyo en mis comienzos. Y por supuesto, ya en mi regreso “a ratitos”, agradecer a Loli y a M^a José la confianza que siempre han mostrado en mí, por su apoyo en todo momento, por todas las veces que me han animado (y casi amenazado) a acabar esta tesis y más importante, por todo el cariño que me han demostrado. Quiero que sepáis que el cariño es mutuo y que, aunque un poco jóvenes, y madre sólo hay una, os considero un poco mis mamás.

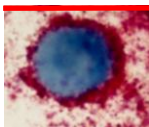
También quiero agradecer a mis amigos, Salva, Elena y el Recién Llegado Guillem, Angel, María y a los pequeños Pau y Mar, Eliseu y Luisito y a las casi recién llegadas Ana y M^a José, el haber compartido durante el valioso

tiempo del ocio todas las preocupaciones de la tesis, que además se han dilatado bastante en el tiempo. Gracias por haber soportado todos estos años mis quejas, mis preocupaciones y mis logros. Sin vosotros tampoco hubiera sido posible.

Ahora me gustaría acordarme dos personas muy importantes en mi vida, ¿creías que me había olvidado de vosotras?, pues no, Alicia y cómo no Anna. Quiero agradecerte tu apoyo durante todos estos años, sin duda eres la persona que más ha insistido y más veces me ha recordado que tenía que acabar la tesis. Pero el agradecimiento no viene por tu insistencia, ni por tus tirones de orejas, me gustaría que supieras que ha sido muy importante para mí que hayas estado ahí en todo momento, que me hayas sabido escuchar y aconsejar (aunque no te hiciera caso muchas veces) y que me hayas soportado y acompañado en todo momento en mis alegrías y en mis malos ratos. Han sido años duros, pero hay que quedarse con lo bueno. La amistad y el aprecio se pueden intentar plasmar en un papel, pero lo que hay que hacer es demostrarlos y tú me has demostrado durante estos años que eres una verdadera amiga y así te considero, espero que tú pienses lo mismo de mí, porque es cierto. Muchas gracias por ser como eres.

Finalmente y en la posición que considero más privilegiada de todas, agradecer a mi familia todo su apoyo durante todos estos años, o más bien, durante toda mi vida. Quiero agradecer a mis padres, Juan y Rosa, la educación y los valores que siempre me han inculcado, basados en el esfuerzo y el tesón diario, en la premisa de que sin trabajo no hay recompensa. Agradecerles también que siempre hayan creído en mí y por el apoyo incondicional para que este proyecto o cualquier objetivo de mi vida llegara a buen puerto. Agradecer a mi hermana Rosa M^a, a mis sobrinos Lucas y Estéfano y a mi cuñado Juan, el poder compartir mi vida con ellos y de llenarla de alegría y de buenos momentos. Somos una pequeña familia, pero formamos un gran tándem. Quiero que sepáis que lo sois todo para mí, que mi vida no tiene sentido sin vosotros y que sois lo que más quiero en este mundo.

Índices



Índice general

Índice general	3
Índice de tablas	7
Índice de figuras	11
Abreviaturas	17
I.- Introducción	23
1.- Tumores infantiles.....	23
2.- Neuroblastoma.....	25
2.1.- Introducción	25
2.2.- Clasificación.....	27
2.3.- Histopatología.....	32
2.4.- Genética	34
2.4.1.- Ploidía	36
2.4.2.- Amplificación de <i>MYCN</i>	37
2.4.3.- Deleción de 1p	39
2.4.4.- Ganancia de 17q.....	40
2.4.5.- Alteraciones en el cromosoma 11.....	41
2.4.6.- Alteraciones en el cromosoma 14.....	42
2.4.7.- Alteraciones genómicas en otros cromosomas	42
2.4.8.- Neuroblastoma familiar	43
2.5.- Mecanismos de invasión y metástasis en neuroblastoma	44
2.5.1.- Invasión de la circulación	45
2.5.2.- Invasión de la médula ósea	46
2.5.3.- Invasión del hueso	46
2.6.- Enfermedad mínima residual.....	47
2.6.1.- Introducción.....	47
2.6.2.- Métodos citomorfológicos	48
2.6.3.- Inmunocitología	48
2.6.3.1.- Antígenos.....	49
2.6.3.2.- Métodos de detección Inmunocitológicos.....	51
2.6.3.3.- Significado clínico	53
2.6.4.- RT-PCR.....	54
2.6.4.1.- Dianas de estudio	55
2.6.4.2.- Métodos de detección.....	57
2.6.4.3.- Significado clínico	62
2.6.5.- Citometría de flujo	64
2.7.- Pronóstico y terapia	66
2.7.1.- Grupo de pronóstico favorable.....	68
2.7.2.- Grupo pronóstico intermedio.....	69
2.7.3.- Grupo de alto riesgo.....	70
2.7.3.1.- Quimioterapia de inducción	70
2.7.3.2.- Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.....	71
2.7.3.3.- Tratamiento de la EMR	72
2.7.3.3.1.- Agentes diferenciadores	72
2.7.3.3.2.- Anticuerpos monoclonales.....	73

II.- Hipótesis de trabajo.....	77
III.- Objetivos	81
IV.- Material y métodos.....	85
1.- Pacientes y muestras biológicas	85
1.1.- Pacientes	85
1.2.- Muestras biológicas.....	87
2.- Extracción de RNA tumoral.....	88
2.1.- Toma de la muestra.....	88
2.2.- Disgregación física del tejido y lisis	89
2.3.- Aislamiento del RNA.....	89
3.- Extracción de RNA procedente de sangre periférica, médula ósea y aféresis.....	90
3.1.- Separación de células nucleadas por gradiente de densidades: Linfoprep	90
3.2.- Aislamiento del RNA.....	91
4.- Retrotranscripción.....	91
5.- Detección de la EMR mediante métodos basados en la PCR	92
5.1.- Detección mediante RT-PCR seguida de Southern Blot	92
5.1.1.- PCR de $\beta 2$ -microglobulina	92
5.1.2.- PCR de TH.....	94
5.1.3.- PCR de MAGE-A1.....	95
5.1.4.- PCR de MAGE-A3.....	96
5.1.5.- PCR de GAGE	97
5.2.- Southern blot	100
5.2.1.- Electroforesis en geles de agarosa.....	100
5.2.2.- Transferencia	100
5.2.3.- Prehibridación e hibridación.....	101
5.2.4.- Lavados y detección	102
5.2.5.- Marcaje de las sondas	102
5.3.- Detección mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real.....	105
5.3.1.- Protocolo de amplificación	107
5.3.2.- Análisis de los resultados.....	108
6.- Secuenciación.....	108
6.1.- Purificación de la reacción de PCR.....	109
6.2.- Reacción de secuenciación.....	109
6.3.- Purificación	110
6.4.- Electroforesis capilar	110
7.- Análisis de secuencias.....	111
8.- Inmunocitología.....	111
8.1.- Preparación de los citoextensiones.....	111
8.2.- Fijación	112
8.3.- Inmunotinción	112
8.4.- Evaluación de los resultados.....	113
9.- Análisis Estadístico.....	114
V.- Resultados	117
1.- Introducción.....	117

2.- Validación de los marcadores para el estudio de EMR	117
2.1.- Descripción de <i>DCX</i> como marcador de EMR en neuroblastoma	118
2.2.- Especificidad de los marcadores.....	118
2.3.- Expresión de los marcadores en tejido tumoral	120
3.- Exclusión de la expresión de los genes <i>GAGE</i> como marcadores de EMR en neuroblastoma	123
4.- Validación de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real de <i>GAPD</i> , <i>TH</i> y <i>DCX</i>	125
4.1.- Análisis de las curvas estándar.....	125
4.2.- Estimación de la variabilidad entre las réplicas.....	127
5.- Comparación de los estudios de expresión realizados para <i>TH</i> , mediante Southern Blot y QF-PCR.....	127
6.- Comparación de los estudios de expresión realizados mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real para la expresión de <i>TH</i> y <i>DCX</i>	130
7.- Estudio mediante inmunocitología con anticuerpos Anti-GD2.	134
8.- Evaluación del valor pronóstico de la expresión de los marcadores de EMR en tumor primario.	136
9.- Resultados del estudio de EMR en pacientes con enfermedad no metastática.....	147
9.1.- Estudio global de EMR en pacientes con enfermedad localizada al diagnóstico.	148
9.1.1- Estudio de EMR en MO al diagnóstico de pacientes con tumor localizado.....	149
9.1.2- Estudio de EMR en SP al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada.	155
9.2.- Estudio de EMR en pacientes con enfermedad localizada en la recaída.....	161
9.2.1- Estudio de EMR en MO en la recaída de pacientes con enfermedad localizada	162
9.2.2- Estudio de EMR en SP en la recaída en pacientes con enfermedad localizada	165
10.- Resultados del estudio de EMR en pacientes estadio 4S.....	167
11.- Resultados del estudio de EMR en pacientes del grupo de Alto Riesgo.	168
11.1.- Estudio de EMR en pacientes de alto riesgo al diagnóstico ...	169
11.1.1- Estudio de EMR en MO en pacientes de alto riesgo al diagnóstico.	170
11.1.2- Estudio de EMR en SP en pacientes de alto riesgo al diagnóstico	175
11.2.- Estudio de EMR en pacientes de alto riesgo tras quimioterapia de inducción.....	181
11.2.1- Estudio de EMR en MO tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.....	184
11.2.2- Estudio de EMR en SP tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.....	190

11.3.- Estudio de EMR en pacientes de alto riesgo en la recaída	195
11.3.1- Estudio de EMR en MO en la recaída en pacientes de alto riesgo	197
11.3.2- Estudio de EMR en SP en la recaída en pacientes de alto riesgo	202
VI.- Discusión	211
1.- Validación de los marcadores para el estudio de EMR	211
1.1.- Descripción de DCX como marcador de EMR en neuroblastoma	212
1.2.- Especificidad de los marcadores.....	214
1.3.- Expresión de los marcadores en tejido tumoral	215
2.- Exclusión de la expresión de los genes <i>GAGE</i> como marcadores de EMR en neuroblastoma	217
3.- Validación de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real de <i>GAPD</i> , <i>TH</i> y <i>DCX</i>	218
4.- Comparación de los estudios de expresión realizados para <i>TH</i> , mediante Southern Blot y QF-PCR.	220
5.- Comparación de los estudios de expresión realizados mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real para la expresión de <i>TH</i> y <i>DCX</i>	222
6.- Estudio mediante inmunocitología con anticuerpos Anti-GD2.	224
7.- Evaluación del valor pronóstico de la expresión de los marcadores de EMR en tumor primario.	227
8.- Estudio de EMR en pacientes con enfermedad no metastática.	232
9.- Estudio de EMR en pacientes estadio 4S	237
10.- Estudio de EMR en pacientes del grupo de Alto Riesgo.	238
10.1.- Estudio de EMR en pacientes de alto riesgo al diagnóstico. ...	239
10.2.- Estudio de EMR en pacientes de alto riesgo tras quimioterapia de inducción.	242
10.3.- Estudio de EMR en pacientes de alto riesgo en la recaída. ...	245
10.4.- Detección de células tumorales en Aféresis.	246
VII.- Conclusiones	251
VIII-Bibliografía	255
IX.- Anexos.....	281
Anexo I: Publicaciones.....	281
1.- Publicaciones relacionadas con la tesis doctoral.	281
2.- Publicaciones relacionadas con el tema de la tesis doctoral.	282
Anexo II: Financiación	283
1.- Becas personales	283
2.- Proyectos de investigación.....	284

Índice de tablas

Tabla 1: Estadios según la clasificación INSS	28
Tabla 2: Criterios internacionales de respuesta al tratamiento (INRC)	29
Tabla 3: Estratificación del riesgo propuesta por el COG	30
Tabla 4: Estadía internacional según el INRGSS	32
Tabla 5: Evaluación en grupos pronóstico según la clasificación INPC	34
Tabla 6: Clasificación en grupos pronósticos utilizados por diferentes grupos internacionales	67
Tabla 7: Esquema de Clasificación del riesgo INRG pre tratamiento en neuroblastoma	68
Tabla 8: Distribución por estadios y sexo de los niños reclutados para el estudio... ..	85
Tabla 9: Hospitales remitentes con el número de pacientes incluidos en el estudio de cada uno de ellos	86
Tabla 10: Valores obtenidos en 10 de los tumores primarios estudiados mediante RT-PCR cuantitativa	123
Tabla 11: Frecuencias de expresión de los diferentes marcadores en las muestras de sangre periférica y médula ósea estudiadas	124
Tabla 12: Pendiente, intersección con el eje Y y coeficiente de correlación obtenidos de las curvas estándar realizadas para <i>TH</i> , <i>DCX</i> y <i>GAPD</i>	127
Tabla 13: Tabla de contingencia de la detección de la expresión de <i>TH</i> mediante PCR/Southern frente a la detección mediante QF-PCR	129
Tabla 14: Tabla de contingencia de la detección de la expresión de <i>TH</i> mediante PCR/Southern frente a la detección mediante QF-PCR en sangre periférica y médula ósea	129
Tabla 15: Tabla de contingencia de la detección de la expresión de <i>DCX</i> y <i>TH</i> mediante QF-PCR	131
Tabla 16: Tabla de contingencia de la detección de la expresión de <i>DCX</i> y <i>TH</i> mediante QF-PCR en tumor, aféresis, sangre periférica y médula ósea	132
Tabla 17: Correlación de Pearson entre los niveles de expresión observados mediante la técnica de QF-PCR para los marcadores <i>TH</i> y <i>DCX</i>	132
Tabla 18: Correlación de Pearson entre los niveles de expresión observados mediante la técnica de QF-PCR en los casos doble positivos para los marcadores <i>TH</i> y <i>DCX</i>	133
Tabla 19: Resultados obtenidos en el estudio de EMR mediante inmunocitología	134
Tabla 20: Resultados obtenidos en el momento del diagnóstico en las muestras estudiadas mediante inmunocitología con el anticuerpo Anti-GD2	135
Tabla 21: Resultados obtenidos en el momento de la recaída en las muestras estudiadas mediante inmunocitología con el anticuerpo Anti-GD2	135
Tabla 22: Resumen de los resultados obtenidos para las muestras estudiadas mediante inmunocitología con Anti-GD2 y QF-PCR	136
Tabla 23: Distribución y principales características clínicas de la serie de tumores utilizadas para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR	137
Tabla 24: Expresión de <i>MAGE-A1</i> y <i>MAGE-A3</i> frente a estadio tumoral agrupado en tumores localizados y diseminados	141
Tabla 25: Resultados de las variables <i>MAGE-A1</i> , <i>MYCN</i> , edad al diagnóstico y tumores localizados vs diseminados, incluidas en la regresión de Cox para la supervivencia total y la supervivencia libre de eventos	146
Tabla 26: Datos obtenidos en el total de las muestras de MO y SP estudiadas al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada	148

Tabla 27: Distribución y principales características clínicas de la serie de muestras de MO utilizadas, para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR en pacientes con enfermedad localizada	149
Tabla 28: Datos obtenidos para la totalidad de marcadores en MO al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada	150
Tabla 29: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos para cada uno de los marcadores en MO al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada	151
Tabla 30: Distribución y principales características clínicas de la serie de muestras de SP al diagnóstico, en pacientes con enfermedad localizada, utilizadas para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR	155
Tabla 31: Datos obtenidos para la totalidad de marcadores estudiados en SP al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada	156
Tabla 32: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos para cada uno de los marcadores en SP al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada	157
Tabla 33: Tabla de datos obtenidos en el total de las muestras de MO y SP en la recaída en pacientes con enfermedad localizada.....	161
Tabla 34: Distribución y principales características de la serie de muestras de MO utilizadas para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR en la recaída en pacientes con enfermedad localizada	162
Tabla 35: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia para cada uno de los marcadores analizados	163
Tabla 36: Distribución y principales características de la serie de muestras de SP utilizadas para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR en la recaída en pacientes con enfermedad localizada	165
Tabla 37: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia para cada uno de los marcadores en SP en pacientes con enfermedad localizada en la recaída	166
Tabla 38: Frecuencia relativa de la expresión de cada marcador en el total de las muestras de MO y SP al diagnóstico en pacientes estadio 4S.....	168
Tabla 39: Tabla de datos obtenidos en el total de las muestras de MO y SP al diagnóstico en pacientes de alto riesgo.....	169
Tabla 40: Distribución y principales características de la serie de muestras de MO utilizadas para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR al diagnóstico en pacientes de alto riesgo	170
Tabla 41: Datos obtenidos para la totalidad de marcadores en MO al diagnóstico en pacientes de alto riesgo.....	171
Tabla 42: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos para cada uno de los marcadores analizados en MO al diagnóstico en pacientes de alto riesgo.....	172
Tabla 43: Distribución y principales características de la serie de muestras SP utilizadas, para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR en pacientes de alto riesgo al diagnóstico	175
Tabla 44: Datos obtenidos para la totalidad de marcadores en SP al diagnóstico en pacientes de alto riesgo.....	176
Tabla 45: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos para cada uno de los marcadores en SP al diagnóstico en pacientes de alto riesgo.....	177
Tabla 46: Datos obtenidos en el total de las muestras de MO y SP tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.....	181

Tabla 47: Media y desviación típica (DT) de valores de Δ CT positivos obtenidos mediante PCR cuantitativa para los marcadores <i>TH</i> y <i>DCX</i> al diagnóstico y tras quimioterapia de inducción en SP y MO en pacientes de alto riesgo	183
Tabla 48: Prueba t para muestras relacionadas, de la comparación de las medias de los valores de Δ CT en muestras de SP y MO al diagnóstico y tras quimioterapia de inducción para los marcadores <i>DCX</i> y <i>TH</i> en pacientes de alto riesgo	184
Tabla 49: Distribución y principales características de la serie de muestras de MO utilizadas, para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.	184
Tabla 50: Datos obtenidos para la totalidad de marcadores en MO tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.....	185
Tabla 51: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos para cada uno de los marcadores en MO tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo	186
Tabla 52: Distribución y principales características de la serie de muestras de SP utilizadas, para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.	191
Tabla 53: Datos obtenidos para la totalidad de marcadores en SP tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.....	191
Tabla 54: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos para cada uno de los marcadores en SP tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo	192
Tabla 55: Datos obtenidos en el total de las muestras de MO y SP en la recaída en pacientes de alto riesgo.....	195
Tabla 56: Distribución y principales características de la serie de muestras de MO utilizadas para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR en pacientes de alto riesgo en la recaída	198
Tabla 57: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia para cada uno de los marcadores en MO de pacientes de alto riesgo en la recaída	198
Tabla 58: Distribución y principales características de la serie de muestras de SP utilizadas, para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR en pacientes de alto riesgo en la recaída	202
Tabla 59: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia para cada uno de los marcadores en SP de pacientes de alto riesgo en la recaída	203
Tabla 60: Distribución y principales características de la serie de muestras de AF de pacientes de alto riesgo en las que se estudió la presencia de células tumorales.	205
Tabla 61: Resultados obtenidos en las ocho muestras de aféresis que resultaron positivas para al menos uno de los marcadores de EMR analizados.....	206
Tabla 62: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia para cada uno de los marcadores en AF de pacientes de alto riesgo.	206

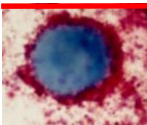
Índice de figuras

Figura 1: Supervivencia a los 5 años del diagnóstico, por cohortes, de los periodos comprendidos entre los años 1980 al 2007	23
Figura 2: Casos registrados por el RNTI desde 1980 hasta 2013	24
Figura 3: Distribución del sistema nervioso simpático	26
Figura 4: Tumores neuroblásticos en varios grados de diferenciación	33
Figura 5: Frecuencias de ganancias y pérdidas genómicas estudiadas mediante Array-CGH en tumores de NB	35
Figura 6: Amplificación del oncogén <i>MYCN</i> observada mediante diferentes técnicas	37
Figura 7: Rutas y genes alterados por la sobreexpresión de <i>MYCN</i>	38
Figura 8: Deleción de 1p observada mediante diferentes técnicas	39
Figura 9: Translocación desequilibrada que tiene como resultado la pérdida de 1p36 y la ganancia de 17q21-qter	41
Figura 10: Proceso de metástasis ósea en neuroblastoma	45
Figura 11: Mecanismos de invasión del hueso en neuroblastoma	47
Figura 12: Ejemplos de falsos positivos observables con la tinción inmunocitológica con el anticuerpo GD2	50
Figura 13: Análisis inmunocitológico/citogenético combinado (GD2/ <i>MYCN</i>)	52
Figura 14: Sensibilidad de PCR anidada para la detección de <i>DDC</i>	59
Figura 15: Detección mediante RT-PCR de <i>GAGE</i> en una dilución seriada de RNA extraída de la línea celular LA-N-1-55N	60
Figura 16: Esquema de amplificación generado por la amplificación mediante RT-PCR de <i>TH</i>	61
Figura 17: Potencial utilidad clínica de la detección por RT-PCR de células residuales de neuroblastoma	62
Figura 18: alineamiento de los genes de la familia <i>GAGE</i>	99
Figura 19: Esquema del dispositivo de transferencia	101
Figura 20: PCR cuantitativa fluorescente en tiempo real con sondas TaqMan	106
Figura 21: Gel de agarosa y Southern blot tras la amplificación mediante RT-PCR de los genes <i>GAGE</i>	119
Figura 22: Graficas de amplificación mediante PCR en tiempo real de 10 individuos control sanos	120
Figura 23: Gel de agarosa y southern blot tras la amplificación mediante RT-PCR de <i>MAGE-A3</i>	121
Figura 24: Frecuencias de expresión de <i>TH</i> , <i>MAGE-A1</i> , <i>MAGE-A3</i> , <i>DCX</i> y <i>GAGE</i> en los tumores primarios estudiados	122
Figura 25: Curvas de amplificación (A) y curva estándar (B) obtenida en la amplificación de diluciones seriadas de cDNA tumoral para el gen <i>GAPD</i>	126
Figura 26: Diagrama de cajas para los valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ obtenidos mediante QF-PCR clasificados según los valores obtenidos mediante PCR/Southern.	130
Figura 27: Correlación entre los valores de expresión de <i>DCX</i> y <i>TH</i> en los diferentes tipos de muestras estudiadas (MO, SP, AF y T)	133
Figura 28: Curvas de Supervivencia y Supervivencia Libre de Eventos obtenidas en el análisis de los diferentes marcadores analizados en tumor primario	140
Figura 29: Curvas de Supervivencia Libre de Eventos obtenidas en el análisis de <i>GAGE</i> en niñas y <i>TH</i> en Tumores con <i>MYCN</i> no amplificado	142
Figura 30: Curvas de Supervivencia y Supervivencia Libre de Eventos obtenidas en el análisis de <i>MAGE-A1</i> según el sexo de los pacientes	143

Figura 31: Curva de Supervivencia Libre de Eventos obtenidas en el análisis de <i>MAGE-A1</i> en tumores localizados.....	144
Figura 32: Curvas de Supervivencia y Supervivencia Libre de Eventos obtenidas en el análisis de <i>MAGE-A1</i> según el estado de <i>MYCN</i> en la totalidad de tumores	145
Figura 33-A: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en MO al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada.....	152
Figura 33-B: Curvas de supervivencia libre de eventos obtenidas para los diferentes marcadores en MO al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada	153
Figura 34: Curvas de supervivencia libre de eventos obtenidas para la expresión de <i>MAGE-A1</i> y <i>MAGE-A3</i> en muestras de MO al diagnóstico en pacientes estadio 3	154
Figura 35-A: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en SP al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada.....	158
Figura 35-B: Curvas de supervivencia libre de eventos obtenidas para los diferentes marcadores en SP al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada	159
Figura 36: Curvas de supervivencia y supervivencia libre de eventos obtenidas para la expresión de <i>MAGE-A1</i> en muestras de SP al diagnóstico en pacientes estadio 3	160
Figura 37: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en MO en la recaída en pacientes con enfermedad localizada	164
Figura 38: Curvas de supervivencia obtenidas para <i>TH</i> (Southern blot) y <i>DCX</i> en SP en la recaída en pacientes con enfermedad localizada.....	167
Figura 39-A: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en MO al diagnóstico en pacientes de alto riesgo	173
Figura 39-B: Curvas de supervivencia libre de eventos obtenidas para los diferentes marcadores en MO al diagnóstico en pacientes de alto riesgo	174
Figura 40-A: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en SP al diagnóstico en pacientes de alto riesgo	178
Figura 40-B: Curvas de supervivencia libre de eventos obtenidas para los diferentes marcadores en SP al diagnóstico en pacientes de alto riesgo	179
Figura 41: Curvas de supervivencia y supervivencia libre de eventos obtenidas para la detección de <i>GD2</i> en sangre periférica al diagnóstico en pacientes de alto riesgo	181
Figura 42: Frecuencias de casos positivos al diagnóstico y tras quimioterapia de inducción en pacientes de Alto Riesgo para cada uno de los marcadores estudiados	182
Figura 43-A: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en MO tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.....	187
Figura 43-B: Curvas de supervivencia libre de eventos obtenidas para los diferentes marcadores en MO tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo...	188
Figura 44: Curvas de supervivencia y supervivencia libre de eventos obtenidas para la detección de <i>DCX</i> en médula ósea tras quimioterapia de inducción en pacientes estadio 4.....	190
Figura 45-A: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en SP tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.....	193
Figura 45-B: Curvas de supervivencia libre de eventos obtenidas para los diferentes marcadores en SP tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo....	194
Figura 46: Frecuencias de casos positivos para la totalidad de marcadores en MO y SP al diagnóstico, tras quimioterapia de inducción y en la recaída (A)	197
Figura 47: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en MO en la recaída en pacientes de alto riesgo	200

Figura 48: Curvas de supervivencia obtenidas para <i>TH</i> detectado por QF-PCR y para la combinación de los resultados de todos los marcadores en MO de pacientes estadio 4 en la recaída	201
Figura 49: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en SP en la recaída en pacientes de alto riesgo	204
Figura 50: Curvas de supervivencia y supervivencia libre de eventos obtenidas para los TH y MAGE-A3 en aféresis de pacientes de alto riesgo	207

Abreviaturas



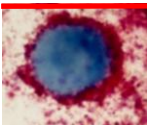
Abreviaturas

AcNa	Acetato sódico
AF	Aféresis
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
Array-CGH	Hibridación Genómica Comparada mediante Array
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
CCG	<i>Children's Cancer Group</i>
cDNA	DNA complementario
CDP-Star	Substrato quimioluminiscente
CGH	Hibridación Genómica Comparada
COG	<i>Children's Oncology Group</i>
Ct	Ciclo umbral
dATP	2'-Desoxiadenosina 5'-trifosfato (Adenina)
dCTP	2'-Desoxicitidina 5'-trifosfato (Citosina)
DCX	Gen de la doblecortina
ddNTP	Didesoxinucleótido
dGTT	2'-Desoxiguanosina 5'-trifosfato (Guanina)
DI	Índice de DNA
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DTT	Ditiotreitol
dTTP	2'-Desoxitimidina 5'-trifosfato (Timina)
dUTP	2'-Desoxiuridina 5'-trifosfato (Uracilo)
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EE	Enfermedad Estable
EMR	Enfermedad Mínima Residual
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
g	Fuerza g
GAGE	Antígeno G1
GAPD	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa

GD2	β -1,4-N-acetil-galactosaminil-transferasa, sintasa.	GD2/GM2
GN	Ganglioneuroma	
GNB	Ganglioneuroblastoma	
HCl	Ácido clorhídrico	
HVA	Ácido homovalínico	
INRC	<i>Internacional Neuroblastoma Response Criteria</i>	
INRGSS	<i>International Neuroblastoma Risk Group Staging System</i>	
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging System</i>	
LOH	Pérdida de heterocigosidad	
M	Molar	
MAGE	Antígeno de Melanoma	
MAGE-A1	Antígeno A1 de Melanoma	
MAGE-A3	Antígeno A3 de Melanoma	
MBRP	Respuesta parcial muy buena	
MgCl₂	Cloruro de magnesio	
MIBG	Metaiodobenzilguanidina	
MKI	Índice de mitosis-cariorexix	
ml	Mililitro	
mM	Milimolar	
MO	Médula ósea	
mRNA	RNA mensajero	
MYCN	Oncogén relacionado con el virus de la mielocitomatosis derivado de neuroblastoma	
NaCl	Cloruro sódico	
NaOH	Hidróxido sódico	
NB	Neuroblastoma	
NBAS	<i>Neuroblastoma amplified gene</i>	
NCBI	Centro nacional de información biotecnológica de EEUU	
ng	Nanogramo	
nM	Nanomolar	
PBS	Tampón fosfato	

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Progresión de la Enfermedad
<i>PHOX2B</i>	<i>Paired-like homeobox 2B</i>
pmol	Picomol
QF-PCR	PCR cuantitativa fluorescente en tiempo real.
RC	Respuesta Completa
RM	Respuesta Mixta
RNA	Ácido ribonucleico
RNTI	Registro Nacional de Tumores Infantiles
RP	Respuesta Parcial
RPM	Revoluciones Por Minuto
RT-PCR	Retrotranscripción seguida de PCR
S	Supervivencia
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEHOP	Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica
SIOPEN	Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica-Europa/Neuroblastoma
SLE	Supervivencia Libre de Eventos
SNC	Sistema Nervioso Central
SNS	Neuroblastomas y otros tumores de células nerviosas periféricas
SP	Sangre Periférica
SSC	Tampón citrato sódico salino
T	Tumor
TBE	Tampón Tris, Ácido bórico, EDTA
TBS	Tampón Tris-clorhídrico Salino
TH	Tirosín Hidroxilasa
TSR	Template Supresión Reagent
VMA	Ácido vanililmaldéico
ΔCt	Valor normalizado de Ct
μl	microlitro
13-cis-Ra	Ácido 13 cisretinoico

Introducción



I.- Introducción

1.- Tumores infantiles.

En las últimas décadas, se han producido avances remarcables en el diagnóstico, tratamiento y supervivencia de los tumores infantiles. A pesar de estos importantes avances, el cáncer es la primera causa de muerte por enfermedad en la infancia y adolescencia, a partir del primer año de vida y, además, sigue siendo la segunda causa de muerte infantil (en niños con edades comprendidas entre los 0 y 14 años) después de la mortalidad relacionada con los accidentes.

Más de 160.000 niños son diagnosticados de cáncer en el mundo cada año, y gracias a los progresos en el diagnóstico y tratamiento, aproximadamente tres de cada cuatro sobrevivirán al menos cinco años después del diagnóstico de la enfermedad, siempre considerando que pertenecen a países desarrollados (*Pritchard-Jones et al., 2006*).

La supervivencia global del cáncer infantil ha aumentado notablemente en los últimos años, en España se conocen estos datos gracias al Registro Nacional de Tumores infantiles (RNTI). Los datos específicos del periodo de 1984 a 2007 los podemos ver en la Figura 1, donde se observa un aumento de la supervivencia global a los 5 años que va del 54% en el periodo comprendido a los años 1980-1984 al 78% en el periodo comprendido entre el 2000 al año 2007.

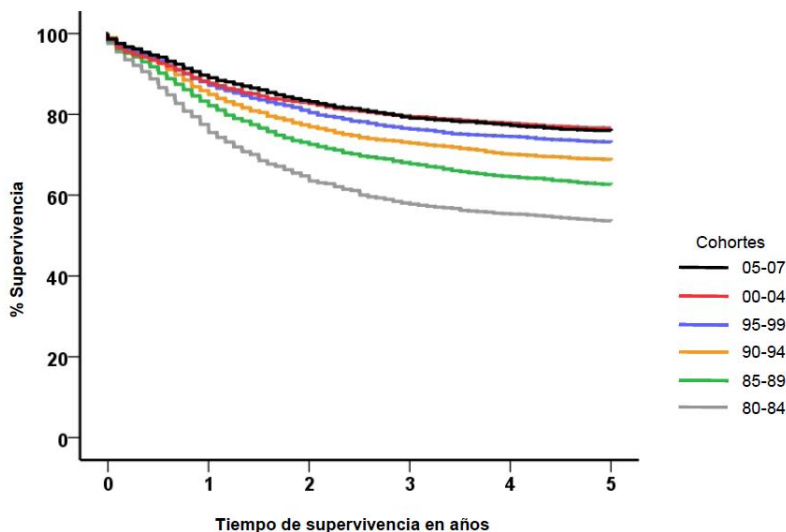
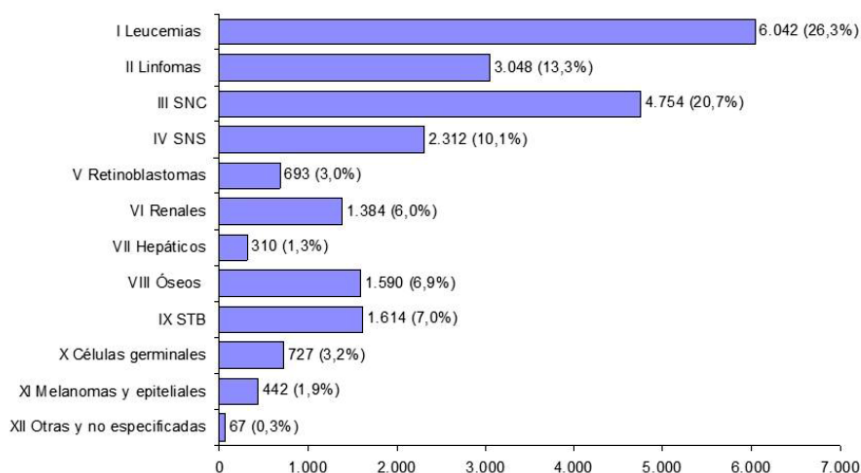


Figura 1: Supervivencia a los 5 años del diagnóstico, por cohortes, de los periodos comprendidos entre los años 1980 al 2007 (*Adaptada de Peris Bonet et al., 2014*).

Los tipos de neoplasias, distribución, pronóstico y respuesta a la terapia de los tumores que se presentan en la edad pediátrica difieren marcadamente de los que ocurren en la población adulta. En adultos, los tumores predominantes son los epiteliales, que se originan en las células que recubren las superficies internas y externas del cuerpo. Algunos ejemplos de ellos son los tumores de colon, mama o pulmón. Por el contrario, en niños, los tumores normalmente son de origen mesenquimal, derivados de las células hematopoyéticas, los tumores del sistema nervioso central y los tumores llamados embrionarios.

Las leucemias son los tumores más frecuentes en niños menores de 14 años, tras estos se encuentran los tumores del sistema nervioso central, los linfomas y los tumores del sistema nervioso periférico. De este último grupo, un 97% son Neuroblastomas. Los datos de la distribución de los tumores infantiles en España, recogidos por el RNTI, se muestran en la Figura 2.



Total casos = 22.983

Figura 2: Casos registrados por el RNTI desde 1980 hasta 2013 (*Adaptada de Peris Bonet et al., 2014*).

2.- Neuroblastoma

2.1.- Introducción

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia y el cuarto en frecuencia en el conjunto global de neoplasias infantiles tras las leucemias, tumores del sistema nervioso central (SNC) y los linfomas (*Navalkele et al., 2011*). Su incidencia en nuestro país, según el RNTI oscila entre 8-10 casos por millón de niños y año, por lo que su frecuencia supone alrededor de un 8-10% de todos los tumores infantiles y más de la mitad de los cánceres del lactante (*Brodeur et al., 2006; Castel et al., 2005*). Sin embargo, es el responsable de aproximadamente un 15% del total de muertes provocadas por cáncer pediátrico (*Maris et al., 2007*). La incidencia clínica del Neuroblastoma en el mundo occidental se estima que es de 1 por cada 100.000 niños menores de 15 años (*Bernstein et al., 1992; Stiller et al., 1992, Maris, 2010*). La edad media del diagnóstico es de 22 meses, dos tercios de los casos se presentan antes de los 5 años de edad y en un 97% los pacientes tienen menos de 10 años. El tumor es más común en niños que en niñas siendo el ratio niño/niña aproximadamente 1.3/1 (*Davis et al., 1987; Nyari et al., 2006*).

La etiología del neuroblastoma, como en la mayoría de los tumores infantiles, sigue siendo desconocida, no existiendo una asociación clara entre la incidencia del mismo y la exposición prenatal o postnatal a drogas, agentes químicos, fuentes de energía electromagnéticas o radiación (*Bunin et al., 1990; De Roos et al., 2001; Patton et al., 2004*). Sin embargo, en el 1-2% de casos se puede observar una asociación familiar de la enfermedad (*Shojaei-Brosseau et al., 2004*). En la mayor parte de los mismos (90%), dicha asociación familiar se atribuye a mutaciones germinales en los genes *PHOX2B* (Paired-like homeobox 2B) (*Mosse et al., 2004, Trochet et al., 2004*) y *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) (*Chen et al., 2008; Janoueix-Lerosey et al., 2008; Mosse et al., 2008*).

Los Neuroblastomas son tumores neuroectodérmicos derivados de las células simpáticas primitivas pluripotentes. Estas células embrionarias forman la cresta neural y tras la migración y diferenciación forman los diferentes tejidos del sistema nervioso simpático (Figura 3). A partir del tubo neural emergen las células pluripotentes de la cresta neural que migran, de forma ordenada y coordinada, adyacentes a la aorta dorsal, formando la cadena simpática primaria. Desde esta estructura migran para formar los ganglios prevertebrales de los plexos mesentéricos y celíacos, y finalmente, una subpoblación adquiere la capacidad de responder a los glucocorticoides. Bajo la influencia de estas hormonas, van perdiendo los rasgos neuronales y adquiriendo la expresión de marcadores endocrinos (*McConville et al., 2003*). El origen y distribución de este tipo de células son la causa de que la mayoría de los neuroblastomas se localicen en la glándula

adrenal (35%) o a lo largo de la cadena ganglionar del sistema nervioso simpático (abdomen 30-35% y mediastino 20%) (Brodeur et al., 2006). Se ha demostrado que la localización del tumor primario tiene importancia en el pronóstico de la enfermedad, siendo más favorable si la localización es torácica o pélvica que si es adrenal (Coldman et al., 1980).

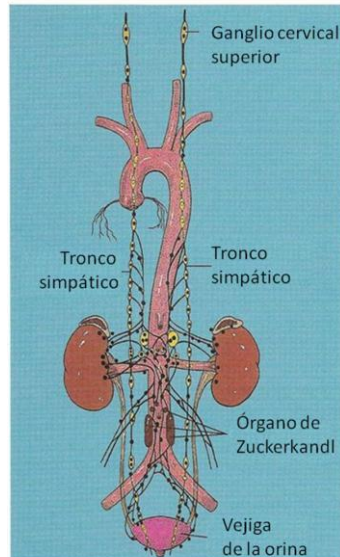


Figura 3: Distribución del sistema nervioso simpático. Los ganglios simpáticos se extienden desde el cuello hasta la pelvis, incluyendo la médula adrenal.

El comportamiento clínico de los neuroblastomas es variable, en niños mayores de un año, aproximadamente un 50% de los casos se presentan con enfermedad diseminada, estos tumores son agresivos, quimioresistentes y generalmente difícilmente curables. Este grupo de pacientes son la principal causa de la desproporcionada contribución del neuroblastoma a la mortalidad infantil. Por el contrario, existen grupos de pacientes con un pronóstico mucho más favorable, entre ellos está el grupo de tumores localizados, estos tumores son mucho menos agresivos, quimiosensibles y con una alta tasa de curación. También existe una pequeña proporción de tumores en los que se observa una regresión espontánea, aun existiendo enfermedad diseminada, es lo que se llama el estadio 4 especial (4S) del que más tarde hablaremos (Bown, 2001). Por lo tanto nos encontramos delante de un tipo de tumor donde podemos observar una gran heterogeneidad clínica que lo hace un tanto especial.

El diagnóstico del neuroblastoma se realiza con el estudio anatomopatológico del tumor primario mediante microscopía óptica

convencional (Brodeur et al., 1988). El diagnóstico anatomopatológico se respalda con la detección de células diseminadas en hueso o médula ósea mediante el estudio de aspirados de médula ósea o biopsias óseas en combinación con la determinación de un aumento de catecolaminas en orina (ácido homovalínico (HVA) y ácido vanililmandélico (VMA)). La extensión de la enfermedad se determina con la utilización de diferentes técnicas de imagen como son las radiografías convencionales, ecografías, tomografía computerizada, resonancia magnética, o técnicas de imagen combinadas con técnicas de medicina nuclear como es la gammagrafía con metaiodobenzilguanidina (MIBG).

La evaluación morfológica de los aspirados de médula ósea no sólo es importante para el estadiaje y la estratificación del riesgo al diagnóstico, sino que también se utiliza para valorar y monitorizar la respuesta durante el tratamiento. La citología convencional de los aspirados de médula ósea, es la técnica clásica para la detección de células diseminadas de neuroblastoma. La sensibilidad de este método es muy limitada, ya que sólo es capaz de detectar células tumorales si su presencia en la muestra es mayor al 0,1% del total de células (Cheung et al., 1997-A; Mehes et al., 2003). La utilización de nuevos métodos y marcadores para la detección de células diseminadas de neuroblastoma (estudio de enfermedad mínima residual (EMR)), se discutirá a lo largo del presente trabajo.

2.2.- Clasificación

En el pasado se utilizaron tres importantes sistemas de estadiaje y clasificación de los pacientes con neuroblastoma en diferentes grupos de riesgo:

- 1.- El propuesto por Evans (*Children's Cancer Study Group*) (Evans et al., 1971).
- 2.- El utilizado por el *Pediatric Oncology Group* (Hayes et al., 1983).
- 3.- El utilizado por el *American Joint Committee on Cancer* (*American Joint Committee on Cancer. Manual for staging of cancer., 1983*).

Las diferencias entre estos sistemas de clasificación eran sustancialmente importantes, lo que impedía la comparación de los resultados de los diferentes ensayos clínicos y los estudios biológicos realizados basados en las diferentes clasificaciones. Motivado por esta serie de problemas, se crearon nuevos sistemas de estadiaje basados en la clasificación de Evans y formulados por Brodeur y colaboradores (Brodeur et al., 1988; Brodeur et al., 1993). Estos sistemas de clasificación se denominan *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) (Tabla 1) y el *Internacional Neuroblastoma Response Criteria* (INRC) (Tabla 2); Ambos son los mayoritariamente aceptados en la actualidad y se basan en los datos

clínicos, radiológicos y la evaluación quirúrgica para la clasificación de los pacientes con neuroblastoma.

Tabla 1: Estadios según la clasificación INSS (*Brodeur et al., 1993*).

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

Tabla 2: Criterios internacionales de respuesta al tratamiento (INRC) (Brodeur et al., 1993).

Respuesta	Descripción
RC	Respuesta completa: desaparición total del tumor, sin indicios de enfermedad. Las concentraciones de VMA/HVA son normales.
MBRP	Respuesta parcial muy buena: el tumor primario ha disminuido entre 90 y 99% y no hay indicios de enfermedad metastásica. Las concentraciones de VMA/HVA en orina son normales. Se permiten cambios residuales en hueso.
RP	Respuesta parcial: una reducción entre 50 y 90% en el tamaño de todas las lesiones cuantificables; el número de localizaciones positivas en las exploraciones óseas se ve disminuido en más de 50% y no hay presencia de lesiones nuevas.
RM	Respuesta mixta: no hay lesiones nuevas, se ve una reducción entre 50 y 90% de cualquier lesión cuantificable (primaria o metastásica) con menos del 50% de reducción en otras lesiones y menos del 25% de aumento en cualquier lesión.
EE	Enfermedad estable: no hay lesiones nuevas; reducción de menos de 50% y aumento menor del 25% en cualquier lesión.
PE	Progresión de la enfermedad: cualquier lesión nueva; aumento de cualquier lesión cuantificable en más del 25%; médula ósea previamente negativa que se positiviza. Un aumento persistente en la concentración VMA/HVA en la orina con enfermedad estable, o aumento en la concentración de VMA/HVA sin indicios clínicos o radiográficos de evolución que indique enfermedad evolutiva, pero que demanda un seguimiento continuo.

Los parámetros pronósticos más importantes son el estadio de la enfermedad y la edad del paciente al diagnóstico (Pearson et al., 2000). De hecho, se trata del tumor pediátrico donde la edad juega uno de los papeles más importantes en cuanto al pronóstico. En un primer momento el corte se situó en los 12 meses y así se observó que los niños con más de un año tenían un peor pronóstico que los menores de dicha edad y que el pronóstico empeoraba a medida que aumenta el estadio de la enfermedad (Coldman et al., 1980). La excepción a este criterio venía dada por el estadio 4 especial (4S), en este caso el pronóstico era similar a los estadios 1 y 2. Posteriormente, se reevaluó dicho criterio al observar, en largas series de pacientes, que el pronóstico de los pacientes de entre 12 y 18 meses era similar al de los menores de 1 año y el punto de corte se situó en los 18 meses (London et al., 2005; Moroz et al., 2011)

Además de la clasificación INSS y basándose en diferentes estudios, el Grupo de Oncología Infantil (COG) propuso una clasificación que asigna a todos los pacientes a grupos de riesgo bajo, intermedio o alto, dependiendo de la edad, la estratificación en el INSS y la biología tumoral (Tabla 3).

Tabla 3: Estratificación del riesgo propuesta por el COG (*Maris et al., 2007*).

Estadio	Edad	MYCN	Ploidía	Histología	Otros	Grupo de riesgo
1						Bajo
2A/2B		No Amp No Amp No Amp Amp			Resección >50% Resección <50% Sólo biopsia	Bajo Intermedio Intermedio Alto
3	<547 días ≥547 días ≥547 días	No Amp No Amp Amp No Amp		Favorable No favorable		Intermedio Intermedio Alto Alto
4	<365 días <365 días 365-547 días 365-547 días 365-547 días 365-547 días ≥547 días	Amp No Amp Amp No Amp No Amp Amp	DI=1 DI>1	No favorable Favorable		Alto Intermedio Alto Alto Alto Intermedio Alto
4S	<365 días <365 días <365 días <365 días <365 días <365 días <365 días	No Amp No Amp Ausente No Amp No Amp Amp	DI>1 DI=1 Ausente	Favorable Ausente No favorable	Asintomático Sintomático	Bajo Intermedio Intermedio Intermedio Intermedio Intermedio Alto
No amp: No amplificado; Amp: Amplificado.						
DI: índice de DNA						

Dicha asignación determina el plan de tratamiento para cada paciente. Los pacientes asignados a los grupos de bajo, intermedio y alto riesgo tienen una supervivencia total tras tres años después del diagnóstico de más del 90%, entre 70% y 90% y alrededor del 30% respectivamente.

Vandesompele y colaboradores propusieron asimismo otro modelo para mejorar la evaluación del riesgo y la estratificación de la terapia (*Vandesompele et al., 2005*). Mediante el análisis de los datos obtenidos a partir del estudio de 231 tumores con la técnica de CGH (hibridación genómica comparada), identificaron tres importantes grupos clinicogenéticos. Dentro del subgrupo 1 se incluyen los niños menores de 1 año con un estadio bajo, un índice de contenido de DNA en el tumor cerca de la triploidía, alteraciones numéricas e histología favorable. Este grupo de pacientes tiene

un pronóstico excelente. El subgrupo 2 incluye a los pacientes mayores, con índices de DNA en tumor cerca de la diploidía/tetraploidía y estadio 4, caracterizados por tener histología desfavorable, ganancia parcial de 17q, pérdida de 11q y/o 3p. Estos pacientes tienen una supervivencia a los 5 años de aproximadamente un 40%. Los pacientes del subgrupo 3 tienen una supervivencia parecida. Estos presentan tumores con índices DNA diploides/tetraploides con estadios de tumor altos e histología desfavorable. Además presentan ganancia parcial de 17q, pérdida de 1p y amplificación de *MYCN*. Los pacientes del subgrupo 2 son generalmente mayores que los del subgrupo 3 (edad media al diagnóstico de 41 meses frente a 26).

Los perfiles de expresión génica en los tumores también se han utilizado para identificar patrones predictivos del pronóstico clínico (Ohira et al., 2003; Hiyama et al., 2004; Takita et al., 2004; Wei et al., 2004; Krasnoselsky et al., 2005). Los diferentes grupos de investigación comparan los perfiles obtenidos de tumores con diferente pronóstico (favorable y desfavorable) para evidenciar diferencias entre ellos y así identificar nuevos marcadores pronósticos o dianas terapéuticas en neuroblastomas agresivos (Ohira et al., 2003; Hiyama et al., 2004; Takita et al., 2004). Krasnoselsky y colaboradores identifican un conjunto de genes implicados en el ciclo celular y/o en la segregación cromosómica que distingue a los tumores estadio 4 del resto de los tumores. Wei y colaboradores identifican 19 genes (entre ellos *MYCN*, *CD44*, *DLK1*, *SLIT3* y *ROBO2*) que predicen el pronóstico en un 98% de los pacientes de neuroblastoma estudiados (Krasnoselsky et al., 2005). Sin embargo, la integración de estos hallazgos en los algoritmos de predicción del riesgo clínico requiere estudios independientes con grandes grupos de pacientes tratados uniformemente.

Estas clasificaciones se han utilizado de manera internacional durante muchos años, lo que ha evidenciado algunos problemas que han impulsado el diseño de nuevos sistemas de clasificación. De hecho, la mayoría de ellas dependen del estudio del tumor para la asignación del riesgo y muchos de los protocolos de tratamiento se inician de manera previa a la cirugía, dependiendo incluso el estadiaje de la pericia del cirujano. Por ello, los grandes grupos cooperativos a nivel internacional discutieron un nuevo sistema de estratificación de los pacientes agrupándolos según el riesgo en 4 grupos, riesgo muy bajo, riesgo bajo, riesgo intermedio y alto riesgo. Además, el *International Neuroblastoma Risk Group Staging System* (INRGSS) estableció una estratificación tumoral al diagnóstico previa al inicio del tratamiento. Esta clasificación establece dos estadios localizados y dos metastásicos (Cohn et al., 2009; Monclair et al., 2009) (Tabla 4).

Tabla 4: Estadaje internacional según el INRGSS.

Estadio	Descripción
L1	Tumor localizado que no afecte a estructuras vitales como se define en la lista de Factores de riesgo definidos por imagen y confinado en un compartimento del cuerpo.
L2	Tumor locorregional con presencia de uno o más factores de riesgo definidos por imagen.
M	Enfermedad metastática a distancia (excepto estadios MS).
MS	Enfermedad metastática en niños menores de 18 meses con metástasis confinadas a la piel, hígado y/o médula ósea.

2.3.- Histopatología

Los tumores neuroblásticos pertenecen al grupo de tumores infantiles de células pequeñas, redondas y azules. Otros miembros de este grupo son los linfomas linfoblásticos, el Sarcoma de Ewing, los tumores neuroectodérmicos primitivos, los rabdomyosarcomas y otros sarcomas de partes blandas de células pequeñas indiferenciadas (*Brodeur et al., 2006*).

Históricamente, los tumores neuroblásticos se han dividido en tres categorías atendiendo a su morfología y basándose en la presencia de neuroblastos y/o células gangliocíticas diferenciadas. Las tres categorías resultantes de esta clasificación son el neuroblastoma, el ganglioneuroblastoma y el ganglioneuroma (*Brodeur et al., 2006*). En 1984 el grupo de Shimada y colaboradores, propusieron un nuevo sistema de clasificación basado en la cantidad del estroma schwanniano, el grado de diferenciación, el índice de mitosis-cariorrexis y la edad al diagnóstico, distinguiendo dos grupos de histopronóstico: favorable y desfavorable (*Shimada et al., 1984*). Actualmente se utiliza la *Internacional Neuroblastoma Pathology Classification* (INPC), basada en la clasificación original de Shimada con pequeñas modificaciones (*Shimada et al., 1999; Shimada et al., 2001*). Esta clasificación divide a los tumores neuroblásticos periféricos en cuatro categorías morfológicas básicas y sus subtipos:

1. Neuroblastoma indiferenciado, pobremente diferenciado y diferenciado.
2. Ganglioneuroblastoma.
3. Ganglioneuroma.
4. Ganglioneuroblastoma nodular.

Los neuroblastomas están compuestos de células uniformes, pequeñas y redondas, con escaso citoplasma y frecuentemente cromatina con estructura granular (*Brodeur et al., 2006*). Diferentes parámetros como son el grado de diferenciación basado en la presencia o ausencia de neuropilo, la

diferenciación ganglionar de las células tumorales (indiferenciado, pobremente diferenciado o en diferenciación), y la presencia o ausencia de calcificación permiten diferenciar subtipos del tumor. Las células del tumor pueden formar rosetas, que están compuestas por grupos de neuroblastos alrededor de un núcleo de neuropilos. El tipo de tumor homólogo más diferenciado y benigno del neuroblastoma es el ganglioneuroma. Se compone de células ganglionares maduras envueltas de un estroma compuesto por células de Schwann. El grado de diferenciación de los ganglioneuroblastomas es intermedio entre los neuroblastomas y los ganglioneuromas. Este tipo de tumor presenta grandes áreas de estroma compuestas por células de Schwann que rodea a islas de tejido neuroblástico pobres de estroma, como también pequeños focos dispersos (tipo intermedio) o grandes nódulos visibles (tipo nodular) (Figura 4).

En base a diferentes características como la edad del paciente y las características morfológicas (grado de diferenciación neuroblástica, presencia o ausencia de estroma schwanniano e índice de mitosis-cariorexis) podemos clasificar los tumores neuroblásticos como de histología favorable o histología no favorable (Tabla 5) (*Shimada et al., 1999; Peuchmaur et al., 2003*).

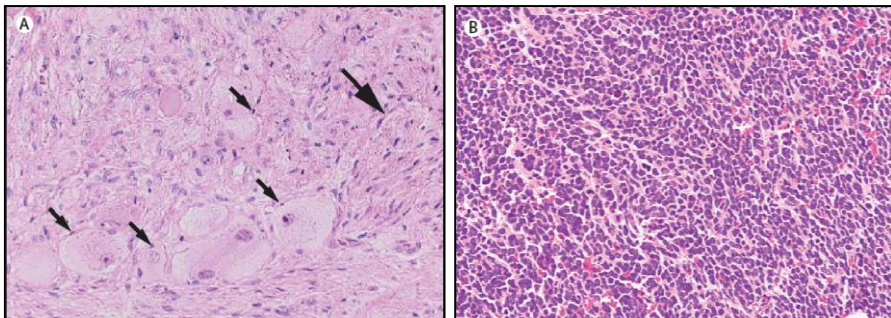


Figura 4: Tumores neuroblásticos en varios grados de diferenciación (A) Se observan células de Schwann y células ganglionares prominentes (marcadas con flechas) en el estroma rico de neuroblastoma (B) El estroma pobre de neuroblastoma consistente en células pequeñas, redondas y azules densamente empaquetadas con escaso citoplasma (*Adaptado de Maris et al., 2007*).

Los neuroblastomas pobremente diferenciados y diferenciados con índice de mitosis-cariorexis bajo e intermedio, en pacientes menores de 18 meses y los neuroblastomas diferenciados con índice de mitosis-cariorexis bajo, en pacientes entre 18 meses y 5 años de edad se clasifican como favorables. Todo el resto de neuroblastomas se consideran desfavorables. Los ganglioneuroblastomas nodulares se clasifican de acuerdo a la

histología de los nódulos neuroblásticos con el mismo criterio que los neuroblastomas. Los ganglioblastomas y los ganglioneuromas se consideran de pronóstico favorable.

Tabla 5: Evaluación en grupos pronóstico según la clasificación INPC (modificado de Shimada et al., 1999).

INPC	Histología	Clasificación de Shimada Original	Grupo pronóstico
Neuroblastoma Favorable < 1,5 años	(Estroma Schwanniano pobre)	Estroma pobre Favorable	Favorable
1,5-5 años	Pobrementemente diferenciado y MKI bajo o intermedio		
Desfavorable < 1,5 años	Diferenciado y MKI bajo	Desfavorable	Desfavorable
1,5-5 años	a.- tumor indiferenciado b.- MKI alto		
≥ 5 años	a.- tumor indiferenciado o pobrementemente diferenciado b.- MKI alto o intermedio Todos los tumores		
Ganglioneuroblastoma intermedio	Estroma Schwanniano rico	Estroma rico Intermedio Favorable	Favorable
Ganglioneuroma En maduración Maduro	Estroma Schwanniano dominante	Diferenciado (favorable) Ganglioneuroma	Favorable
Ganglioneuroblastoma nodular	(Estroma schwanniano compuesto; estroma rico/ pobre y dominante)	Estroma rico nodular (desfavorable)	Desfavorable

MKI: índice de mitosis-cariorrexis

2.4.- Genética

El neuroblastoma, como la mayoría de los tumores, presenta una compleja variedad de alteraciones genéticas. Gran parte de ellas se adquieren en las células tumorales y algunas pueden llegar a predecir la evolución clínica, teniendo en algunos casos valor pronóstico independiente de la enfermedad. Estos datos apoyan la estratificación de los pacientes en los diferentes grupos de riesgo, que permiten adaptar así los tratamientos. En la práctica clínica se utilizan tratamientos intensivos para los casos de alto riesgo y se disminuye el tratamiento para evitar los efectos adversos en pacientes con tumores relativamente benignos (Bown, 2001). En los últimos años se han incrementado los ensayos clínicos que tienen en cuenta las variables genéticas del tumor en la elección del tratamiento, de esta manera se pretende adecuar las diferentes posibilidades terapéuticas a los distintos grupos de riesgo determinados por todas las variables existentes y de las características genéticas del tumor. En la figura 5 se muestra la variabilidad

de alteraciones genómicas que se han observado en los tumores de neuroblastoma.

Entre las alteraciones genómicas que podemos encontrar en los neuroblastomas agresivos se encuentran la diploidía y la tetraploidía (Maris et al., 1999), la amplificación del oncogén *MYCN* (Brodeur et al., 1984; Christiansen et al., 1995), la delección de la región cromosómica 1p36 (Christiansen et al., 1988; Caron et al., 1996) y la ganancia de la región cromosómica 17q (Plantaz et al., 1997; Bown et al., 1999). Además, se han descrito como marcadores de posible valor pronóstico las pérdidas de heterocigosidad frecuentes en otras regiones cromosómicas especialmente en 2q, 3p, 4p, 9p, 11q, 14q y 18q (Takita et al., 1995; Ejescar et al., 1998; Luttikhuis et al., 2001; Westermann et al., 2002). Se han descrito asociaciones entre pérdidas de 11q, 3p y 14q, que a su vez se correlacionan inversamente con la amplificación de *MYCN* y la delección de 1p, y que identifican subgrupos diferentes de tumores avanzados (Takita et al., 1995; Ejescar et al., 1998; Luttikhuis et al., 2001).

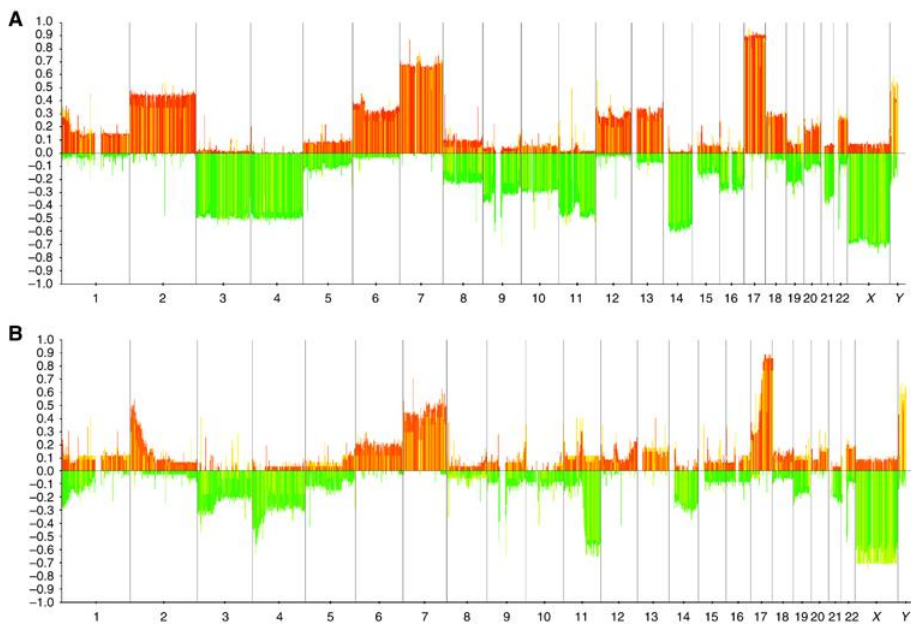


Figura 5: Frecuencias de ganancias y pérdidas genómicas estudiadas mediante Array-CGH en tumores de NB (rojo: ganancias; verde: pérdidas). Las líneas verticales corresponden a la separación entre los cromosomas. A: Casos con alteraciones cromosómicas numéricas. B: Casos con alteraciones segmentarias (adaptado de Schleiermacher et al., 2011).

2.4.1.- Ploidía

Utilizando la técnica de la citometría de flujo, Look y colaboradores consiguieron distinguir entre tumores diploides e hiperdiploides en cuanto al contenido de DNA en series de casos de neuroblastoma. Los tumores hiperdiploides mostraban un índice de contenido de DNA que oscilaba en el entre 1,07 a 2,42. En este estudio, el contenido en DNA se asociaba con el estadio del tumor, así, la diploidía se relacionó con estadios avanzados del mismo. Además observaron que la amplificación de *MYCN* estaba presente de forma estadísticamente significativa en los tumores diploides. Por otra parte los tumores hiperdiploides mostraron una asociación significativa con una mejor respuesta a la quimioterapia en niños con neuroblastomas irreseccables (Look et al., 1984). En estudios posteriores se aumentó el número de pacientes analizados con enfermedad avanzada. La hiperploidía se asoció claramente con alta supervivencia a largo plazo en niños mayores y menores de un año (Look et al., 1991). Sin embargo, no se observó ninguna asociación entre la ploidía y el comportamiento clínico en niños mayores de 2 años.

Por otra parte, otros grupos distinguían tres niveles de ploidía, pseudodiploide, pseudotriploide y pseudotetraploide, observando que algunas alteraciones estructurales como la delección de 1p eran más frecuentes en tumores diploides y tetraploides y como lo descrito por otros grupos, la amplificación de *MYCN* estaba restringida al grupo diploide (Hayashi et al., 1989; Ladenstein et al., 2001).

El índice de DNA en las células de neuroblastoma se utiliza para predecir la respuesta al tratamiento y el pronóstico de los pacientes, especialmente en los niños menores de 1 año con estadio avanzado de la enfermedad. Basándonos en la ploidía, los neuroblastomas se pueden dividir en dos subgrupos. La mayoría de las líneas celulares de neuroblastomas y los tumores de estadios avanzados tienen aproximadamente un contenido diploide o tetraploide en cuanto al número de cromosomas, por el contrario los neuroblastomas con pronóstico favorable, especialmente en niños menores de un año, se caracterizan por tener un índice de DNA hiperdiploide o aproximadamente triploide (Brodeur et al., 1997; Maris et al., 1999). Virtualmente todos los tumores diploides y tetraploides muestran diferentes alteraciones genéticas que incluyen amplificaciones, delecciones y translocaciones desequilibradas resultado de la inestabilidad genómica. En el caso de los tumores hiperdiploides y triploides no se observan estos hallazgos. Estos tumores tienen básicamente defectos en la mitosis y la segregación cromosómica y por ello se caracterizan por ganancias de todos los cromosomas con pocos reordenamientos estructurales (Maris et al., 1999).

2.4.2.- Amplificación de *MYCN*

EL proto-oncogén *MYCN* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 2 (2p24.3) y se clonó originalmente en 1983. Se identificó como una secuencia amplificada de DNA con homología parcial al proto-oncogén *MYC* (*c-myc*) en líneas celulares de neuroblastoma que presentaban los fenómenos de amplificación por dobles diminutos o zonas homogéneamente teñidas (Figura 6) (Kohl *et al.*, 1983; Schwab *et al.*, 1983). Estos fenómenos son representativos de amplificación del DNA y se asocian a la delección del brazo corto del cromosoma 1 (Biedler *et al.*, 1973; Brodeur *et al.*, 1977). El contenido genético de la región 2p24.3 se transpone a los dobles diminutos durante el proceso de amplificación, y los dobles diminutos se integran linealmente en regiones cromosómicas al azar formando las regiones homogéneamente teñidas. Como resultado del proceso de amplificación normalmente acaba habiendo desde 50 a 400 copias del gen por célula, lo que provoca altos niveles de expresión del mismo (Seeger *et al.*, 1988). Un número medio de copias (de 3 a 10) representa, bien un bajo nivel de amplificación o bien aneuploidía. Brodeur y colaboradores fueron los primeros que observaron que la amplificación de *MYCN* se encontraba en un importante porcentaje de tumores primarios no tratados y que se correlacionaba de manera importante con estadios avanzados (Brodeur *et al.*, 1984). Seeger y colaboradores demostraron que la amplificación se correlacionaba con una progresión rápida de la enfermedad y mal pronóstico (Seeger *et al.*, 1985). Investigaciones posteriores han confirmado que la amplificación del oncogén *MYCN* por encima de 10 copias por genoma haploide es una variable pronóstica independiente muy potente. La evaluación del estado de *MYCN* al diagnóstico en el tumor es esencial para la evaluación inicial de todos los pacientes con neuroblastoma (Maris *et al.*, 1999).

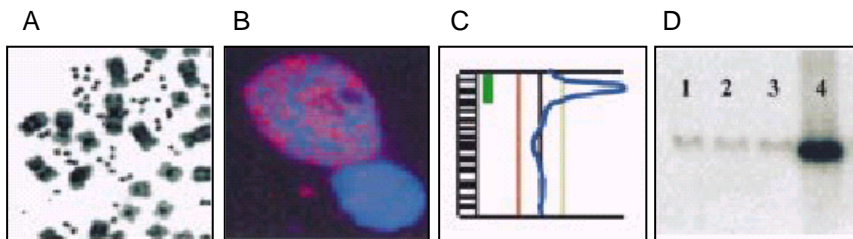


Figura 6: Amplificación del oncogén *MYCN* observada mediante diferentes técnicas. A: amplificación de *MYCN* por dobles diminutos. B: Núcleo en interfase donde se observa la amplificación de *MYCN* por hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con una sonda marcada en rojo. C: Apariencia de la amplificación de *MYCN* mediante CGH. D: Amplificación de *MYCN* observada en un Southern Blot (*adaptado de Bown, 2001*).

La amplificación del oncogén *MYCN* está presente en aproximadamente un 20% de pacientes con NB y se suele asociar a estadios avanzados y que progresan con rapidez a pesar del tratamiento (Meyer y Penn, 2008). De hecho el porcentaje de pacientes con amplificación del oncogén aumenta al 40% en pacientes con enfermedad avanzada y sólo está presente en un 5-10% de pacientes en estadios bajos.

La amplificación de *MYCN* se asocia a niveles muy elevados de expresión de la proteína *MYCN* (Nisen et al., 1988; Slavc et al 1990), sin embargo el significado pronóstico independiente de la presencia del RNA mensajero de *MYCN* o de la proteína sigue sin estar totalmente aclarado. Se sabe que esta sobreexpresión afecta de forma directa o indirecta a genes implicados en la regulación del ciclo celular (*MDM2*, *MCM2*, *ODC* y *ID2*), apoptosis (*TP53*), diferenciación (*CDC42* y *PAX3*), resistencia a drogas (*MRP1*) y estabilidad del mismo *MYCN* (*Aurora kinasa A*) (Figura 7) (Huang et al., 2013; Bell et al., 2010).

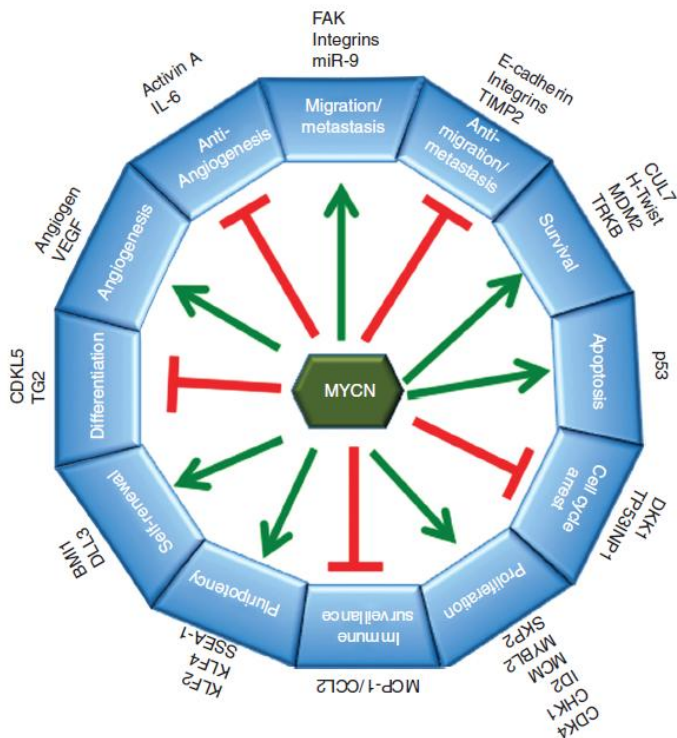


Figura 7: Rutas y genes alterados por la sobreexpresión de *MYCN* (adaptada de Huang et al., 2013).

La región genómica que se amplifica con *MYCN* es muy grande, extendiéndose normalmente de 500 a 1000 Kb. Debido al gran tamaño de la zona amplificada, se ha postulado que algunos de los genes adicionales amplificados cercanos a *MYCN* podrían contribuir al fenotipo del tumor. Mapas de alta resolución del *locus* donde se sitúa *MYCN* muestran que existe una región de 130Kb que es la diana central de la amplificación (Reiter *et al.*, 1996). En esta región diana no se han descrito otros genes, pero a 300 Kb en 5' se localiza el gen *DDX1* que se coamplifica junto a *MYCN* en aproximadamente un 40-50% de los casos (George *et al.*, 1996). *DDX1* no se ha visto amplificado en ausencia de la amplificación de *MYCN*, por lo tanto se piensa que *MYCN* es el responsable del fenotipo agresivo de los tumores que presentan amplificación en el *locus* 2p24.3, pero que *DDX1* podría contribuir a la naturaleza agresiva de los tumores que presentan amplificación del oncogén.

De la misma manera, el gen *NBAS*, localizado en la misma región a 400 Kb de *MYCN*, se puede coamplificar (Wimmer *et al.*, 1999), sin embargo al igual que la contribución de la amplificación del gen *DDX1* parece que no tenga una asociación significativa con el fenotipo o la agresividad de los tumores de neuroblastoma (Kaneko *et al.*, 2007).

2.4.3.- Deleción de 1p

Brodeur y colaboradores fueron los primeros que observaron que las deleciones en el brazo corto del cromosoma 1 (1p) eran una característica común en los cariotipos de las líneas celulares de neuroblastoma y en los tumores avanzados (Brodeur *et al.*, 1977; Brodeur *et al.*, 1981). Estudios genéticos moleculares posteriores han confirmado estas alteraciones describiendo la pérdida de heterocigosidad en la zona en un rango que oscila desde 30% al 50% de los tumores primarios (Figura 8) (Brodeur *et al.*, 1977; Gilbert *et al.*, 1984; Brodeur *et al.*, 1989).

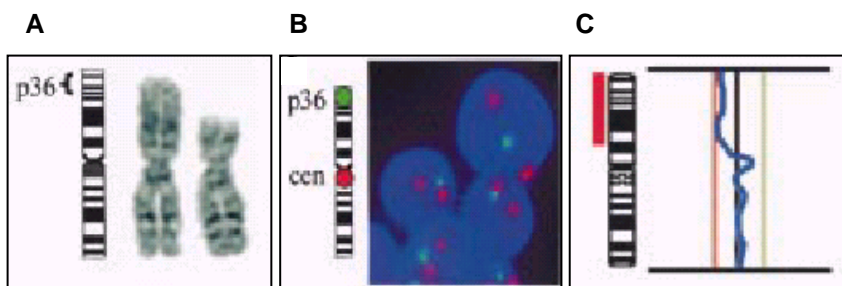


Figura 8: Deleción de 1p observada mediante diferentes técnicas. A: Cariotipo con bandas G; B: Hibridación FISH; C: CGH metafásica (*adaptado de Bown, 2001*).

La mayoría de las deleciones de 1p son grandes, abarcando casi todo el brazo corto del cromosoma, siendo la zona más distal la región más frecuentemente delecionada (1p36.2 a 1p36.3) (Biegel *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 1995; Martinsson *et al.*, 1995; White *et al.*, 1995; White *et al.*, 1997; White *et al.*, 2001). Takeda y colaboradores dividieron sus tumores con pérdida de heterocigosidad en 1p en dos grupos: los que poseían grandes deleciones terminales que abarcaban la región desde 1pter a 1p32 y otro grupo con deleciones intersticiales pequeñas en 1p36 (Takeda *et al.*, 1994). Estos autores describieron una relación entre las deleciones terminales grandes en 1p, la amplificación de *MYCN* y un mal pronóstico de la enfermedad. Caron y colaboradores confirmaron estos resultados (Caron *et al.*, 1993). La totalidad de estos hallazgos sugieren la existencia de al menos dos genes supresores de tumores localizados en 1p (uno en 1p36.3 y otro en 1p35-p36.1). Se han analizado varios genes como posibles genes supresores de tumores de la zona 1p36. Entre estos genes se encuentran *TP73* homólogo de *TP53*, *CDC2L1* homólogo de *CDK2*; los factores de transcripción *HKR3*, *DAN*, *PAX7*, *ID3* y *E2F2*; los factores de elongación de la transcripción *TCEB3*; y dos miembros de la familia de factores de necrosis tumoral *TNFn2* y *DR3*. Sin embargo todos estos genes excepto *HKR3* y *DR3* se encuentran fuera de la región consenso de pérdida y en ellos no se han encontrado mutaciones en el alelo no delecionado (Maris *et al.*, 1999).

Debido a que se ha descrito una fuerte correlación entre la deleción de 1p y características de alto riesgo como la edad de diagnóstico por encima de 1 año, enfermedad metastática o la amplificación de *MYCN*, el valor pronóstico independiente de esta alteración sigue sin estar del todo claro. Un estudio retrospectivo realizado por el *Children's Oncology Group* indica que la deleción de 1p junto con la deleción de 11q muestra una asociación con mal pronóstico en un subgrupo de pacientes con características de bajo riesgo y riesgo intermedio (Attiyeh *et al.*, 2005). Así, con todos los datos disponibles, actualmente, en neuroblastomas localizados (estadios 1 y 2) y estadios 4S, la deleción de 1p permite identificar a un grupo de pacientes, generalmente sin *MYCN* amplificado ni otros factores adversos, como enfermos de alto riesgo.

2.4.4.- Ganancia de 17q

Las alteraciones recurrentes que afectan al brazo largo del cromosoma 17 se describieron por primera vez por Gilbert y colaboradores al analizar cariotipos con bandas G procedentes de cultivos celulares de tumores primarios de neuroblastoma y de diferentes líneas celulares (Gilbert *et al.*, 1984). Actualmente se conoce que la translocación desequilibrada que tiene como resultado la ganancia de 17q y la pérdida parcial en el otro cromosoma afectado, es la alteración cromosómica más común en los neuroblastomas primarios. El cromosoma que se encuentra más frecuentemente implicado en la translocación desequilibrada es el

cromosoma 1, aunque se ha descrito la alteración también en otros cromosomas (Figura 9) (Savelyeva *et al* 1994; Van Roy *et al.*, 1994; Lastowska *et al.*, 1997-A). Estudios posteriores demostraron que la ganancia en la zona 17q23.1-17qter se puede observar en un 50-75% de los tumores primarios de neuroblastoma (Altura *et al* 1997; Lastowska *et al.*, 1997-A; Plantaz *et al.*, 1997). La región mínima de ganancia se acotó mediante mapeo con FISH y abarca 25Mb situadas en la región cromosómica 17q23.1-17qter (Meddeb *et al.*, 1996).

La ganancia de 17q se asocia a características pronósticas adversas y por lo tanto puede ser útil para la estratificación del tratamiento (Caron, 1995; Lastowska *et al.*, 1997-B; Theissen *et al.*, 2014).

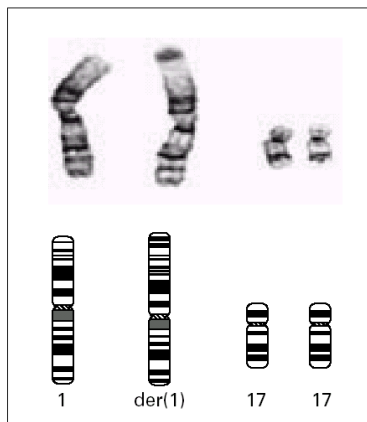


Figura 9: Translocación desequilibrada que tiene como resultado la pérdida de 1p36 y la ganancia de 17q21-qter (adaptado de Brodeur *et al.*, 1988).

2.4.5.- Alteraciones en el cromosoma 11

Estudios genéticos moleculares demostraron que la pérdida en 11q se podía observar en aproximadamente un tercio de los tumores primarios de neuroblastoma (Srivatsan *et al.*, 1993; Takita *et al.*, 1995; Brinkschmidt *et al.*, 1997; Lastowska *et al.*, 1997-A; Plantaz *et al.*, 1997). Posteriormente, se demostró que este número podía ser incluso mayor y que la delección alélica en 11q23 en una extensa serie estudiada llegó a ser del 44% (Guo *et al.*, 1999; Maris *et al.*, 2001). La región de pérdida más común está situada en 11q23, indicando una posible ubicación de un gen supresor de tumores para neuroblastoma.

En contraste con la pérdida de 1p, esta pérdida de 11q está inversamente correlacionada con la amplificación de *MYCN*. Esta circunstancia hizo que esta alteración cobrara importancia en la estratificación de los pacientes y así que se beneficiaran de una mejor adecuación terapéutica. Aunque en los pacientes que presentan la pérdida de 11q no se observa disminución de la supervivencia, sí que se observó una disminución significativa de la

supervivencia global en aquellos casos donde el *MYCN* no estaba amplificado (Maris et al., 2001; Guo et al., 1999).

2.4.6.- Alteraciones en el cromosoma 14

La delección del brazo largo del cromosoma 14 (14q) es también una alteración que se puede encontrar frecuentemente en los neuroblastomas. La pérdida de 14q se identificó por primera vez en 1989 en 6 de 12 neuroblastomas estudiados por Suzuki y colaboradores utilizando un marcador FRLP situado en la región 14q32 (Suzuki et al., 1989). Los datos recogidos de estudios posteriores sobre un total de 180 tumores mostraron pérdida de la región 14q32 en un 27% de los casos (Fong et al., 1992; Takayama et al.; 1992; Srivatsan et al., 1993; Takita et al., 1995). Un estudio realizado con 372 neuroblastomas primarios, hecho con marcadores espaciados uniformemente a lo largo de 14q, observó la pérdida en un 22% de los casos y definió una región común de pérdida contenida en 14q23-qter (Thompson et al., 2001). La pérdida de 14q está fuertemente correlacionada con la pérdida de 11q e inversamente correlacionada con la presencia de la amplificación de *MYCN*. Además está presente en todos los grupos clínicos de riesgo, indicando que dicha alteración es de aparición temprana en el desarrollo del tumor.

2.4.7.- Alteraciones genómicas en otros cromosomas

A lo largo de los años se han descrito multitud de alteraciones genómicas en otras localizaciones cromosómicas. Entre ellas están las situadas en 2q, 3p, 4p, 9p o 14q, e incluso algunas han demostrado estar asociadas con el pronóstico de la enfermedad. Por otra parte, se ha descrito que puede existir una evolución o acumulación de alteraciones genómicas que se pueden observar en los tumores en recaída que no estaban presentes en el tumor primario, especialmente en aquellos tumores diagnosticados como localizados y que acabaron evolucionando a tumores metastáticos.

Por ejemplo, la pérdida de 2q (2q3.3) se asocia a la pérdida de expresión del gen *CASP8* (Teitz et al., 2000). En el caso de 3p la región mínima de pérdida se ha delimitado en la región 3p25.3-p14.3, identificándose en ella el gen supresor de tumores *RASSF1A* (Ejeskar et al., 1998). En el caso de 4p la región mínima de pérdida se localizó en 4p16 y se propuso una posible asociación con NB hereditario (Perri et al., 2002). En el caso de 9p la región de pérdida se localizó en 9p21 y en 14q en 14q21.32 (Thompson et al., 2001). La LOH para 3p y 14q se asocian a la pérdida de 11q en tumores localizados con *MYCN* no amplificado (Spitz et al., 2003). La pérdida de 9p se encuentra en una baja frecuencia en tumores detectados clínicamente e incluye los supresores de tumores *CDKN2A* y *CDKN2B*, sin embargo, no se han encontrado alteraciones como mutaciones puntuales, delecciones, u otras

alteraciones que supongan la pérdida total de la función de ambos genes (Takita et al., 1997; Iolascon et al., 1998).

Los estudios actuales realizados mediante hibridación genómica comparada sobre array (Array-CGH) han permitido la detección de todas estas alteraciones y el rastreo de alteraciones genómicas globales de forma simultánea, sin embargo, en estos momentos es necesario un gran esfuerzo global para la integración de toda esta información y el posible valor clínico, lo que posibilitará una mejor estratificación de los pacientes en subgrupos de riesgo.

2.4.8.- Neuroblastoma familiar

El NB se considera generalmente un tumor esporádico, pero en un 1-2% de casos se puede observar una agregación familiar de la enfermedad (Shojaei-Brosseau et al., 2004). En la mayor parte de los casos (90%), dicha agrupación familiar se atribuye a mutaciones germinales en *PHOX2B* (Mosse et al., 2004, Trochet et al., 2004) o en *ALK* (Chen et al., 2008; Janoueix-Lerosey et al., 2008; Mosse et al., 2008). En pacientes con NB familiar o esporádico junto con otras neurocristopatías (enfermedades originadas de alteraciones en la cresta neural) como la Enfermedad de Hirschsprung y la hipoventilación central congénita, se han descrito mutaciones en *PHOX2B*. Las mutaciones en *ALK* están presentes en un 5-15% de neuroblastomas esporádicos (George et al., 2008; Mosse et al., 2008), siendo así el gen descrito con un mayor porcentaje de mutaciones de predisposición conocido (Pugh et al., 2013). Actualmente, se recomienda el estudio genético tanto de *ALK* como de *PHOX2B* en pacientes con antecedentes familiares de neuroblastoma u otras neurocristopatías con el fin de detectar posibles familiares portadores asintomáticos y así realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad (Deyell y Attiyeh, 2011).

Estudios recientes de secuenciación genómica, han permitido describir mutaciones somáticas en tumores esporádicos y mutaciones germinales en casos familiares en diferentes genes que podrían predisponer el desarrollo del neuroblastoma (Pugh et al., 2013). Los genes alterados en los casos esporádicos resultaron ser *ALK*, *PTPN11*, *ATRX*, *ORST1*, *PDE6G*, *MYCN* y *NRAS*. En casos familiares se encontraron posibles mutaciones candidatas en los genes *ALK*, *CHEK2*, *PINK1*, *PARD1*, *TP53* y *PALB2*. Futuros estudios genómicos permitirán avanzar en este tipo de estudios de reciente inicio y poder concluir el posible valor de estos cambios en la predisposición, desarrollo, respuesta al tratamiento, respuesta a fármacos o pronóstico de la enfermedad

2.5.- Mecanismos de invasión y metástasis en neuroblastoma

En los últimos 100 años, multitud de investigadores han estudiado el proceso de metástasis. En 1889 Stephen Paget propuso la teoría de la semilla y el suelo (*seed and soil*), esta teoría sugiere que la metástasis depende de la estrecha relación entre algunas células tumorales (*the seed*) y el microentorno del órgano específico (*the soil*). Según esta teoría, la metástasis sólo se desarrolla cuando el suelo y la semilla son compatibles (Fidler., 2003). Con el descubrimiento de los genes específicos responsables de las metástasis y factores específicos de crecimiento y quemoquinas que se expresan en los órganos colonizados por las células tumorales, se está demostrando que esta teoría es básicamente correcta.

La metástasis es un proceso altamente complejo y organizado que consiste en múltiples etapas interrelacionadas, durante las cuales, las células tumorales abandonan el tumor primario, acceden al sistema circulatorio, son transportadas a sitios distantes, eventualmente salen de la circulación y crecen en un microentorno diferente. La primera etapa de la metástasis es la invasión local, esta etapa requiere que las células malignas pierdan las adhesiones célula-célula y se conviertan en móviles, este proceso permite la invasión de los tejidos circundantes. Durante la segunda etapa, la intravasación, las células tumorales penetran en el endotelio sanguíneo o linfático y entran en la circulación vascular o linfática. Una pequeña cantidad de células circulantes son capaces de sobrevivir y forman agregados de células tumorales o émbolos junto a leucocitos circulantes y plaquetas y se detienen en sitios alejados del tumor primario. Cuando se detienen, algunas células son capaces de extravasarse y colonizar el sitio metastático. Bajo la influencia de un complejo número de factores del entorno, las células tumorales pueden sufrir cambios genéticos y epigenéticos adicionales que les puede permitir proliferar y generar la respuesta angiogénica necesaria para la formación de una masa metastática grande (Ara et al., 2006).

Como ya hemos mencionado, alrededor de un 50% de los pacientes con neuroblastoma han desarrollado lesiones malignas fuera del tumor primario en el momento del diagnóstico. Las metástasis en neuroblastoma tienen lugar en un 70% de los casos en la médula ósea y en un 56% en hueso, y con frecuencia en ambos (Dubuois et al., 1999).

Los mecanismos que permiten la invasión de la médula ósea y el hueso han sido dilucidados en la última década. Los determinantes genéticos indicadores de la aparición de metástasis en neuroblastoma son las alteraciones cromosómicas. Las ganancias cromosómicas se asocian generalmente con estadios bajos y regresión espontánea, por el contrario las pérdidas cromosómicas suelen reflejar tendencias metastáticas. Como ya hemos explicado anteriormente, las pérdidas en 1p, 3p y 11q, la ganancia desequilibrada en 17q y la amplificación de MYCN indican generalmente comportamiento metastático (Morowitz et al., 2003; McArdle et al.,

2004). En el caso de *MYCN* y *TrkB* contribuyen ambos al fenotipo metastático controlando la expresión de múltiples proteínas que promueven la migración celular, la proliferación y la supervivencia de las células tumorales en sitios remotos del tumor primario (Hecht et al., 2005; Ara et al., 2006).

2.5.1.- Invasión de la circulación

Los diferentes mecanismos de invasión de la circulación, colonización de órganos específicos como la médula ósea y la invasión de la misma son altamente complejos. En estos mecanismos influyen diferentes factores como los cambios epigenéticos en las células, cambios en la expresión de integrinas, alteración de los mecanismos de adhesión célula-célula, expresión de proteasas, etc (Figura 10). Entre los cambios epigenéticos están los que ocurren en la metilación de *p16* (Macaluso et al., 2003; Guo et al., 2004), que es un inhibidor del ciclo celular que ejerce un control en los estadios tempranos de la tumorigénesis. La ruta pRB/p16/Ciclina D1 juega un papel importante en la progresión del ciclo celular. Alteraciones en alguno de los componentes de esta ruta provocados por cambios genéticos como deleciones, mutaciones puntuales o alteraciones epigenéticas así como la inhibición de *p16* por hipermetilación, tiene como resultado la progresión tumoral promoviendo la transición de G1 a la fase S en el ciclo celular, fenómeno que se observa frecuentemente en neoplasias humanas.

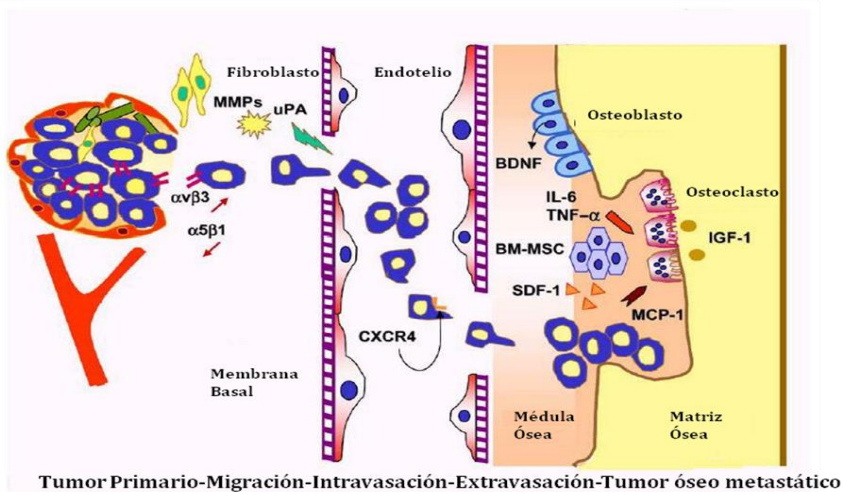


Figura 10: Proceso de metástasis ósea en neuroblastoma (modificado de Ara et al., 2006).

2.5.2.- Invasión de la médula ósea

La colonización metastática de órganos específicos está influenciada por interacciones entre las células circulantes tumorales y las células del órgano diana. Entre los factores implicados en estas interacciones están las quemoquinas.

El factor derivado del estroma 1 (*SDF-1*)/*CXCL12* se expresa de manera abundante en las células del estroma de la médula ósea y por los osteoclastos promoviendo las metástasis óseas en el cáncer de próstata (*Taichman et al., 2002*). Las células de neuroblastoma expresan el receptor de la quemoquina *CXCR4* para el *SDF-1* y de esta manera responden siendo atraídas a los sitios ricos en *SDF-1*. La expresión de *CXCR4* en tumores primarios de neuroblastoma se correlaciona con la presencia de metástasis en hueso y médula ósea (*Russel et al., 2004*). Los diferentes datos sobre este tema sugieren que el eje *CXCR4/SDF-1* juega un importante papel no sólo en el alojamiento de las células de neuroblastoma en la médula ósea sino que también las dota con una ventaja selectiva para la colonización, proliferación y supervivencia en el micro ambiente de este tejido.

2.5.3.- Invasión del hueso

El hueso es un tejido compuesto por colágeno tipo 1 y minerales en forma de hidroxapatita resistente a la destrucción. En condiciones fisiológicas normales, particularmente en niños, es uno de los tejidos más activos y está sometido a constante remodelación. Bajo condiciones patológicas como la metástasis ósea, el hueso sufre una remodelación produciéndose cambios en el balance entre la formación de osteoblastos en el hueso y la degradación de osteoclastos (*Kozlow et al., 2005*).

Entre los mecanismos implicados en la activación de los osteoclastos en neuroblastoma está la producción del receptor de activación del ligando *NFkB* (*RANKL*) (Figura 11). Algunas células de neuroblastoma producen altos niveles de *RANKL* y bajos niveles de osteoprotegerina (*OPG*). Utilizando anticuerpos contra *RANKL* u oligonucleótidos antisentido, se ha visto que la activación de los osteoclastos por estas células de neuroblastoma se pueden bloquear con *OPG* (*Granchi et al., 2004*).

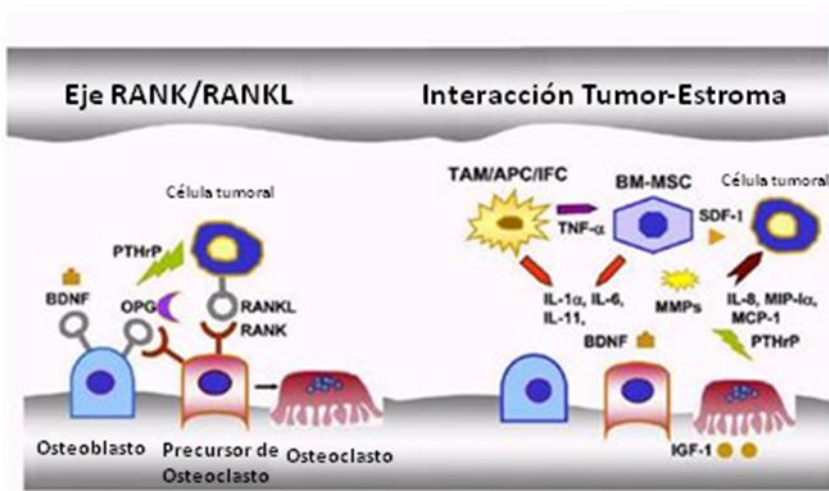


Figura 11: Mecanismos de invasión del hueso en neuroblastoma (modificado de Ara et al., 2006). *Izquierda:* Las células de neuroblastoma expresan RANKL estimulando directamente a los osteoclastos. La producción del péptido hormona-relacionado paratiroideo (PTHrP) que es estimulado por BDNF producido por osteoblastos, potencia la expresión de RANKL en los osteoblastos, que tiene como resultado la activación y maduración de osteoclastos. *Derecha:* En ausencia de expresión de RANKL, las células de neuroblastoma pueden interactuar con las células madre mesenquimales de la médula ósea (BM-MSc) o con los macrófagos asociados a tumor (TAM) que secreta SDF-1, MMPs y factores activadores de osteoclastos (OAFs) como IL-6, IL-8 y factores inhibidores de la migración de macrófagos (MIP-1β).

2.6.- Enfermedad mínima residual

2.6.1.- Introducción

En el momento del diagnóstico aproximadamente un 50% de los pacientes con neuroblastoma debutan con metástasis siendo las más frecuentes las de la médula ósea (MO) (Moss et al., 1991; DuBois et al., 1999). En el caso de los pacientes de alto riesgo, tienen un pronóstico clínico adverso y necesitan de terapias multimodales intensivas incluyendo trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas (Hartmann et al., 1999; Cotterill et al., 2000). De acuerdo con las recomendaciones del INSS, el estudio de la médula ósea mediante citomorfología convencional es el método aceptado para la detección de células tumorales de neuroblastoma diseminadas (Brodeur et al., 1988; Brodeur et al., 1993). Desde hace unos años se ha estado trabajando en el desarrollo de nuevas aproximaciones más sensibles y específicas para garantizar el

correcto estadiaje y asesoramiento del riesgo al diagnóstico. Estos métodos se pueden aplicar también para la monitorización de la terapia durante el tratamiento y la detección de las recaídas antes de que las metástasis sean evidentes, pudiendo así intervenir de manera más temprana. Además, el estudio de los productos de leucaféresis para trasplante, podría ser crucial para evitar la reinfusión de células madre contaminadas con células tumorales que pueden iniciar una recaída (*Brenner et al., 1993; Deisseroth et al., 1994; Rill et al., 1994, Chambon et al., 2013*). Sin embargo la aplicación clínica de los mismos debe estar precedida por un proceso de estandarización y validación en grandes series de pacientes y estudios multicéntricos (*Beiske et al., 2005*).

Entre las técnicas disponibles actualmente para la detección de células tumorales circulantes, las más utilizadas son la inmunocitología, la RT-PCR y la citometría de flujo. Estas técnicas difieren en algunos aspectos como las dianas utilizadas (células individuales o transcritos de RNA); los parámetros que se miden (número de células tumorales, expresión de antígenos, citomorfología, alteraciones citogenéticas y nivel o número de transcritos de RNA); especificidad (utilizando un solo parámetro o varios para el análisis); y sensibilidad (número de células analizadas) (*Beiske et al., 2005*). Las ventajas e inconvenientes de estos métodos serán expuestos a lo largo de la tesis.

2.6.2.- Métodos citomorfológicos

Desde hace más de 30 años el estudio morfológico de aspirados de médula ósea (*Head et al., 1979*) y de cilindros óseos (*Bostrom et al., 1985*) ha sido la metodología aceptada para la detección de EMR. Ambos métodos se basan en la identificación de agrupamientos o rosetas de células tumorales (*Mills et al., 1986*) o cambios en el estroma (*Reid et al., 1988*). Aunque la mayoría de los estudios comparativos atribuyen una mayor sensibilidad a las biopsias óseas, en particular cuando son tomadas tras quimioterapia, la representatividad de las mismas es inferior (*Brisigotti et al., 1998*), ya que una gran proporción de muestras son inadecuadas especialmente en niños muy pequeños. Este fenómeno se debe a la dificultad de la extracción de la muestra atribuida a las características del tejido óseo en edades tan tempranas (*Reid et al., 1997*). Uno de los problemas de este método es su escasa sensibilidad ya que sólo es capaz de detectar células tumorales si su presencia es como mínimo del 1% del total de células estudiadas (*Cheung et al., 1997-A, Mehes et al., 2003*).

2.6.3.- Inmunocitología

La inmunocitología es una técnica que aprovecha las propiedades de los anticuerpos monoclonales de unirse a determinada estirpe celular que tiene una elevada expresión de ciertos antígenos. Los anticuerpos unidos se

pueden detectar mediante microscopía óptica o de fluorescencia y además estas técnicas permiten la evaluación morfológica y la cuantificación hasta el nivel de células aisladas. Un aspecto a tener en cuenta es que no todas las células inmunopositivas tienen porqué ser tumorales, por ello se pueden combinar este tipo de estudios con otras técnicas para verificar la naturaleza neoplásica de las células inmunoteñidas.

2.6.3.1.- Antígenos

Tras la introducción de la técnica del hibridoma en 1978, los anticuerpos monoclonales anti cerebro fetal y anti líneas celulares de neuroblastoma fueron en aumento (*Kennett et al., 1979; Reynolds et al., 1982; Kemshead et al., 1983; Schulz et al., 1984*) y se fue demostrando su eficacia para el reconocimiento de células de neuroblastoma y caracterizando dichos antígenos. Además, se establecieron anticuerpos mono y policlonales como marcadores neuronales (enolasa específica de neuronas (*Dhillon et al., 1982*), sinaptofisina (*Gould et al., 1987*), cromafina A (*Helman et al., 1988*)) que se unen a las células del tumor primario y metastáticas. Sin embargo, respecto a la fiabilidad para la detección de la EMR en médula ósea, algunos de estos marcadores muestran una o más restricciones. Por ejemplo, marcajes heterogéneos en células tumorales en pacientes individuales, reactividad cruzada con células hematopoyéticas normales (*Sugimoto et al., 1988*) y expresión diferencial en tumor primario *versus* células metastáticas o células tumorales indiferenciadas *versus* células diferenciadas (*Nowicki et al., 2002*). Para controlar la reacción cruzada con las células hematopoyéticas se han propuesto diferentes estrategias como la cohibridación con anti-HLA-DR (*Evans et al., 1985*), anti-CD10 (*Sugimoto et al., 1988*) o anti-CD45 (*Combaret et al., 1989*). Para salvar la expresión heterogénea de marcadores individuales inter e intra tumorales, algunos investigadores realizaron marcajes simultáneos con cócteles de anticuerpos con diferentes especificidades (*Moss et al., 1991; Seeger et al., 2000*).

De todos los marcadores descritos hasta ahora, dos son los que mayor sensibilidad y/o especificidad han mostrado en la detección de EMR en neuroblastoma. Por una parte, el anticuerpo monoclonal UJ13A descrito por Rogers y colaboradores que mostró mayor sensibilidad y especificidad que otros especímenes aislados por ellos mismos (*Rogers et al., 1989*) y que además ha sido utilizado por otros grupos (*Favrot et al., 1986; Combaret et al., 1989*). Este anticuerpo reconoce la molécula de adhesión neuronal CD56 (N-CAM) (*Goldman et al., 1984; Patel et al., 1989*) que se expresa con niveles altos en prácticamente todos los neuroblastomas. En contraste a su alta sensibilidad, su especificidad es limitada, ya que CD56 se expresa también en osteoblastos, y en bajos niveles en células natural killer, algunas clases de células plasmáticas y en macrófagos (*Combaret et al., 1989; Nagai et al., 1994*). El otro marcador es el digangliósido GD2; en este caso se trata de un glicoesfingolípido de membrana que se detecta en la mayoría de los

neuroblastomas (Shochat *et al.*, 1977; Schulz *et al.*, 1984; Cheung *et al.*, 1985). Los neuroblastomas indiferenciados resultan ser fuertemente positivos, pero a medida que se van diferenciando van perdiendo gradualmente el antígeno. GD2 se expresa también en melanomas, gliomas y focalmente en rhabdomyosarcomas y osteosarcomas (Sariola *et al.*, 1991). Se ha descrito que los anticuerpos específicos GD2 no se unen a células hematopoyéticas normales (Cheung *et al.*, 1985), por tanto es apropiado para los estudios de EMR en neuroblastoma. Este antígeno además de regularse perdiéndose durante la diferenciación neuroblástica, se recambia continuamente en la superficie de los neuroblastos (Ladisch *et al.*, 1987). Los macrófagos de la médula ósea pueden ingerir el antígeno soluble que está presente en plasma de los pacientes o se pueden adherir inespecíficamente a las superficies de células hematopoyéticas, esto contribuye a tener falsos positivos en la inmunotinción (Figura 12).

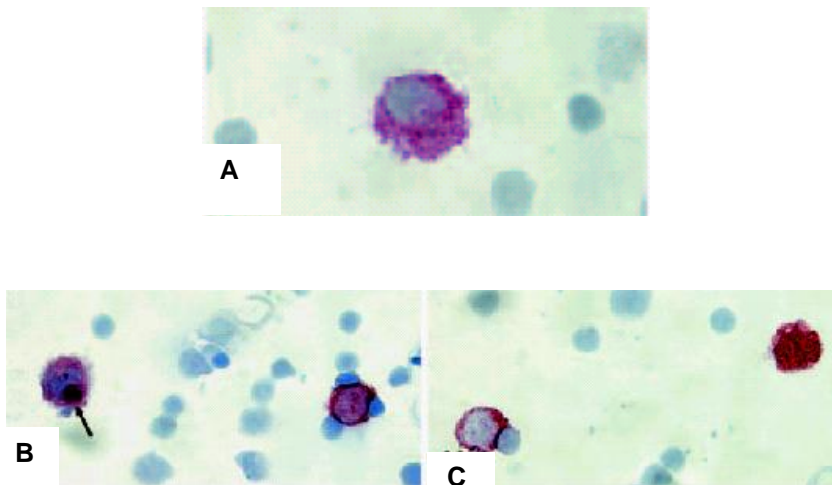


Figura 12: Ejemplos de falsos positivos observables con la tinción inmunocitológica con el anticuerpo GD2. A: La célula de la imagen no cumple los criterios de célula neuroblástica, ni el ratio núcleo/citoplasma ni la estructura vesicular del citoplasma son los adecuados. La célula tiene estructura citológica de histiocito. B: La célula de la izquierda tiene el mismo tamaño y muestra la misma intensidad de tinción inmunocitológica que la de la derecha, sin embargo la forma y el ratio núcleo/citoplasma del núcleo no es el adecuado. La célula contiene material GD2 positivo en el citoplasma, esta imagen es típica de los macrófagos. C: La célula de la derecha muestra una fuerte tinción GD2 sobre el núcleo, sin embargo al no poder valorar la morfología del mismo no se podría considerar una célula positiva. La célula de la izquierda sí que cumpliría con los criterios de célula neuroblástica de neuroblasoma (modificado de Swerts *et al.*, 2005).

En algunos estudios se han utilizado anticuerpos asociados a antígenos de neuroblastoma en cortes de biopsias para detectar células tumorales mediante inmunohistología. Algunos de ellos muestran un aumento de la sensibilidad comparado con la histomorfología convencional (*Oppedal et al., 1989; Cray et al., 1992*), pero la inmunohistología nunca ha conseguido ganar terreno frente a la inmunocitología, que es la técnica anatomopatológica mayormente aceptada para la detección de EMR. Existen tres razones por las cuales han prevalecido los estudios inmunocitológicos de aspirados de médula ósea:

A.- La molécula GD2 se detecta de manera mucho más fácil en células no fijadas o fijadas con etanoles o paraformaldehído que en células tumorales incluidas en parafina.

B.- Las biopsias aunque son más sensibles, son menos representativas que los aspirados y la técnica es inadecuada en niños muy pequeños (*Reid et al., 1988*).

C.- Cuando el número de células tumorales es bajo su conteo es más preciso en aspirados de médula ósea. La valoración de los detalles morfológicos como el núcleo, el citoplasma y la localización de la tinción inmunocitológica también es mucho más sencilla que en las secciones tisulares (*Beiske et al., 2005*).

2.6.3.2.- Métodos de detección Inmunocitológicos

Los métodos utilizados en la detección inmunocitológica son la microscopía óptica convencional y la microscopía de fluorescencia (*Favrot et al., 1986; Beck et al., 1988*). Ambos métodos presentan ventajas y desventajas; la microscopía óptica convencional normalmente implica reacciones enzima/substrato en las que está implicada la actividad fosfatasa alcalina. Este método es óptimo para la determinación de los criterios citomorfológicos celulares claves para la consideración de la célula como tumoral. Además la tinción enzimática es estable en el tiempo lo que facilita la revisión de las preparaciones por grupos especializados de científicos en microscopios ópticos multicabezal, elemento esencial para la estandarización metodológica en estudios multicéntricos. Por el contrario, las técnicas basadas en reacciones enzimáticas no son útiles para la detección simultánea de un segundo antígeno en la misma localización subcelular, porque los complejos moleculares del enzima, substrato y cromógeno cubren un número indeterminado de epítomos que impedirían la correcta detección de un segundo antígeno. La combinación con anticuerpos marcados con fluorescencia tampoco está recomendada ya que existe una fuerte reacción de autofluorescencia de la mayoría de los fluorocromos utilizados en las reacciones fosfatasa alcalina/substrato (*Beiske et al., 2005*).

La detección basada en métodos fluorescentes presenta algunas ventajas frente a los métodos basados en detecciones enzimáticas de los anticuerpos unidos al antígeno que se quiere detectar. Los fluorocromos son moléculas pequeñas que no necesitan de reacciones químicas para su visualización. Esta metodología por lo tanto es ideal para la detección de más de un antígeno simultáneamente o la detección de antígenos, genes o cromosomas en células aisladas (Figura 13). Sin embargo, no todas las características morfológicas celulares se pueden identificar mediante esta técnica utilizando la contratinción nuclear con DAPI. Los resultados se registran en forma de imágenes digitales lo que impide tener información por ejemplo del tamaño celular y tampoco se pueden revisar simultáneamente por varios investigadores en un microscopio multicabezal.

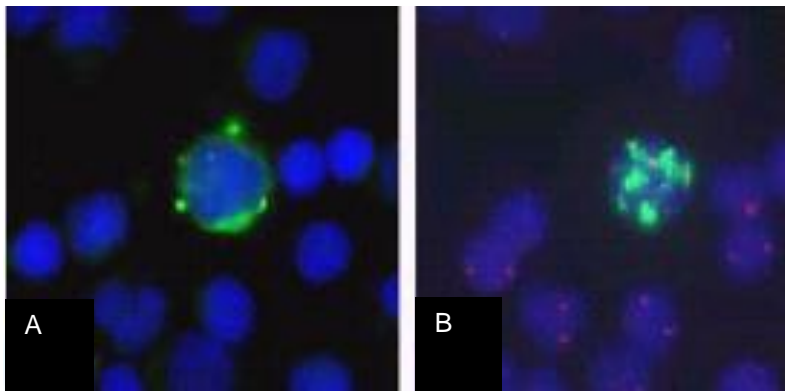


Figura 13: Análisis inmunocitológico/citogenético combinado (GD2/MYCN). La muestra se tiñó con un anticuerpo anti-GD2 marcado con fluoresceína (A) y posteriormente con una sonda de *MYCN* marcada con fluoresceína y una sonda de referencia del cromosoma 2 marcada con rodamina (B). El análisis de las imágenes demuestra una tinción moderada y discontinua de GD2 (A) y la amplificación de *MYCN* (B) (modificado de Swerts *et al.*, 2005).

Mehes y colaboradores desarrollaron una técnica automatizada para la detección inmunocitológica fluorescente del antígeno GD2 combinada con el FISH para detectar la amplificación de *MYCN* o ganancias en 1p, 2q o 17q (Mehes *et al.*, 2001-A). Aplicando dicha técnica estudiaron aspirados de médula ósea en neuroblastomas de todos los estadios para averiguar el origen de las células GD2 positivas en la médula ósea. Aplicando estos ensayos a pacientes con estadio clínico 1, 2A, 2B o 3 fueron capaces de detectar células GD2 positivas en un rango incluso menor de 10^{-6} , dichas células no presentaban alteraciones citogenéticas vistas en el tumor, sin embargo no se observó lo mismo en los estadios 4 y 4S. Con ello se concluyó que la gran mayoría de las células GD2 positivas en pacientes con estadios bajos no representan células de neuroblastoma (Mehes *et al.*, 2001-B).

2.6.3.3.- Significado clínico

Varios estudios han intentado correlacionar el número de células tumorales detectadas mediante las técnicas inmunocitológicas, inmunocitológicas/FISH con la evolución de los pacientes. Moss y colaboradores observaron diferencias estadísticamente significativas en la progresión libre de enfermedad en estadios 2 y 3 mayores de 1 año donde se detectaron más de 5 células tumorales por cada 10^5 células normales (Moss *et al.*, 1991). En los pacientes con estadio 4 menores de 1 año el punto de corte fué de 20 células por 10^5 . Seeger y colaboradores realizaron un estudio donde incorporaron un total de 466 pacientes con enfermedad metastática. Centrándose en el cálculo de la supervivencia libre de enfermedad a los 3 años, concluyeron que el valor umbral de 100 células tumorales por cada 10^5 células normales, era un valor predictivo estadísticamente significativo en aspirados analizados antes de la terapia, después de 12 semanas del inicio del tratamiento, en la recogida de células de la médula ósea para el trasplante y al final de la quimioterapia de inducción, pero no después de 4 semanas de tratamiento. Sólo en el momento de la recogida de la médula ósea para el trasplante, un número menor de células (20 por 10^5) resultó tener un valor pronóstico también adverso (Seeger *et al.*, 2000). En contraste con el estudio publicado por Moss y colaboradores el número de células tumorales en médula ósea en pacientes con estadio 3 no mostró ninguna influencia en el pronóstico de estos pacientes.

En relación con los estudios realizados en sangre periférica, Seeger y colaboradores confirmaron los resultados de estudios previos indicando que el hallazgo de un número bajo de células tumorales circulantes era comparable a lo que ocurría en la médula ósea. La presencia de más de una célula tumoral por cada 10^5 células normales, anunciaba la reducción de la supervivencia libre de enfermedad sólo en el momento del diagnóstico, pero no en el momento de la recolección de células de médula ósea para el trasplante (Moss *et al.*, 1990-A; Faulkner *et al.*, 1998; Seeger *et al.*, 2000).

En un estudio posterior, Modritz y colaboradores aplicando la técnica combinada de Inmunocitología/FISH nombrada anteriormente, se propusieron demostrar el valor pronóstico del aclaramiento de la médula ósea en pacientes con estadio 4, utilizando la sensibilidad de 1 célula por millón. Considerando la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años, observaron diferencias significativas entre pacientes que mostraron aclaramiento de la médula ósea tras 4 ciclos de inducción frente a los que no mostraron dicho aclaramiento. Sin embargo el valor predictivo del rápido aclaramiento de la médula ósea era válido solamente en pacientes con amplificación de *MYCN* y/o delección de 1p (Modritz *et al.*, 2004).

2.6.4.- RT-PCR

Los métodos moleculares aplicados a la detección de células tumorales circulantes se basan en el estudio de expresión de ciertos genes mediante la técnica de la retrotranscripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los genes utilizados para este tipo de estudios deben cumplir al menos estas tres condiciones:

1.- Se deben expresar en la mayoría de los tumores. Actualmente los marcadores mayormente utilizados se expresan al menos en el 95% de los mismos.

2.- El nivel de expresión génica debe ser elevado para facilitar su detección. Niveles de expresión bajos condicionarían el alcanzar el rango máximo de detección de la técnica que puede llegar a detectar 1 célula tumoral entre un millón de células normales.

3.- La expresión debe ser específica de las células tumorales, por lo tanto no debe expresarse en los tejidos normales donde debamos diagnosticar la EMR. En nuestro caso los marcadores no pueden expresarse en las células de la sangre periférica ni en las de la médula ósea.

Además para el aumento de la sensibilidad y la especificidad de la técnica, así como para salvar el escollo de la heterogeneidad tumoral, se han propuesto alternativas como son el estudio de la expresión de varios marcadores simultáneamente.

En la mayoría de tumores sólidos, incluido el neuroblastoma, las dianas específicas para la detección de células tumorales no están bien definidas, de hecho, en los últimos años se han propuesto diferentes combinaciones de dianas de estudio, incluso diferentes en MO y sangre periférica (SP) sin llegar a ningún consenso (*Stutterheim et al., 2008; Stutterheim et al., 2009; Hartomo et al., 2013; Viprey et al., 2014; Cheung et al., 2015*). Este tipo de aproximaciones requieren, la identificación de las dianas de ARN mensajero (mRNA) que se expresan en el tumor pero no en los tejidos de estudio. Utilizando esta metodología, se ha detectado enfermedad con significado clínico en muestras de SP (*Burchill et al., 1995; Kuroda et al., 1997; Shono et al., 2000; Burchill et al., 2001-A; Cheung et al., 2004; Viprey et al., 2014*) y de MO (*Miyajima et al., 1996; Kuroda et al., 1997; Cheung et al., 2000; Seeger et al., 2000; Shono et al., 2000; Cheung et al., 2001-A; Fukuda et al., 2001; Horibe et al., 2001; Viprey et al., 2014; Cheung et al., 2015*) en pacientes con neuroblastoma al diagnóstico, durante la terapia, al final del tratamiento y en las recaídas. Algunos de estos autores describen que la persistencia en la expresión de las dianas de mRNA en médula ósea o sangre periférica en pacientes con estadio 4 a pesar de la quimioterapia intensiva, predicen la recaída (*Burchill et al., 2001-A; Fukuda et al., 2001*) y sugieren el uso de nuevas estrategias terapéuticas en los mismos.

2.6.4.1.- Dianas de estudio

Se han descrito multitud de dianas para la detección de EMR en neuroblastoma mediante RT-PCR. Algunos de estos marcadores han mostrado algunas restricciones, por ejemplo la expresión en tejido normal (sangre periférica y médula ósea) o expresión sólo en un pequeño porcentaje de tumores. En este apartado haremos un pequeño resumen de algunos de ellos.

Aproximadamente un 95-98% de los tumores de neuroblastoma expresan catecolaminas, en consecuencia el primer enzima de la síntesis de las mismas, la *tirosina hidroxilasa (TH)*, ha sido una de las dianas más explotadas en el estudio de EMR en este tumor (*Burchill et al., 1994; Miyajima et al., 1995; Miyajima et al., 1996; Kuroda et al., 1997; Trager et al., 2003; Burchill., 2004; Stutterheim et al., 2008; Stutterheim et al., 2009; Viprey et al., 2014*). Una posible restricción descrita para la utilización de este marcador es la existencia de una regulación *feedback* para la utilización de este marcador es la existencia de una regulación *feedback* en la síntesis de las mismas, que se da entre la expresión de *TH* y el transportador de la noradrenalina. Así la expresión de *TH* está correlacionada inversamente con el transportador de noradrenalina en neuroblastomas humanos (*Lode et al., 1995*). El MIBG entra en las células tumorales vía el transportador de la noradrenalina y la mayoría de los neuroblastomas tienen una fuerte captación de MIBG, por lo tanto en los casos donde se administra MIBG, la expresión de *TH* podría estar regulada, disminuyendo su expresión en algunas células y no ser detectable por RT-PCR. Sin embargo este marcador sigue siendo uno de los mayoritariamente utilizados en este tipo de estudios.

La expresión de un segundo grupo de genes que también se ha utilizado en la detección de células diseminadas son las familias génicas de antígenos específicos de testículo. Estos antígenos se expresan en tumores humanos con diferentes tipos histológicos, sin embargo no se expresan en tejidos normales excepto testículo y placenta (*De Plaen et al., 1999*). Diversos grupos han demostrado la expresión de los genes de la familia *MAGE* (melanoma antigen encoding genes A) en neuroblastoma (*Matsumura et al., 1994; Chen et al., 1996; Corrias et al., 1996; Ishida et al., 1996*). La otra familia génica es la familia *GAGE* expresado por un gran número de tumores, siendo un marcador sensible para la detección de células de neuroblastoma en sangre periférica y médula ósea (*Cheung et al., 1997-B*).

Diversos miembros de la familia *MAGE* han sido utilizados como marcadores de EMR (*MAGE-A1* a *MAGE-A6*), sin embargo los más utilizados han sido el *MAGE-A1* y el *MAGE-A3*. Estos antígenos se expresan específicamente en células germinales masculinas durante la espermatogénesis, pero también han mostrado expresión ectópica en varios tipos de tumores como melanoma (*van der Bruggen et al., 1994; van den Eynde et al., 1995; Daherba et al., 1998*), carcinoma de pulmón (*Weynants et al., 1994*),

carcinoma de mama (Russo et al., 1995), carcinomas de cabeza y cuello (Eura et al., 1995), carcinoma de esófago (Quillien et al., 1997), carcinoma hepatocelular (Yamashita et al., 1996), carcinoma de vejiga (Patard et al., 1995) y carcinoma gástrico (Li et al., 1996).

La familia *MAGE-A* está formada por 12 miembros (*MAGE-A1* a *MAGE-A12*) localizados en el cromosoma X (Xq28). La localización subcelular de las proteínas *MAGE-A* es diversa, *MAGE-A1* y *MAGE-A3* se localizan en el citosol en las células de melanoma, sin embargo *MAGE-A1* también se ha detectado en el núcleo y el citoplasma en espermatogonias (Schultz-Thater et al., 1994). Los miembros *MAGE-A10* y *MAGE-A11* se han detectado sobre todo en el núcleo de las células tumorales (Jurk et al., 1998; Rimoldi et al., 1999).

El gen *MAGE-A1* codifica un antígeno humano reconocido por los linfocitos T citolíticos (células T natural killer) (Rogner et al 1995). La expresión de *MAGE-A1* en tumores de neuroblastoma ha sido estudiada por diversos grupos llegando a determinar que se expresa en un 44-66% de las muestras tumorales. Esta expresión se correlaciona con la ausencia de amplificación de *MYCN* y con niveles normales de ferritina sérica (Soling et al., 1999; Wolff et al., 2005). Aunque *MAGE-A1* se ha propuesto como marcador para la detección de EMR en neuroblastoma, el que no exista una relación entre su expresión con el estadio del tumor y que no se exprese de manera estable a lo largo de la progresión tumoral hace que su utilidad sea realmente limitada (Cheung et al., 2001-B).

La familia génica *GAGE* tiene grandes similitudes con los miembros de la familia *MAGE*. Los genes de la familia *GAGE* se sitúan en el cromosoma X, específicamente en Xp11.2-p11.4 y consta de un total de 8 miembros (*GAGE-1* a *GAGE-8*) (De Backer et al., 1999). Al igual que los genes *MAGE*, los genes de la familia *GAGE* se expresan de forma específica en tejido testicular normal y en varios tipos de tumores con orígenes histológicos diversos (Cheung et al., 1998). También codifican antígenos humanos reconocidos por los linfocitos T citolíticos (células T natural killer). Su expresión en tumores de neuroblastoma es ligeramente superior que en la familia *MAGE* llegando a ser de un 80%. En este caso la utilidad como marcador de EMR en neuroblastoma también tiene una serie de limitaciones, por una parte aunque su expresión en tumores es mayor que en el caso de los genes *MAGE*, sigue siendo insuficiente ya que en un 20% de los casos no resultaría útil. Por otra parte la especificidad del mismo también se ha puesto en duda ya que se ha descrito su expresión en muestras control de sangre periférica (Cheung et al., 1998).

Otro marcador ampliamente estudiado es la *GD2* sintasa (β -1,4-N-acetilgalactosaminil-transferasa, *GD2/GM2* sintasa), este enzima cataliza la transferencia de la β -1,4-N-acetilgalactosamina al precursor de los gangliósidos *GD3/GM3* respectivamente (Furukawa et al., 1996). Dicho mRNA codifica para una glicosiltransferasa clave para la síntesis del gangliósido

GD2, ampliamente utilizado para la detección de EMR en neuroblastoma mediante inmunocitología (Hoon *et al.*, 2001). El enzima GD2 sintasa se expresa de forma homogénea en tumores de neuroblastoma de todos los estadios. La densidad de GD2 en células de neuroblastoma es realmente alta, aproximadamente de $5-10 \times 10^6$ moléculas por célula (Wu *et al.*, 1986) y se pierde raramente después de terapias con anticuerpos anti-GD2 (Kramer *et al.*, 1998). Como en muchos otros marcadores, GD2 también está presente en otras neoplasias como el osteosarcoma (Heiner *et al.*, 1987), los sarcomas de partes blandas (Chang *et al.*, 1992), meduloblastoma y astrocitomas de alto grado (Longee *et al.*, 1991; Shinoura *et al.*, 1992), retinoblastoma (Saarinen *et al.*, 1991), melanoma (Cheresh *et al.*, 1985) y tumores microcíticos de pulmón (Grant *et al.*, 1996). Su alta tasa de expresión junto con la posibilidad de comparar los resultados frente a la detección de GD2 por inmunocitología ha hecho que numerosos grupos hayan estudiado su validez para el estudio de EMR.

Se han descrito otros muchos marcadores para la detección de EMR en neuroblastoma, pero la mayoría de ellos han sido utilizados por un sólo grupo de investigación o unos pocos. Entre estos marcadores podemos encontrar el *PGP 9.5 (Protein Gene Product 9.5)* (Wang *et al.*, 2000), *ELAVL4 (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila-like4)* (Swerts *et al.*, 2006), *STX (sialyltransferase, ST8SialI)* (Cheung *et al.*, 2006), *ppGalNAc-T 13 (UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine-polypeptide N-acetyl-galactosaminyltransferase 13)* (Berois *et al.*, 2006), *Cromogranina A* (Pagani *et al.*, 2002), *CCND1 (Ciclina D1)* (Cheung *et al.*, 2007) y *DDC (dopamina decarboxilasa)* (Bozzi *et al.*, 2004). Aunque alguno de ellos podría llegar a tener importancia en el manejo clínico de los pacientes, harán falta estudios multicéntricos donde intervengan un gran número de pacientes para demostrar su eficacia clínica en la detección de células tumorales de neuroblastoma.

2.6.4.2.- Métodos de detección

Los métodos moleculares basados en el estudio del RNA mensajero para detección de EMR en las diferentes neoplasias han ido evolucionando a lo largo del tiempo, permitiendo así el aumento de sensibilidad, especificidad y automatización de los estudios. Además con la introducción de la tecnología de la RT-PCR cuantitativa fluorescente en tiempo real (QF-PCR) ha sido posible la cuantificación absoluta o relativa de las moléculas de mRNA diana.

Los diferentes métodos descritos presentan ventajas e inconvenientes. Los experimentos basados en la reamplificación de productos de PCR (PCR anidada y semianidada) presentan grandes problemas de falsos positivos debido a la alta tasa de contaminación de los segundos ciclos de amplificado. Los métodos basados en la amplificación y posterior hibridación de los productos de PCR obtenidos (Southern Blot), presentan una buena sensibilidad y fiabilidad pero metodológicamente son caros, largos y

laboriosos. La opción más utilizada actualmente es la RT-PCR cuantitativa en tiempo real, la mayoría de los estudios utilizan la tecnología TaqMan, que permite una alta sensibilidad, especificidad en las dianas amplificadas, rapidez y sencillez de los experimentos y la posible cuantificación de los productos amplificados. La cuantificación de las moléculas de mRNA diana, sin embargo, no permite la relación directa con el número de células tumorales presentes en la muestra original ya que existen varios impedimentos que dificultan esta correlación. Parte de estos problemas son metodológicos, un ejemplo es la dificultad de cuantificar el número de células utilizadas de partida en la extracción de RNA, ya que aunque se cuantifiquen y estandaricen, la efectividad de la extracción es independiente entre muestras. El otro problema importante viene impuesto por la naturaleza del tumor, ya que se ha demostrado que diferentes líneas celulares de neuroblastoma muestran diferentes niveles de expresión de las dianas utilizadas, en el caso de *TH* va desde 21,9 transcritos por célula en la línea celular CHP-212 a 0,55 transcritos en la línea celular SK-N-F1 (Kagedal B. comunicación personal). También los datos obtenidos por Ifversen y colaboradores con muestras procedentes de pacientes con neuroblastoma, donde el número de transcritos de *TH* oscila de 0,1 a 680 transcritos por célula (Ifversen *et al.*, 2005), nos corroboran la imposibilidad de la correlación directa entre el número de moléculas de mRNA y el número de células tumorales.

Bozzi y colaboradores proponen la detección de la *dopamina decarboxilasa* (*DDC*) con la técnica de RT-PCR seguida de una PCR anidada y la detección de los productos amplificados mediante la visualización directa en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. En ensayos *in vitro* mezclando linfocitos de sangre periférica de individuos control y células tumorales de dos líneas celulares de neuroblastoma (SK-N-5Y y SK-N-BE) consiguen una sensibilidad de detección de 1 célula tumoral entre 10^3 células normales sólo con el primer experimento de PCR y una sensibilidad de $1/10^6$ tras la PCR anidada del producto de PCR inicial (Figura 14) (Bozzi *et al.*, 2004). Corrias y colaboradores utilizan una metodología similar para la detección de *TH* y *PGP 9.5*, pero en este caso la sensibilidad que alcanzan es la detección de 1 célula tumoral entre 10^5 células normales (Corrias *et al.*, 2004).

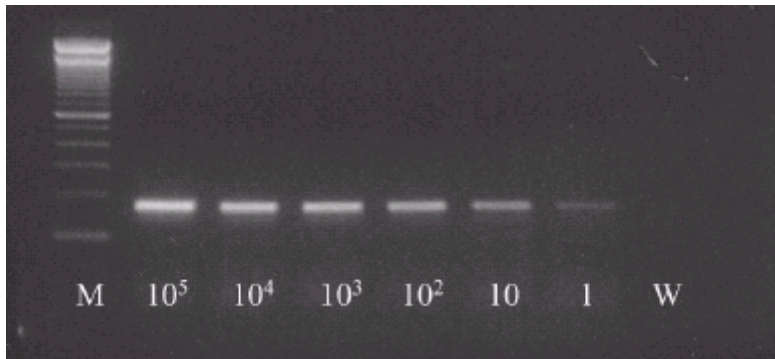


Figura 14: Sensibilidad de PCR anidada para la detección de *DDC*.

El mayor nivel de sensibilidad conseguido es el que se muestra en la línea marcada con 1, que corresponde a la detección de 1 célula tumoral de la línea celular SK-N-BE entre un millón de células normales. M = marcador molecular; W = agua (*adaptado de Bozzi et al., 2004*).

Diferentes grupos han utilizado una estrategia basada en la amplificación por PCR de las moléculas de mRNA diana y la posterior hibridación mediante la técnica de Southern Blot. Burchill y colaboradores utilizan como diana para la detección de EMR la expresión de *TH*. Tras la RT-PCR, la amplificación y la electroforesis transfieren los productos de PCR a una membrana de nylon e hibridan la misma con un oligonucleótido específico marcado con ^{32}P que tiene como diana parte del producto de PCR amplificado. La sensibilidad que describen basándose en experimentos de dilución de células tumorales de la línea celular de neuroblastoma IMR-32 es la detección de 1 célula tumoral diluida en 2 ml de sangre periférica control (*Burchill et al., 2001-A*). Cheung y colaboradores utilizan en uno de sus trabajos una tecnología similar para *GAGE*, aunque la detección final de la hibridación en la membrana de nylon se realiza mediante métodos quimioluminescentes. La sensibilidad obtenida en este caso es similar a la anterior y 500 veces mayor a la lograda con la visualización directa de los productos de PCR en el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Figura 15) (*Cheung et al., 1997-B*).

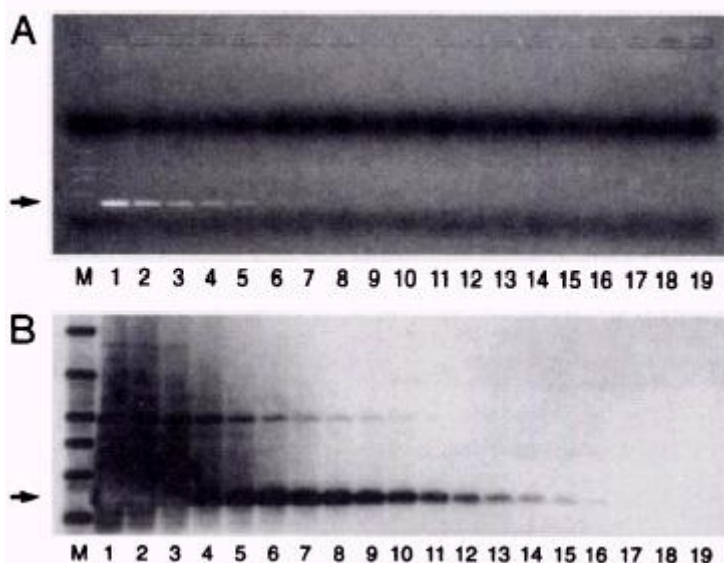


Figura 15: Detección mediante RT-PCR de *GAGE* en una dilución seriada de RNA extraída de la línea celular LA-N-1-55N. A: gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. B: Detección quimioluminiscente del Southern Blot tras la hibridación con una sonda específica. La flecha señala el fragmento de 239 pares de bases específico de *GAGE* (adaptado de Cheung et al., 1998).

Como ya hemos mencionado anteriormente la RT-PCR cuantitativa en tiempo real es la técnica de elección actualmente para la detección de EMR (Figura 16). La mayoría de las publicaciones optan por el desarrollo de métodos de cuantificación relativa, comparando los niveles de mRNA del gen diana con la expresión de genes de expresión constitutiva como β 2-microglobulina o gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPD*). Viprey y colaboradores diseñaron un procedimiento estándar para la detección de *TH* utilizando como gen de expresión constitutiva β 2-microglobulina. La sensibilidad conseguida es la detección de 1 célula tumoral en un millón de células normales. La peculiaridad de este estudio es el intento de diseñar una metodología estándar aplicable a estudios multicéntricos para averiguar el posible valor clínico de la detección de EMR en neuroblastoma (Viprey et al., 2007). El marco de aplicación de dicha metodología se pretendía que fueran los diferentes protocolos diseñados por el grupo europeo de neuroblastoma, perteneciente a la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica (SIOPEN).

Cheung y colaboradores utilizan también un método cuantitativo para la detección del marcador *GD2*, siendo el gen de expresión constitutiva de elección *GAPD*. En este caso al existir expresión de dicho marcador en

muestras normales a niveles muy bajos, se establece un rango de corte por debajo del cual las muestras son consideradas negativas. Dicho rango se estima calculando la media de expresión relativa de *GD2* en 31 muestras normales de médula ósea y sumándole a la misma 2 desviaciones estándar. La sensibilidad descrita en este caso también es de $1/10^6$ (Cheung et al., 1997-B).

En la mayoría de los marcadores descritos al inicio de este estudio o durante la parte experimental del mismo, *ELAVL4* (Swerts et al., 2006), *STX* (Cheung et al., 2006), (*Ciclina D1*) (Cheung et al., 2007) se realiza una cuantificación relativa utilizando como genes de expresión constitutiva *GAPD* en el caso de *STX* y *Ciclina D1* y $\beta 2$ - *microglobulina* en el caso de *ELAVL4*. En el caso de *ppGalNAc-T 13* (Berois et al., 2006), se opta sin embargo por una cuantificación absoluta. En todos los casos las sensibilidades logradas son semejantes, en el rango de detección de 1 célula tumoral en un millón de células normales.

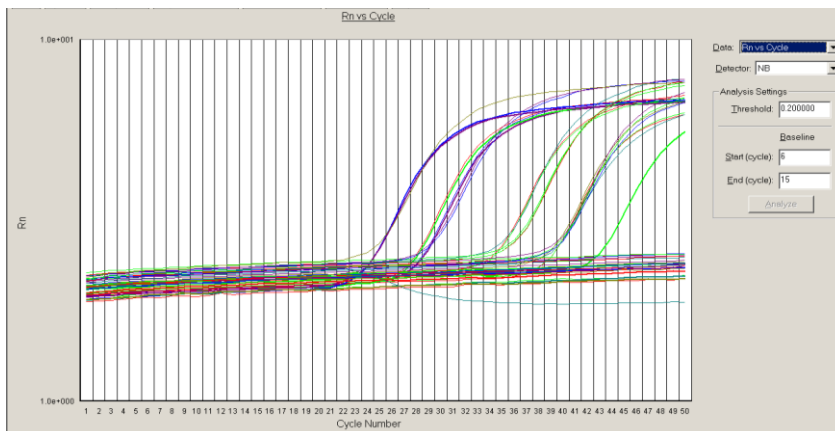


Figura 16: Esquema de amplificación generado por la amplificación mediante RT-PCR de TH en una serie de muestras de pacientes con neuroblastoma.

La alta sensibilidad de este tipo de métodos la hace susceptible de detectar transcripción ilegítima de los genes utilizados como diana, por lo tanto la validación clínica de estos marcadores es vital. Por otra parte la utilidad clínica de la detección molecular de células circulantes se ciñe a cada uno de los estudios realizados, esto se debe al pequeño número de pacientes estudiados, la variabilidad de dianas y genes de expresión constitutiva utilizada y de la metodología. Por ello se necesitan grandes estudios multicéntricos como los planteados por el grupo europeo de neuroblastoma

para poder resolver toda una serie de cuestiones como la posible utilización de los resultados obtenidos en la estratificación de los pacientes, la evaluación de la eficacia del tratamiento, la monitorización de la enfermedad y la evaluación de la respuesta, la detección de EMR y el valor pronóstico de los mismos (Figura 17) (Beiske et al., 2005).

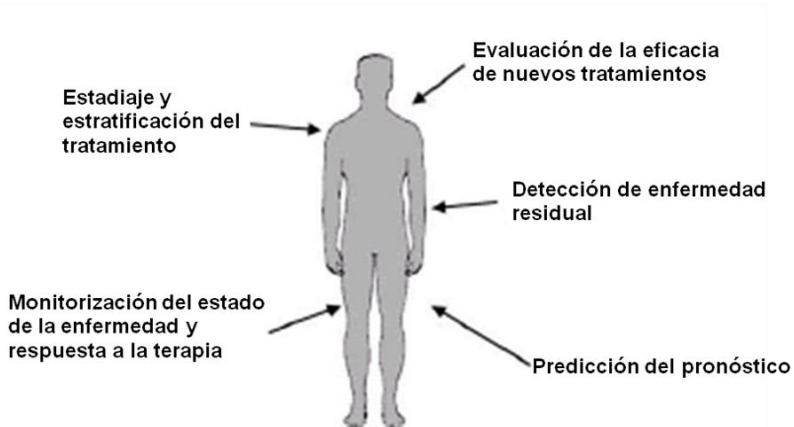


Figura 17: Potencial utilidad clínica de la detección por RT-PCR de células residuales de neuroblastoma (modificado de Beiske et al., 2005).

2.6.4.3.- Significado clínico

Aunque la detección de células de neuroblastoma en médula ósea o sangre periférica no es suficiente para el desarrollo de lesiones metastásicas evidentes, la presencia de dichas células es necesaria para la difusión de la enfermedad. Uno de los mayores desafíos en los últimos años ha sido dilucidar si la detección de micrometástasis con estos métodos más sensibles, nos provee de una herramienta más fiable para la identificación de pacientes de neuroblastoma de alto riesgo que los métodos rutinarios actuales.

Al diagnóstico, la presencia de células de neuroblastoma detectadas por RT-PCR en médula ósea, o el nivel alto de transcritos de los marcadores estudiados, identifica a grupos de pacientes con un pronóstico desfavorable y de ultra alto riesgo asociado con el estadio de la enfermedad (Cheung et al., 2001-B; Horibe et al., 2001; Viprey et al., 2014). La relación de la detección de EMR con el estadio de la enfermedad es una buena evidencia de que el uso de estos métodos más sensibles nos puede proporcionar datos de importancia clínica. Otro aspecto interesante es que la frecuencia de infiltración por células de neuroblastoma detectada por RT-PCR, en los primeros estudios publicados en niños con estadio 4 al diagnóstico, es del 95-100% (Miyajima et al., 1995; Shono et al., 2000; Horibe et al., 2001), sin embargo en el caso de la citología convencional sólo alcanza el 90% (Reid et al., 1991). Estos datos

sugieren que la RT-PCR o la inmunocitología son dos métodos más sensibles para la detección de la EMR en neuroblastoma, sin embargo si la presencia o no de células tumorales tienen un valor pronóstico depende de la diana estudiada y varía en los diferentes estudios publicados.

La identificación de micrometástasis en médula ósea en pacientes estadio 4 actualmente es poco relevante, ya que estos niños son considerados de alto riesgo y tratados como tal, sin embargo se podrían beneficiar de terapias más intensivas. Estos métodos nos podrían ayudar a identificar a los pacientes que no responden al tratamiento y que, por lo tanto, las estrategias terapéuticas aplicadas no son las idóneas.

Aunque la información sobre la frecuencia de detección de células de neuroblastoma en estadios 1, 2, 3 y 4S es limitada, se ha descrito que un 37% de las médulas óseas analizadas en niños de bajo riesgo fue positiva por RT-PCR (*Shono et al., 2000*). Este dato implica que en todos estos pacientes la EMR ha pasado desapercibida con los estudios de citología convencional. En este grupo de niños, sí que es importante establecer si la detección de células de neuroblastoma por técnicas más sensibles tiene una importancia clínica, ya que se podrían beneficiar de tratamientos más adecuados (*Burchill, 2004*).

La detección de células de neuroblastoma al diagnóstico mediante RT-PCR en sangre periférica identifica a grupos de pacientes con un pronóstico desfavorable. Se suelen detectar células tumorales en sangre periférica en estadios 4 y raramente en estadios 1, 2 o 3 (*Burchill et al., 1995; Gao et al., 1997*). La detección de enfermedad diseminada en sangre periférica en pacientes con estadio 3 parece que se correlaciona con un resultado pobre del tratamiento de estos pacientes (*Burchill et al., 1995*), estos datos apoyarían el cambio de nivel de riesgo de los mismos.

En niños con enfermedad avanzada (estadio 4 mayores de 1 año), la detección de células tumorales en sangre periférica es un buen predictor de una progresión rápida de la enfermedad (*Burchill et al., 2001-A*), esto también apoyaría la hipótesis de utilizar nuevas estrategias terapéuticas en estos pacientes dirigidas al aumento de su supervivencia.

La frecuencia en la detección de células tumorales de neuroblastoma en sangre periférica al diagnóstico es menor que en médula ósea (50% frente al 95-100% en pacientes de alto riesgo con estadio avanzado). El estudio del valor clínico de la presencia de metástasis en estos dos compartimentos es esencial para determinar su utilidad en la práctica clínica y para entender el proceso metastático en neuroblastoma.

Una de las aplicaciones más importantes de la detección de micrometástasis en pacientes de alto riesgo puede llegar a ser la evaluación de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. Existen diferentes estudios que sugieren que mediante la utilización de la RT-PCR en muestras secuenciales de médula ósea y sangre periférica se puede hacer un seguimiento de dicha respuesta (*Miyajima et al., 1996; Burchill et al., 2001-A; Horibe et al., 2001; Trager et al., 2003; Viprey et al., 2014; Cheung et al., 2015*). Además la

detección de células de neuroblastoma en niños en remisión clínica puede ser una herramienta clínica potente para la detección de micrometástasis antes de la recaída clínica.

Por otra parte la correlación observada entre la detección de células tumorales en los productos de aféresis y el mal comportamiento clínico post-trasplante, sugiere que la reinfusión de células tumorales influye en la recaída (*Moss et al., 1994; Burchill et al., 2001-B; Chambon et al., 2013*). La detección de células tumorales en los productos de aféresis refleja el avanzado estado de la enfermedad en el paciente, además en estos niños se suele observar una mayor agresividad de la enfermedad y por lo tanto una mayor probabilidad de recaídas (*Brenner et al., 1993; Rill et al., 1994*).

La detección de micrometástasis podría dar lugar a la redefinición de remisión completa libre de enfermedad y recaída. Sin embargo, como ya hemos comentado anteriormente, es necesaria la aplicación de los mismos a grandes protocolos multicéntricos con dianas y métodos homogéneos para alcanzar el número necesario de pacientes que permitan la extracción de conclusiones con utilidad clínica que finalmente ayuden a conseguir un aumento de la supervivencia de los pacientes.

2.6.5.- Citometría de flujo

La Citometría de Flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células), alineadas y de una en una, por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores. Estos convierten dichas señales en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. Se utiliza para el análisis y la definición del perfil inmunofenotípico de las células neoplásicas, así como para establecer la presencia de fenotipos aberrantes. Si se aplican anticuerpos monoclonales específicos, dirigidos contra proteínas de membrana o intracitoplasmáticas, que llevan apareado un fluorocromo, estas se pueden detectar y visualizar mediante un sistema informático apropiado. Además posee una sensibilidad superior a 1×10^4 , es decir, es capaz de detectar una célula tumoral entre 10.000 células normales. (*Sievers et al., 2000; Coustan-Smith et al., 2002; Dworzak et al., 2002; Bjorklund et al., 2003*).

El ensayo de citometría de flujo de tres colores para la detección de células diseminadas de neuroblastoma en sangre periférica y médula ósea fue desarrollado por Komada y colaboradores en 1998 (*Komada et al., 1998*). Este ensayo se basa en la detección de CD9, CD56 y CD45.

CD9 es una proteína transmembrana que se expresa de manera consistente en las células de neuroblastoma (*Komada et al., 1986*). El anticuerpo CD56 está presente en un subgrupo de células T CD4 y CD8 positivas en sangre periférica, células derivadas neurales y tumores, linfocitos granulares grandes y leucemias mieloides, carcinomas microcíticos de pulmón y mielomas. El antígeno CD45 común en los leucocitos y ausente en las células de neuroblastoma fue utilizado como marcador negativo. En este estudio las células CD9+/CD56+/CD45- se considerasen células de neuroblastoma siempre que mostraran una morfología compatible con células neuroblásticas.

Posteriormente, se introdujeron diferentes mejoras reemplazando CD9 por CD81 ya que sospechaban que la interacción entre CD9 y las plaquetas podría conducir a la agregación plaquetar (*Nagai et al., 2000*). El CD81 es un miembro multimérico del complejo de transducción de señales de la superficie celular que se expresa en células hematopoyéticas, endoteliales y epiteliales y que también se ha descrito en células de neuroblastoma (*Oren et al., 1990*). Con esta segunda combinación, Nagai y colaboradores lograron la detección de células tumorales CD81+/CD56+/CD45- a una concentración de $5/10^5$.

Warzynski y colaboradores evaluaron diferentes combinaciones de anticuerpos, proponiendo la de Anti-GD2/CD56/CD45 (*Warzynski et al., 2002*). Posteriormente añadieron CD81 a la combinación previa y en ensayos con muestras de pacientes y muestras preparadas artificialmente con diferentes concentraciones de células tumorales llegaron a conseguir una sensibilidad de $2/10^5$.

Tsang y colaboradores compararon el ensayo de citometría de flujo de tres colores CD81/CD56/CD45 con la detección de TH mediante RT-PCR encontrando una buena correlación entre ambas técnicas. Teniendo en cuenta la ventaja de la citometría de flujo en el análisis de gran número de células, este grupo recomendó la combinación de la citometría de flujo con la detección de TH para valorar la regresión del tumor y monitorizar la EMR en pacientes con neuroblastoma (*Tsang et al., 2003*).

El uso de la citometría de flujo de cuatro colores utilizando las combinaciones CD9/CD81/CD56/CD45 y Anti-GD2/CD81/CD56/CD45 ha sido publicada por el grupo de Swerts y colaboradores (*Swerts et al., 2004*). En este estudio y mediante la utilización de controles artificiales se consiguió una sensibilidad de detección de una célula tumoral entre 10^5 células normales. Además demostraron una fuerte correlación entre los resultados obtenidos mediante la citometría de flujo y los obtenidos mediante técnicas inmunocitológicas.

La citometría de flujo se ha utilizado en los últimos tiempos de manera habitual en la práctica clínica, tanto en el campo de la hematología como en oncología y presenta una serie de ventajas: proporciona información sobre múltiples parámetros celulares, permite identificar células apoptóticas y fragmentos celulares, se pueden rastrear muchísimas células en poco tiempo y tiene un cociente costo/efectividad bajo. Sin embargo, la citometría de flujo tiene también limitaciones, en contraste con la inmunocitología o la RT-PCR, es virtualmente imposible detectar una célula de neuroblastoma entre un millón de células normales.

2.7.- Pronóstico y terapia

Los datos obtenidos por diferentes grupos cooperativos internacionales apoyan la hipótesis de que el comportamiento clínico de los pacientes de neuroblastoma puede ser predicho basándose en el análisis de un panel de variables pronósticas.

Los enfermos se clasifican, por tanto, en grupos de riesgo con recomendaciones terapéuticas diferentes para cada uno de ellos. En la tabla 6 podemos observar las clasificaciones en uso por los mayores grupos cooperativos internacionales en neuroblastoma que se utilizaban en el punto de partida del presente estudio. Estas clasificaciones no son idénticas, de hecho existe sólo un 85% de concordancia y por tanto en este apartado nos referiremos a la clasificación en grupos de riesgo de la sección europea de neuroblastoma de la sociedad internacional de oncología pediátrica (ESIOP-neuroblastoma).

Tabla 6: Clasificación en grupos pronósticos utilizados por diferentes grupos internacionales: Grupo Alemán de Neuroblastoma (GPOH), *Children's Oncology Group* (COG), Grupo de Neuroblastoma de SIOP-Europa y Grupo Japonés de Neuroblastoma (*Reproducido de Castel et al., 2005*).

Riesgo	GPOH	COG	ESIOP	Japón
Bajo	Estadio 1 cualquier edad y <i>N-myc</i> Estadio 2-3, 4S < 1 año, asintomático	Estadio 2-3, 4S < 1 año, asintomático Estadio 2 > 1 año extirpable Estadio 1,2, 4S de cualquier edad sin amplificación <i>N-myc</i> Shimada favorable Hiperdiploide o casi triploide	Estadio 1, 2 > 1 año sin amplificación <i>N-myc</i> Estadio 1,2,4S en lactantes, sin amplificación <i>N-myc</i> Estadio 4 en lactante sin metástasis en hueso, pulmones o SNC	Estadio 4 en lactante sin metástasis en hueso, pulmones o SNC Estadios 1 y 2 Menores de 1 año Estadio 1,2,3, 4S sin amplificación <i>N-myc</i>
Intermedio	Estadios 2,3, 4S < 1 año con síntomas amenazadores Estadios 2 y 3 mayores de 1 año, inextirpable	Estadio 2, 4 < 1 año, sin amplificación <i>N-myc</i> Estadio 4S, < 1 año, sin amplificación <i>N-myc</i> , con Shimada desfavorable y/o tumor diploide Estadio 3 mayor de 1 año, sin amplificación <i>N-Myc</i> y Shimada favorable	Estadio 3, < 1 año y sin amplificación <i>N-myc</i> Estadio 3 > 1 año y sin amplificación <i>N-myc</i> Estadio 4 en lactantes con metástasis en hueso, SNC, pulmón o pleura sin amplificación <i>N-myc</i>	Estadio 3 > 1 año y sin amplificación <i>N-myc</i> Estadio 4 en lactantes sin amplificación <i>N-myc</i>
Alto	Estadio 1,2,3, 4S cualquier edad con NMA Estadio 4 cualquier edad y <i>N-myc</i>	Estadio 4 mayor de 1 año Estadio 3 > 1 año, con NMA y/o sólo Shimada desfavorable Estadio 2,3,4,4S < 1 año y NMA Estadio 2 > 1 año, NMA y Shimada desfavorable	Estadio 4 > 1 año Estadio 2,3, > 1 año y NMA Estadio 2,3,4,4S, < 1 año y NMA	> 1 año, estadio 4 y sin amplificación <i>N-myc</i> Cualquier edad y estadio con NMA

NMA: Amplificación de MYCN; SNC: Sistema nervioso central

Actualmente y utilizando la clasificación del estadiaje INRGSS mostrado en la Tabla 4, la edad y las características del Tumor los pacientes se han pasado a clasificar en cuatro grupos de riesgo, el muy bajo, bajo, intermedio y alto riesgo. La clasificación resultante se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7: Esquema de Clasificación del riesgo INRG pre tratamiento en neuroblastoma. L: tumor localizado, M: metastático, MS: metastático especial, GN: ganglioneuroma, GNB: ganglioneuroblastoma, NA: No amplificado, Amp: Amplificado. Riesgo muy bajo: Supervivencia Libre de Eventos (SLE) a los 5 años >85%; Bajo Riesgo: SLE a los 5 años >75% a ≤85%; Riesgo Intermedio: SLE a los 5 años ≥50 a ≤75%; Alto Riesgo: SLE a los 5 años <50%. Reproducido de “*The international Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report*” (Cohn et al., 2009).

Estadio INRG	Edad meses	Clasificación Histológica	Grado de diferenciación del tumor	MYCN	11q	Ploidía	Grupo de riesgo
L1/L2		GN diferenciado GNB entremezclado					A Muy Bajo
L1		Todos excepto GN diferenciado GNB entremezclado		NA			B Muy Bajo
				Amp			K Alto
L2	< 18	Todos excepto GN diferenciado GNB entremezclado		NA	No		D Bajo
					Si		G Intermedio
	≥ 18	GNB nodular; neuroblastoma	Diferenciado	NA	No		E Bajo
			Pobrementemente diferenciado o indiferenciado		Si		H Intermedio
			Amp			N Alto	
M	< 18			NA		Hiperdiploide	F Bajo
	< 12			NA		Diploide	I Intermedio
	12 a < 18			NA		Diploide	J Intermedio
	< 18			Amp			O Alto
	≥ 18						P Alto
MS	< 18			NA	No		C Muy Bajo
					Si		Q Alto
				Amp			R Alto

En los siguientes apartados se describirán los grupos pronóstico asignados a los pacientes estudiados en el presente trabajo. Esta decisión se tomó en base a que la práctica totalidad de las muestras son de pacientes diagnosticados antes de la instauración de la nueva clasificación y por lo tanto los grupos de riesgo asignados y los tratamientos se ajustan a la misma.

2.7.1.- Grupo de pronóstico favorable

Dentro de este grupo se clasifica a los pacientes con neuroblastoma estadio 1 o 2 de cualquier edad y el estadio 4S, sin amplificación de MYCN, teniendo todos ellos un pronóstico excelente con una tasa de curación

superior al 90% (Coterill *et al.*, 2000). Estos pacientes requieren un tratamiento mínimo, generalmente sólo cirugía, a excepción de los casos que presentan síntomas de compresión medular o bien afectación hepática o de otra índole que compromete la vida (Pérez *et al.*, 2000).

Estudios prospectivos demostraron que la cirugía es suficiente tratamiento para los neuroblastomas estadio 1 y 2 sin amplificación de *MYCN*. El estudio colaborativo del grupo europeo LNESG-1 obtuvo una supervivencia del 94 % en 125 casos de neuroblastoma estadio 2 sin amplificación de *MYCN* tratados sólo con cirugía (revisado en Castel *et al.*, 2005), y la supervivencia y la supervivencia libre de enfermedad (SLE) fueron del 98 % y 81 % en 233 pacientes estadio 2 tratados de forma similar por el *Children's Cancer Group* (CCG); y del 99% y 93% respectivamente para 141 niños en estadio 1 (Pérez *et al.*, 2000).

La capacidad de regresión espontánea es una de las características típicas del estadio 4S del neuroblastoma, sin embargo algunos casos presentan un comportamiento inicial muy agresivo, que puede conducir a la muerte del niño por insuficiencia hepática o respiratoria. De acuerdo con los resultados de un estudio retrospectivo realizado por el *Pediatric Oncology Group* en 110 lactantes con neuroblastoma 4S, la extirpación del tumor primitivo podría no ser necesaria para la supervivencia (Katzenstein *et al.*, 1998; Nickerson *et al.*, 2000).

2.7.2.- Grupo pronóstico intermedio

Este grupo está compuesto por niños con neuroblastoma estadio 3 sin amplificación de *MYCN* de cualquier edad y estadio 4, también sin amplificación, en lactantes (Tabla 5). Se trata de un grupo más bien pequeño de pacientes y alcanza excelentes resultados terapéuticos con cirugía y quimioterapia de intensidad moderada con una tasa de curación del 70-90% (Mattay *et al.*, 1998).

Las discusiones terapéuticas sobre el estadio 3 se han centrado fundamentalmente en las posibilidades de extirpación al diagnóstico o tras quimioterapia. Después de recibir quimioterapia preoperatoria el 70%–90% de los neuroblastomas estadio 3 se convierten en extirpables. Además el procedimiento quirúrgico es más seguro tras la aplicación de quimioterapia, con menor tasa de complicaciones (West *et al.*, 1993; Powis *et al.*, 1996). Se recomienda por tanto, tras la realización de una biopsia para estudiar factores pronósticos, la administración de un ciclo corto de quimioterapia para inducir la regresión y mejorar las posibilidades de resección, seguidos por 2 o 4 ciclos de quimioterapia postoperatoria.

Los lactantes con neuroblastoma estadio 3 sin amplificación de *MYCN* tienen muy buen pronóstico con quimioterapia suave y cirugía. En el protocolo N-I-87 del grupo español de neuroblastoma se pudo realizar una resección retardada en todos los pacientes de estas características y la SLE a los 5 años fue del 93% (Castel *et al.*, 1995).

El pronóstico de los lactantes con neuroblastoma estadio 4 es mucho mejor que el de los niños mayores. El tratamiento ha sido similar al recibido por los de mayor edad, pero la mayor toxicidad en los pequeños y un mejor conocimiento de los factores pronósticos han hecho cambiar la estrategia. En la actualidad se consideran de riesgo intermedio y el objetivo es mejorar su supervivencia con quimioterapia de intensidad moderada. El factor pronóstico más importante es la amplificación de *MYCN*, Schmidt y colaboradores encontraron una SLE del 10% para los lactantes estadio 4 con amplificación de *MYCN* (Schmidt et al., 2000). Para los no amplificados el tipo de metástasis también influye en la evolución, siendo de peor pronóstico las óseas visibles en radiología convencional, las pleurales y en el sistema nervioso central (Minard et al., 2000).

2.7.3.- Grupo de alto riesgo

Es el grupo más numeroso en la presente clasificación, compuesto principalmente por pacientes mayores de 18 meses con estadio 4, pero también incluye a cualquier otro estadio de la enfermedad (excluyendo el 1) con amplificación de *MYCN*, independientemente de la edad. El pronóstico de estos enfermos sigue siendo malo, incluso con tratamientos muy agresivos, pero ha mejorado notablemente en los últimos años. Se ha pasado de una SLE a los 5 años del 8% en 1985 a un 30% en pacientes tratados en protocolos controlados a partir de 1990 (Hayes et al., 1989; Matthay et al., 1999; Castel et al., 2001; Kaneko et al., 2002). Los estudios biológicos y otros factores clínicos que tienen valor pronóstico en el neuroblastoma localizado son irrelevantes en los pacientes de alto riesgo. Sólo la amplificación del *MYCN* confiere un valor pronóstico negativo a los tumores que la presentan. El tratamiento para estos pacientes consta de varias partes: quimioterapia de inducción, cirugía, megaterapia con trasplante autólogo y tratamiento de enfermedad residual mínima (Castel et al., 2005).

2.7.3.1.- Quimioterapia de inducción

Esta opción terapéutica intenta controlar las metástasis y hacer extirpable el tumor primitivo. Se han descrito multitud de esquemas para este fin, casi todos utilizan ciclofosfamida, vincristina, etoposido y carboplatino o cisplatino, en diferentes dosis y con resultados similares. La tasa de respuesta oscila entre el 64% y el 86% de los casos, pero no todos los estudios han utilizado las recomendaciones del INRC para la evaluación de la respuesta, así que la comparación de su eficacia resulta difícil en ocasiones.

El intervalo entre los ciclos de quimioterapia parece influir en la respuesta, de tal forma que serían más efectivos aquellos protocolos que tienen intervalos libres más cortos entre los ciclos (Cheung et al., 1991; Pinkerton et al., 2000; Castel et al., 2001). Tampoco se ha demostrado que el grado de respuesta a la quimioterapia de inducción influya en la evolución a largo

plazo. Sólo existe una diferencia clara entre pacientes “respondedores” y “no respondedores”, pero la supervivencia es similar para los que consiguen remisión completa, o remisión parcial tras la quimioterapia de inducción aislada o combinada con cirugía (*Castel et al., 1999*).

En Europa no se ha demostrado una evidencia clara de que ninguno de los regímenes de inducción utilizado en los diferentes países sea superior a los otros. Los regímenes de quimioterapia utilizados en EE.UU., por ejemplo CCG 3891, también han encontrado resultados parecidos (*Stram et al., 1996*).

Kaneko y colaboradores han publicado los resultados de los estudios japoneses en el neuroblastoma estadio 4. En su último estudio, han intensificado la terapéutica de los pacientes con amplificación de *MYCN* obteniendo una mejoría en la SLE. Es difícil concluir si esta mejoría en supervivencia es el resultado de una quimioterapia de inducción más agresiva, de un mayor número de pacientes que reciben trasplante de médula ósea, o de otros factores. Sin embargo aporta nuevas evidencias de que un tratamiento más intensivo mejora el pronóstico de los pacientes con neuroblastoma estadio 4 y con amplificación de *MYCN* (*Kaneko et al., 2002*).

2.7.3.2.- Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos

La respuesta obtenida con la quimioterapia de inducción y la cirugía se consolida generalmente con quimioterapia a altas dosis y trasplante autólogo de MO. Dos estudios aleatorizados para el tratamiento de consolidación en pacientes con neuroblastoma estadio 4 han demostrado que la quimioterapia mieloablativa, con trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos, es superior a la quimioterapia convencional de mantenimiento (*Matthay et al., 1999; Pritchard et al., 2005*). El estudio realizado por el CCG, incluyó a 379 pacientes elegibles que, después de una quimioterapia de inducción común a todos y cirugía, fueron aleatorizados para recibir quimiorradioterapia con trasplante autólogo de médula ósea purgada o 3 ciclos de quimioterapia de consolidación. La SLE a los 3 años fue significativamente mejor para los pacientes trasplantados, en comparación con los que recibieron quimioterapia, 34% y 21% respectivamente ($p < 0,001$), además no hubo diferencia en muertes tóxicas (*Matthay et al., 1999*).

La irradiación corporal total ya no se utiliza prácticamente como régimen de acondicionamiento en el neuroblastoma debido a su alto potencial de toxicidad en enfermos jóvenes y la no clara demostración de una mayor eficacia. Tampoco se ha encontrado ninguna ventaja para el trasplante alogénico en comparación con el autólogo, tanto en un estudio prospectivo realizado por el CCG, como en un estudio retrospectivo de casos controles del *European Bone Marrow Transplantation Registry* (*Matthay et al., 1994; Ladenstein et al., 1998*). Debido a las claras ventajas de obtención de progenitores, así como a la recuperación más rápida de los pacientes, las células madre obtenidas a partir de sangre periférica han sustituido a la

médula ósea para el trasplante en el neuroblastoma, lo mismo que en otros tumores sólidos.

Se ha utilizado un número muy amplio de terapéuticas mieloablativas, muchas de ellas en un número limitado de pacientes, haciendo difícil la comparación de su respectiva eficacia antitumoral y toxicidad. Todas las pautas incluyen melfalan combinado con otros fármacos. En Europa la combinación más ampliamente utilizada ha sido el busulfan/melfalan (Bumel). Hartmann y colaboradores realizaron un análisis retrospectivo de factores pronósticos, en 218 pacientes afectados de neuroblastoma metastático que habían sido trasplantados. La probabilidad de SLE a los 5 años era del 29%. En el análisis multivariante se detectaron 3 factores favorables independientes. Éstos fueron: edad inferior a 2 años, ausencia de metástasis en médula ósea al diagnóstico y tratamiento mieloablativo con Bumel. El tipo de régimen mieloablativo parecía ser el factor con mayor importancia pronóstica (*Hartmann et al., 1999*).

Otra cuestión no aclarada por el momento es la necesidad de purgar la médula ósea para rescate. Seeger y colaboradores estudiaron la médula ósea de los pacientes con neuroblastoma mediante inmunocitología con anticuerpos monoclonales antigangliósidos, demostrando que el 81 % de los pacientes tenían células tumorales al diagnóstico y 14% de ellos mantenían células tumorales, después de la quimioterapia de inducción. La cantidad de células tumorales en la médula ósea al diagnóstico, en el momento de la recolección de la médula ósea para el trasplante y al final de la inducción, tuvieron un claro efecto desfavorable en la SLE (*Seeger et al., 2000*).

Estudios de RT-PCR para TH en médula ósea, sangre periférica y aféresis han confirmado el problema de la contaminación por células tumorales en diferentes momentos de la enfermedad, incluso en aféresis con selección positiva para CD34, así como la influencia pronóstica negativa en la evolución de la enfermedad, como ya hemos comentado anteriormente.

2.7.3.3.- Tratamiento de la EMR

Con el uso de la quimioterapia de inducción, cirugía y megaterapia con trasplante autólogo, la tasa de respuesta oscila entre el 60% y el 80% de todos los pacientes, pero muchos de ellos recaen posteriormente. Las recaídas son locales, pero sobre todo metastáticas y guardan relación con la persistencia de enfermedad residual mínima. Para intentar controlar este fenómeno se están utilizando agentes diferenciadores como los retinoides y anticuerpos monoclonales (*Castel et al., 2005*).

2.7.3.3.1.- Agentes diferenciadores

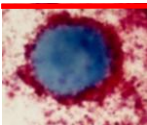
Los agentes diferenciadores redirigen las células hacia su fenotipo normal y por tanto pueden suprimir la aparición de nuevas lesiones malignas. Numerosos trabajos han demostrado que el ácido 13 cisretinoico (13-cis-Ra) es efectivo para inducir la diferenciación del neuroblastoma y producir

apoptosis in vitro. Este fenómeno, conducía a una marcada disminución en la proliferación de las células del neuroblastoma (*Reynolds et al., 1991*). Estos resultados prometedores condujeron a la realización de dos estudios prospectivos, aleatorizados, multicéntricos para ver si se producía beneficio administrando el ácido 13 cis-Ra, después de terminar toda la quimioterapia citotóxica. En el primer estudio realizado en Europa, 175 niños con neuroblastoma en estadio 3 y 4, que habían obtenido una buena respuesta con la quimioterapia convencional, fueron distribuidos al azar en 2 ramas, una que recibía ácido 13 cis-retinoico (0,75 mg por Kg y día) y otra placebo, ambos de forma continuada por un período de 2 años. La toxicidad fue muy discreta pero no se observó ninguna mejoría en la SLE en el grupo que recibió 13 cis-Ra (*Kohler et al., 2000*). Simultáneamente el CCG realizó un estudio prospectivo y aleatorizado en 259 niños con neuroblastoma estadio 4. Los 130 pacientes que recibieron 13 cis-Ra (160 mg m² y día), por 14 días al mes, durante 6 meses tuvieron un aumento de supervivencia a los 3 años (46% frente a 29% para el resto $p=0,027$) (*Matthay et al., 1999*).

2.7.3.3.2.- Anticuerpos monoclonales

Como ya hemos descrito anteriormente, los gangliósidos son antígenos de superficie de la membrana que están presentes en todas las células del neuroblastoma, mientras que en los tejidos normales sólo existen en el sistema nervioso. El Grupo del *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* ha usado anticuerpos anti-GD2 murinos (3F8) desde 1980 como tratamiento, solos o conjugados con un isótopo radiactivo, habiendo conseguido mejorar la supervivencia en sus pacientes con neuroblastoma de alto riesgo. El estudio actual del COG para pacientes de alto riesgo compara de forma aleatorizada la administración de 13 cis-Ra solo, con 13 cis-Ra + Anti GD2. El protocolo HR-NBL1 del Grupo ESIOP está realizando una aleatorización similar.

Hipótesis de trabajo



II.- Hipótesis de trabajo

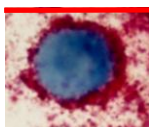
Tradicionalmente, en el estadiaje de los pacientes con neuroblastoma al diagnóstico, para valorar la afectación de la médula ósea se han utilizado técnicas citológicas e histológicas. Sin embargo, estas técnicas tienen una sensibilidad insuficiente, sobre todo durante o después del tratamiento, que no permite detectar la infiltración de células tumorales por debajo de un umbral de un 1%. Por ello, se han desarrollado técnicas como la inmunocitología o la RT-PCR que aumentan considerablemente dicha sensibilidad.

Se ha demostrado que la detección de enfermedad metastásica es un factor de mal pronóstico en los pacientes, como en otros muchos tumores sólidos, que disminuye la supervivencia. El estudio de las micrometástasis al diagnóstico, durante el tratamiento y en el seguimiento posterior, puede tener un impacto sobre la clasificación en grupos de riesgo de los pacientes, así como en el seguimiento de la evolución de la enfermedad.

Con los antecedentes anteriores, nos planteamos las siguientes hipótesis de partida:

- 1.- El estudio de la enfermedad mínima residual en pacientes con neuroblastoma en médula ósea, sangre periférica o productos de leucaféresis permitirá conocer más a fondo los procesos metastáticos. Además puede ser de utilidad clínica para establecer grupos de riesgo al diagnóstico, monitorizar y cuantificar la respuesta al tratamiento sobre la enfermedad metastática, detectar aféresis contaminadas con células tumorales o predecir una posible recaída de forma precoz antes de la aparición de otros signos clínicos.
- 2.- Determinar el método más sensible y específico permitirá un pronóstico más preciso de la enfermedad y mejor seguimiento de la misma.
- 3.- El empleo de sangre periférica como material para la búsqueda de enfermedad mínima residual puede evitar la realización innecesaria de métodos más invasivos como la biopsia de médula ósea, al menos en determinados tipos de pacientes o momentos de la enfermedad.

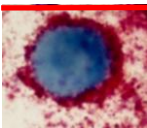
Objetivos



III.- Objetivos

1. Desarrollar nuevos marcadores de enfermedad mínima residual específicos para el neuroblastoma que permitan aumentar la sensibilidad y salvar la heterogeneidad tumoral.
2. Evaluar la sensibilidad y especificidad de diferentes marcadores de enfermedad mínima residual.
3. Valorar la utilidad predictiva de la expresión de los diferentes marcadores empleados al diagnóstico en la muestra tumoral.
4. Evaluar del impacto sobre la supervivencia de la detección de los diferentes marcadores en los distintos tipos de tejidos estudiados y momentos de la enfermedad, tanto en pacientes de alto riesgo, como en tumores localizados.

Material y métodos



IV.- Material y métodos

1.- Pacientes y muestras biológicas

1.1.- Pacientes

A lo largo del trabajo experimental se recogieron muestras pertenecientes a 462 pacientes de Neuroblastoma. El periodo de recogida de las muestras fue desde mitad de 1999 a principios de 2010. La clasificación de los estadios se realizó según la clasificación INSS (*Brodeur et al., 1993*) y en todos los casos se realizó una revisión centralizada de la Anatomía Patológica del tumor según los criterios de Shimada (*Shimada et al., 2001*). Además, en la mayoría de ellos se realizó el estudio centralizado de la amplificación del oncogén *MYCN* y otras alteraciones genómicas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. También, en todos los casos, la afectación ósea y de la médula ósea se valoró en el momento del diagnóstico mediante la realización de 2 biopsias óseas y 2 aspirados de médula ósea. La distribución de los pacientes por sexo y estadio se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Distribución por estadios y sexo de los niños reclutados para el estudio.

Características	Estadio INSS					Desconocido	Total
	1	2	3	4	4S		
n	85	37	111	174	35	20	462
Sexo							
Niño	43	15	65	111	23	8	265
Niña	42	22	46	63	12	12	197

Las muestras fueron remitidas desde 34 hospitales españoles y pertenecían a pacientes incluidos en los diferentes estudios nacionales y europeos de la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica (SEHOP) y la SIOPEN (N-II-92, LNESG, N-AR-99, N98/E3, EUNS, HR-NBN1, INES, N-I-87 y N-VI-00). Los hospitales remitentes y el número de pacientes incluidos de cada uno de ellos se muestran en la Tabla 9.

Además de los pacientes incluidos, también se recibieron muestras de pacientes con sospecha de Neuroblastoma y que fueron excluidos, bien porque finalmente no se confirmó el diagnóstico, ya que se trataba de otra neoplasia, o porque nunca se recibió la confirmación del mismo por parte del hospital remitente.

Tabla 9: Hospitales remitentes con el número de pacientes incluidos en el estudio de cada uno de ellos.

Hospital Remitente	Ciudad	Pacientes
Hospital Universitario La Fe	Valencia	106
Hospital Virgen del Rocío	Sevilla	45
Hospital Gregorio Marañón	Madrid	29
Hospital Niño Jesús	Madrid	24
Hospital General de Alicante	Alicante	24
Hospital Virgen de la Arrixaca	Murcia	19
Hospital de Cruces	Bilbao	19
Hospital Son Dureta	Palma de Mallorca	17
Hospital Central de Asturias	Oviedo	14
Hospital San Rafael	Madrid	14
Hospital Virgen del Camino	Pamplona	13
Hospital de Málaga	Málaga	13
Hospital Reina Sofía	Córdoba	12
Hospital Universitario de Canarias	Tenerife	12
Hospital de Donostia	San Sebastián	12
Hospital 12 de Octubre	Madrid	11
Hospital Virgen de la Salud	Toledo	11
Hospital Clínico de Santiago	Santiago de Compostela	8
Hospital Xeral Cies	Vigo	8
Hospital Miguel Servet	Zaragoza	7
Hospital Virgen de la Macarena	Sevilla	7
Hospital Parc Taulí	Sabadell	6
Hospital Infanta Cristina	Badajoz	5
Hospital General Yagüe	Burgos	4
Hospital Sant Pau i de la Santa Creu	Barcelona	4
Complejo Hospitalario Torrecadenas	Almería	4
Centro Hospitalario de Jaén	Jaén	3
Hospital Virgen de las Nieves	Granada	2
Hospital Juan Canalejo	La Coruña	2
Hospital de Albacete	Albacete	2
Hospital Sant Joan de Déu	Barcelona	2
Hospital Nuestra Señora de la Candelaria	Tenerife	1
Hospital Río Ortega	Valladolid	1
Hospital Germans Trias i Pujol	Badalona	1

1.2.- Muestras biológicas

En el periodo mencionado en el apartado anterior se recibieron un total de 2280 muestras distribuidas de la siguiente manera:

-	59	Tumores	(T)
-	1117	Sangres periféricas	(SP)
-	1039	Aspirados de médula ósea	(MO)
-	65	Productos de Leucaféresis	(AF)

Además se utilizaron muestras de sangre periférica y médula ósea procedentes de individuos sanos remitidos al Hospital Universitario La Fe para diferentes controles nunca relacionados con patologías oncológicas.

Las muestras tumorales que se obtuvieron en los quirófanos del Hospital La Fe, se trasladaron en fresco tras la cirugía, al departamento de Anatomía Patológica de inmediato. Tras la separación por parte del anatomopatólogo fueron congeladas en un arcón congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. El resto de muestras tumorales se recibieron por mensajería urgente conservadas en medio de cultivo o congeladas en hielo carbónico. Tras la recepción se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras de sangre periférica, médula ósea y aféresis se recibieron anticoaguladas en tubos con EDTA en fresco. Las muestras procedentes de otros hospitales se recibieron mediante mensajería urgente bien a temperatura ambiente o refrigeradas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas las muestras fueron debidamente clasificadas e identificadas para su posterior localización, procesado y utilización en los diferentes procesos del estudio. Además como controles positivos de células tumorales o RNA tumoral se utilizó la línea celular de neuroblastoma IMR-32.

Las muestras tumorales se recogieron atendiendo a las siguientes recomendaciones establecidas para el almacenaje de tejidos en bancos de tumores:

- No interferir con el diagnóstico anatomopatológico, fenotípico o molecular. Es decir, sólo se almacenó el excedente de tejido no necesario para el correcto diagnóstico y análisis de factores pronósticos en el tumor.
- La toma de la muestra para su almacenaje se realizó por parte de personal especializado. En nuestro caso el anatomopatólogo, encargado del posterior diagnóstico, fue el encargado de la selección, separación y congelación del tejido.

La rapidez en el traslado del tejido tumoral y el procesado previo a la congelación es de vital importancia para la conservación del mismo. La calidad de las muestras depende en gran medida de la rapidez y la forma de obtención, así como el procesamiento y el tipo de transporte hasta el banco

de tumores. Estas variables son especialmente importantes en nuestro caso por la necesidad de obtención de RNA a partir del tejido tumoral.

El resto de muestras biológicas (MO, SP y AF) se recogieron atendiendo a las diferentes recomendaciones internacionales referidas a la recolección en los diferentes momentos del tratamiento, extracción, transporte y conservación. En todos los casos, la toma de las mismas no interfirió en el diagnóstico del paciente ni supuso un proceso adicional de toma de muestras diferente al necesario para el seguimiento marcado por los diferentes protocolos de tratamiento.

A partir del año 2002 en el protocolo HR-NBL1 y posteriormente tras la publicación de la Ley de Investigación Biomédica (Ley 14/2007), para la cesión de las muestras excedentes de diagnóstico, se solicitó consentimiento informado para la utilización de las mismas en los diferentes estudios de investigación.

2.- Extracción de RNA tumoral

La extracción de RNA es un proceso relativamente sencillo pero con una serie de peculiaridades que lo hacen ciertamente especial. La inestabilidad del RNA, por la presencia de enzimas RNasas que lo degradan rápidamente, obliga a tomar una serie de precauciones en todo el proceso. La extracción se debe realizar en un ambiente extremadamente limpio y aséptico, en nuestro caso la extracción se realizó en una campana de flujo laminar para cultivos. Otra precaución es la utilización de material libre de RNasas que se use únicamente para el manejo de RNA, así el material como puntas, pipetas, tubos y soluciones deberán cumplir estas condiciones.

El método de elección para el aislamiento fue la utilización de un Kit comercial, concretamente el RNasy mini kit (*Quiagen*), cuyo protocolo adaptado pasamos a detallar:

2.1.- Toma de la muestra

Un pequeño fragmento de tejido tumoral congelado, fue separado de la pieza principal evitando la descongelación de la misma. La elección del fragmento para el estudio se hizo tras la revisión macroscópica de la pieza con el objetivo de evitar fragmentos hemáticos o necrosados. Es importante para los estudios posteriores que el RNA obtenido sea de la máxima calidad y que proceda, a ser posible, únicamente de tejido tumoral y no de restos de tejido normal, por ello hay que evitar los bordes de la pieza, tejido necrosado y tejido hemático.

2.2.- Disgregación física del tejido y lisis

El fragmento fue depositado en una placa Petri estéril, donde se procedió a la disgregación física del mismo con la ayuda de una hoja de bisturí, añadiendo la solución de lisis directamente a la placa antes de la recogida de la muestra. La solución de lisis, además de producir el lisado tisular, ayuda a la estabilización del RNA.

La lisis celular se realizó con el tampón RLT (*RNasy mini kit; Quiagen*) en presencia de β -mercaptoetanol.

Los lisados tisulares se almacenaron a -80°C para la posterior purificación o se procesaron en el momento.

2.3.- Aislamiento del RNA

A continuación detallamos el protocolo utilizado en nuestro caso siguiendo las recomendaciones del fabricante con alguna modificación:

1. Añadir a 350 μl del lisado celular 350 μl de etanol al 70% libre de RNasas.
2. Mezclar bien y aplicar a la columna.
3. Centrifugar 15 seg a 10.000 rpm.
4. Desechar eluido y añadir 700 μl de RW1.
5. Centrifugar a 10.000 rpm 15 seg.
6. Cambiar la columna a un tubo de elución nuevo.
7. Aplicar 500 μl de RPE con Etanol.
8. Centrifugar 15 seg a 10.000 rpm.
9. Desechar eluido.
10. Aplicar otros 500 μl de RPE.
11. Centrifugar 2 min a 13.000 rpm.
12. Pasar la columna al tubo donde se recoge finalmente el RNA.
13. Aplicar 50 μl de H_2O sin hacer burbujas en la columna.
14. Centrifugar 1 min a 10.000 rpm.
15. Congelar el RNA a -80°C .

3.- Extracción de RNA procedente de sangre periférica, médula ósea y aféresis.

En los tres casos, previo al aislamiento del RNA, era necesario separar las células nucleadas del resto de componentes celulares y no celulares de las muestras. Para este fin realizamos en todos los casos una separación por gradiente de densidades utilizando ficol. Además como en algunos protocolos posteriores se necesitaban células nucleadas intactas este fue el procedimiento elegido también para obtenerlas.

3.1- Separación de células nucleadas por gradiente de densidades: Lymphoprep

Al proceso de separación de células nucleadas con gradientes de ficol lo nombraremos de ahora en adelante con el nombre genérico de lymphoprep. El protocolo utilizado lo detallamos a continuación.

1. Diluir la muestra en un volumen de suero fisiológico en un tubo nuevo (V/V).
2. Añadir un volumen de ficol (*Lymphoprep AXIS-SHIELD PoC AS*) a un tubo nuevo y depositar lentamente la muestra diluida encima del ficol sin que se mezclen las fases.
3. Centrifugar a 800 g durante 20 minutos
4. Recuperar el anillo de células nucleadas con una pipeta pasteur.
5. Lavar con 10 ml de suero fisiológico y dividir la muestra en dos tubos.
6. Centrifugar 10 min a 800 g
7. Desechar el sobrenadante de ambos tubos

Cada uno de los tubos se procesó a partir de este punto de forma diferente.

- Al tubo para la extracción de RNA se le añadieron de 350 a 1000 μ l del tampón de lisis celular RLT del Kit de extracción de RNA mencionado anteriormente, en función de la cantidad de tejido y se transfirió a un criotubo. Tras este paso, se continuó con el aislamiento del RNA o se congeló el lisado a -80 °C.
- El tubo dedicado a la utilización de células intactas se procedió a la disgregación celular en tampón fosfato salino pH 7,4 (PBS) y se reservó para los procesos que más adelante detallaremos.

3.2- Aislamiento del RNA

El aislamiento se realizó siguiendo el mismo protocolo detallado en el apartado 2.3 y con las mismas precauciones para evitar la degradación del RNA.

4.- Retrotranscripción

Para los estudios moleculares de expresión génica basados en análisis por PCR es necesaria la obtención de una cantidad suficiente de cDNA. Este tipo de DNA se generó por retrotranscripción a partir del RNA extraído de los diferentes tejidos. Este proceso se llevó a cabo con el *TF GeneAmp Gold RNA Core Kit (Applied Biosystems)*, siguiendo las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones.

El proceso utilizado se detalla a continuación:

En un tubo eppendorf se preparó la siguiente mezcla de reacción.

Mezcla de reacción	
Tampón (5X)	5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	4 μ l
dNTP's (10 mM)	4 μ l
Ditiotreitol	4 μ l
Hexámeros al azar (50 μ m)	1 μ l
Poli-T (50 μ m)	1 μ l
Inhibidor de RNasas (20 u/ μ l)	1 μ l
MMLV (retrotranscriptasa) (50 u/ μ l)	0,6 μ l
H ₂ O libre de RNasas	6,4 μ l
RNA	10 μ l

Un total de 10 μ l de RNA se añadieron a los 30 μ l de la mezcla anterior para proceder a la retrotranscripción en un volumen total de 40 μ l. El programa empleado para la reacción enzimática fue el siguiente:

25 °C 15 minutos
42 °C 30 minutos

Tras la reacción los tubos se centrifugaron brevemente para llevar al fondo del tubo las gotas evaporadas en la tapa y automáticamente se congelaron a -20 °C.

El cDNA es una molécula poco estable, por esta razón es imprescindible guardarlo siempre a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y disminuir en la medida de lo posible los ciclos de congelación y descongelación.

5.- Detección de la EMR mediante métodos basados en la PCR

En este apartado describiremos los diferentes protocolos aplicados para el estudio de expresión de los genes diana utilizados para la detección de EMR en neuroblastoma. El apartado se ha dividido en dos grandes sub apartados, la detección de los genes diana mediante RT-PCR seguida de Southern Blot y la detección mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

5.1.- Detección mediante RT-PCR seguida de Southern Blot

Tras la retrotranscripción se optimizaron diferentes protocolos de PCR para la detección de los diferentes genes dianas, cada uno de estos protocolos los detallaremos seguidamente.

5.1.1.- PCR de $\beta 2$ -microglobulina

Para comprobar la integridad del RNA aislado, así como el funcionamiento correcto de la retrotranscripción, se procedió en cada uno de los casos a la amplificación mediante PCR de un fragmento de un gen de expresión constitutiva. En nuestro caso se utilizó un fragmento de 333 pares de bases de la $\beta 2$ -microglobulina humana.

Es necesaria la realización de este tipo de estudio en cualquier proceso en el que existan diferentes procesos con efectividades variables individuales, como puede ser tanto la extracción del RNA como la propia retrotranscripción. Además debido a la peculiaridad de nuestro estudio es más necesaria esta comprobación, ya que la ausencia de expresión del resto de genes que planteamos en el estudio ha de deberse a que realmente no existe expresión o está disminuida y no a ausencia de RNA de partida o algún fallo durante la retrotranscripción.

Los cebadores utilizados así como las condiciones de PCR utilizadas se describen a continuación.

Cebadores

Cebador	Secuencia 5' → 3'
BETA2 D	CTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGG
BETA2 R	GCTTACATGTCTCGATCCCACTAAA

Mezcla de reacción

Componentes	Volumen
Tampón (10X <i>Netzime Fermentas</i>)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
dNTP's (10 mM)	0,5 µl
Cebador BETA2 D (10 pmol/µl)	1 µl
Cebador BETA2 R (10 pmol/µl)	1 µl
Taq polimerasa (<i>Netzime Fermentas</i> 5 U/µl)	0,2 µl
cDNA	1,5 µl
H ₂ O hasta 25 µl	17,55 µl

Programa de PCR:

95 °C 3 minutos

95 °C 30 segundos
 59 °C 30 segundos
 72 °C 30 segundos } x 35 ciclos

72 °C 7 minutos

El producto amplificado se visualizó en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio tal y como detallaremos posteriormente.

5.1.2.- PCR de TH

Cebadores

Cebador	Secuencia 5'→3'
TH D	TGTCAGAGCTGGACAAGTGT
TH R	GATATTGTCTTCCCGGTAGC

Mezcla de reacción

Componentes	Volumen
Tampón (10X Roche con MgCl ₂)	2,5 µl
dNTP's (10 mM)	0,5 µl
Cebador TH D (10 pmol/µl)	1 µl
Cebador TH R (10 pmol/µl)	1 µl
Taq polimerasa (Taq polimerasa Roche 5 U/µl)	0,2 µl
cDNA	1,5 µl
H ₂ O hasta 25 µl	18,3 µl

Programa de PCR:

95 °C 3 minutos

95 °C 45 segundos
59 °C 45 segundos
72 °C 30 segundos } x 35 ciclos

72 °C 7 minutos

El producto amplificado de 299 pares de bases se visualizó en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio tal y como detallaremos posteriormente.

5.1.3.- PCR de *MAGE-A1*

Cebador	Secuencia 5' → 3'
MAGE1 D	CGGCCGAAGGAACCTGACCCAG
MAGE1 R	GCTGGAACCTCACTGGGTTGCC

Mezcla de reacción

Componentes	Volumen
Tampón (10X Tampón Gold)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
dNTP's (10 mM)	0,5 µl
Cebador MAGE1 D (10 pmol/µl)	1 µl
Cebador MAGE1 R (10 pmol/µl)	1 µl
Taq polimerasa (Taq Gold <i>Applied Biosystems</i> 5 U/µl)	0,2 µl
cDNA	1,5 µl
H ₂ O hasta 25 µl	17,3 µl

Programa de PCR:

95 °C 5 minutos

95 °C	30 segundos	} x 35 ciclos
58 °C	45 segundos	
72 °C	1 minuto	

72 °C 7 minutos

El producto amplificado de 421 pares de bases se visualizó en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio tal y como detallaremos posteriormente.

5.1.4.- PCR de *MAGE-A3*

Cebador	Secuencia 5' → 3'
MAGE3 D	GAAGCCGGCCCAGGCTCG
MAGE3 R	GGAGTCCTCATAGGATTGGCTCC

Mezcla de reacción

Componentes	Volumen
Tampón (10X Tampón Gold)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
dNTP's (10 mM)	0,5 µl
Cebador MAGE3 D (10 pmol/µl)	1 µl
Cebador MAGE3 R (10 pmol/µl)	1 µl
Taq polimerasa (Taq Gold <i>Applied Biosystems</i> 5 U/µl)	0,2 µl
cDNA	1,5 µl
H ₂ O hasta 25 µl	17,3 µl

Programa de PCR:

95 °C 5 minutos

95 °C 30 segundos
59 °C 45 segundos
72 °C 45 segundos } x 35 ciclos

72 °C 7 minutos

El producto amplificado de 423 pares de bases se visualizó en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio tal y como detallaremos posteriormente.

5.1.5.- PCR de GAGE

La detección de los genes de la familia *GAGE* se realizó utilizando tres juegos de cebadores diferentes. Por una parte se amplificaron todos los genes simultáneamente (*GAGE 1 a 8*) utilizando la combinación de cebadores GAGEND y GAGENr. Por otra parte, la amplificación de los miembros *GAGE 1*, *GAGE 2* y *GAGE 8* que presentan una alta homología se realizó utilizando los cebadores GAGE(A)d y GAGENr. Finalmente la detección de los genes *GAGE 3 a GAGE 7* se realizó con los cebadores GAGE(B)d y GAGENr. Destacar que la secuencia amplificada de los 8 miembros de la familia es idéntica excepto tres nucleótidos que se degeneraron en el diseño y la síntesis del cebador GAGEND (Figura 18).

Las secuencias de los cebadores utilizados y las condiciones de PCR se detallan a continuación. Las bases divergentes entre los grupos están subrayadas.

Cebador	Secuencia 5' → 3'
GAGEND	5'GAC CAA G(A/G)C GCT A(C/T)G TA(G/C)AGC CT 3'
GAGENr	5'CCT GCC CAT CAG GAC CAT CTT CA 3'.
GAGE(B)d	5'GACCAAGGCGCTA <u>T</u> GTA <u>C</u> AGCCT 3'
GAGE(A)d	5'GACCAAG <u>A</u> CGCTA <u>C</u> GTA <u>G</u> AGCCT 3'

Mezcla de reacción

Componentes	Volumen
Tampón (10X Tampón Gold)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
dNTP's (10 mM)	0,5 µl
Cebador D (10 pmol/µl)	1 µl
Cebador R (10 pmol/µl)	1 µl
Taq polimerasa (Taq Gold <i>Applied Biosystems</i> 5 U/µl)	0,2 µl
cDNA	1,5 µl
H ₂ O hasta 25 µl	17,3 µl

Programa de PCR:

95 °C 5 minutos

95 °C 45 segundos
65 °C 60 segundos
72 °C 30 segundos } x 40 ciclos

72 °C 7 minutos

La polimerasa utilizada fue una polimerasa HotStart suministrada en el kit de retrotranscripción *Gene Amp Gold Core Kit; Applied Biosystems*, el tampón de PCR fue el Gold suministrado con la polimerasa.

El producto amplificado de 249 pares de bases se visualizó en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio tal y como detallaremos posteriormente.

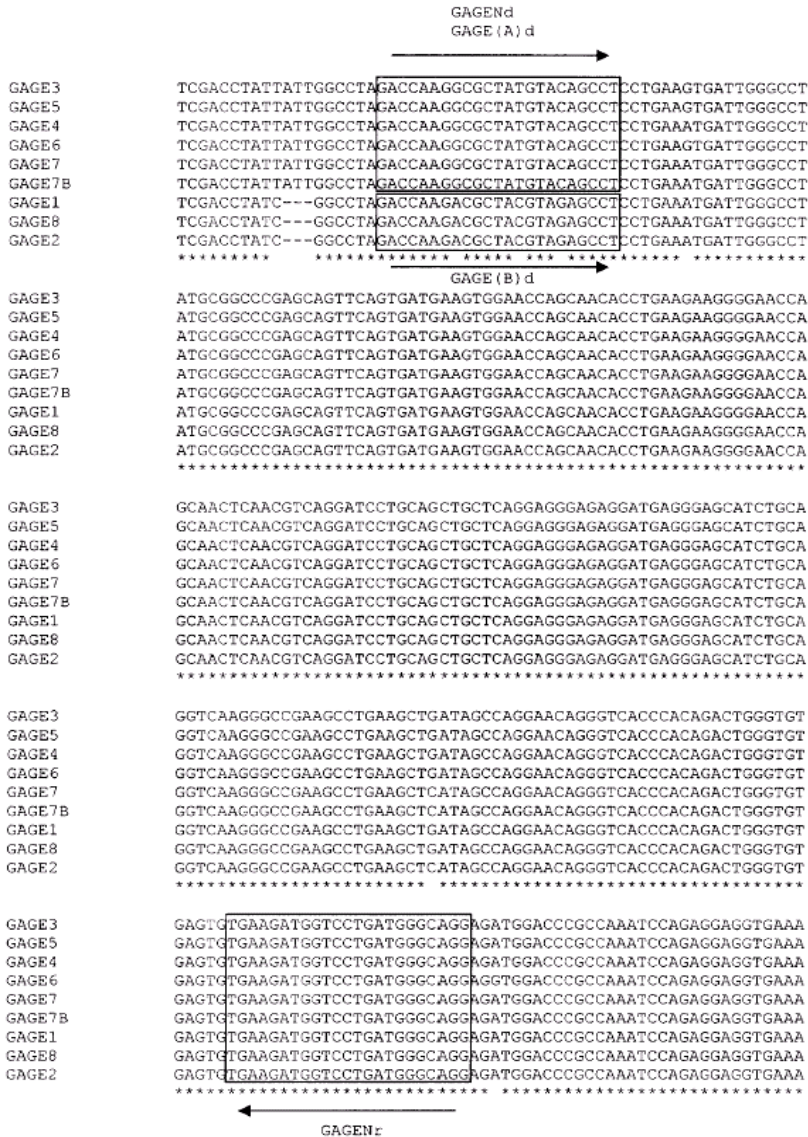


Figura 18: alineamiento de los genes de la familia GAGE. Los cebadores descritos en la tabla se señalan en el alineamiento.

5.2.- Southern blot

Con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad de los estudios se procedió en todos los casos a la transferencia de los productos de PCR separados mediante electroforesis en geles de agarosa mediante la técnica de Southern blot.

En cada amplificación de los diferentes marcadores se incluyeron controles negativos y controles positivos (cDNA procedente de la línea celular IMR-32). Además en cada electroforesis se incluyó un control de sensibilidad preparado con una dilución 1/10.000 del producto de PCR correspondiente a cada marcador amplificado a partir de una muestra tumoral diluida en un tampón que contenía DNA de esperma de salmón (50 ng/ml).

Las sondas para la hibridación se obtuvieron a partir de un marcaje por PCR de los productos específicos de cada marcador utilizando dUTP unido a digoxigenina previamente secuenciados. Los protocolos de marcaje y secuenciación se describen posteriormente.

5.2.1.- Electroforesis en geles de agarosa

En este apartado describiremos la utilización de geles de agarosa que se utilizaron tanto para la comprobación de la PCR de *β 2-microglobulina* como para las electroforesis preparativas para la realización del Southern blot del resto de genes.

Los geles utilizados fueron, salvo excepciones, a una concentración del 1% en tampón TBE. Las electroforesis se realizaron a 100V durante 2 horas en cubetas horizontales usando como tampón electroforético también TBE. Tras la electroforesis se procedió a la tinción de los geles en un tampón TBE con bromuro de etidio, tras lo cual se observaron y fotografiaron exponiéndolos a una fuente de luz ultravioleta.

5.2.2.- Transferencia

Desnaturalización y neutralización

El gel de agarosa se sometió a un tratamiento con una solución desnaturalizante (Solución A) y una solución neutralizante (Solución B).

- 1 lavado de 30 minutos en agitación en Solución A
- 1 lavado de 30 minutos en agitación en Solución B

Montaje del Southern blot

Tras los lavados se procedió a la transferencia según el esquema de la figura 19. Como tampón de transferencia se utilizó SSC 20X y la membrana utilizada fue una membrana de nylon cargada positivamente de *Boehringer Mannheim*.

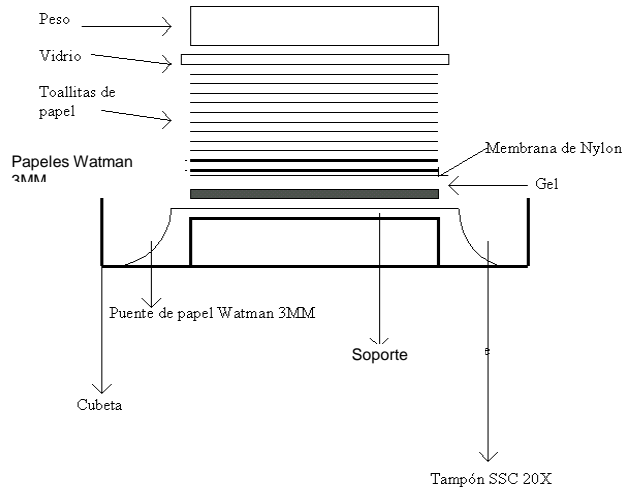


Figura 19: Esquema del dispositivo de transferencia.

La transferencia se dejó aproximadamente durante 16 horas.

Fijación

Después de la transferencia los filtros se lavaron brevemente en SSC 2X y se dejaron secar 5 minutos a 80 °C. Inmediatamente se fijaron calentándolos ½ hora a 120 °C en un horno seco.

5.2.3.- Prehibridación e hibridación

Prehibridación

Los filtros se colocaron en tubos de hibridación en contacto con la solución de hibridación al menos durante 4 horas a 42 °C en un horno de hibridación en rotación constante.

Hibridación

La hibridación también se realizó a 42 °C durante 12-16 horas. Las sondas se desnaturalizaron 10 minutos a 95 °C y luego se enfriaron en hielo 3 minutos antes de añadir las al tubo de hibridación.

5.2.4.- Lavados y detección

El protocolo de lavados y detección utilizado fue el recomendado por *Boehringer Mannheim* con modificaciones. El método de detección utilizado fue el quimioluminiscente para conseguir una mayor sensibilidad de detección de la hibridación.

1. 2 lavados de 5 minutos en agitación con la solución:
Sol. Primer lavado: SSC 2X + SDS 0.1%
2. 2 lavados de 15 minutos a 65 °C y agitación con la solución:
Sol Segundo lavado: SSC 0.5X + SDS 0.1%
3. Equilibrar 2 minutos con la solución de Detección 1
4. Incubación durante ½ hora con la solución de Detección 2
(Detección 1 con 0,5% de agente de bloqueo)
5. Incubación durante ½ con solución de Detección 2 con anticuerpo anti-digoxigenina
6. 2 lavados de 15 minutos en agitación con la solución de Detección 1 con tween 20
7. Equilibrar 1 minuto la membrana con solución de Detección 3
8. Incubación durante 5 minutos con la solución de detección 3 con el sustrato CDP-Star

Tras los lavados se eliminó el exceso de humedad a la membrana, se selló en una bolsa de plástico y se puso en contacto con dos películas de rayos X. Las películas se dejaron aproximadamente 2 horas antes del revelado. Los revelados se realizaron en procesadoras automáticas de placas de rayos X.

5.2.5.- Marcaje de las sondas

Para el marcaje de las sondas se utilizó el método de la incorporación de digoxigenina-11-dUTP al DNA de la sonda mediante la amplificación por PCR. En cada una de las sondas preparadas (*TH*, *MAGE-A1*, *MAGE-A3* y *GAGE*) se utilizaron las condiciones de PCR descritas en el apartado 5.1 con la salvedad que se utilizó una mezcla de dinucleótidos con el dUTP (dATP, dCTP, dGTP 100µM, dTTP 65µM y digoxigenina-11-dUTP 35µM). Como DNA molde se utilizó 1 µl del producto de PCR de cada amplificado

procedente de un amplificado previamente secuenciado mediante secuenciación directa para comprobar la especificidad del mismo.

La comprobación del marcaje se hizo mediante la técnica de retraso en gel de agarosa. Esta técnica se basa en observar el retraso en la migración durante la electroforesis de las moléculas marcadas de DNA debido a la incorporación del digoxigenina-11-dUTP.

Tras la comprobación se purificó la sonda mediante precipitación y se incorporó a la solución de hibridación.

Soluciones

<p>Gel de agarosa al 1%:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 gr de agarosa - 100 ml TBE 1X. 	<p>Tampón de carga 6X:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 0,05% de azul de bromofenol - 100 mM EDTA 0,5 M pH 8.0 - 50% glicerol
<p>TBE 1X:</p> <p>Se utilizó como tampón de electroforesis, tampón de tinción con BrEt y para la preparación de los geles de agarosa.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 89 mM Tris - 89 mM Ácido Bórico - 2 mM EDTA 	<p>Bromuro de Etidio:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 0,5 µg/ml en TBE
<p>Solución A</p> <ul style="list-style-type: none"> - NaCl 1,5 M - NaOH 0,5 M 	<p>Solución B</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tris-HCl 0,5 M - NaCl 3M
<p>SSC 20X</p> <ul style="list-style-type: none"> - NaCl 175,32 gr - Citrato sódico 88,2 gr - H₂O hasta 1 litro 	<p>Solución de hibridación</p> <ul style="list-style-type: none"> - SSC 5X - Formamida desionizada 50% (V/V) - Agente de bloqueo (<i>Blocking Roche</i>) 5% - N-lauroilsarcosina 0,1% - SDS 0,02%
<p>Detección 1</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tris-HCl 100 mM pH 7,5 - NaCl 150 mM 	<p>Detección 1 con Tween 20</p> <ul style="list-style-type: none"> - 0,3% Tween 20 en Detección 1
<p>Detección 2</p> <ul style="list-style-type: none"> - Agente de bloqueo (<i>Blocking Roche</i>) 0,5 % en tampón de Detección 1 	<p>Anticuerpo anti-digoxigenina</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dilución 1/5000 en solución de Detección 2
<p>Detección 3</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tris-HCl 100 mM pH 9,5 - NaCl 100 mM 	<p>CDP (<i>Roche</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dilución 1/100 en solución de detección 3

5.3.- Detección mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real

El método utilizado para este ensayo fue la cuantificación relativa, por ello además de los genes problema *TH* y *DCX* se utilizó el gen de expresión constitutiva *gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPD)*. La PCR cuantitativa se realizó mediante el uso de sondas TaqMan-MGB® (*Applied Biosystems*). Estas sondas están formadas por oligonucleótidos de 20 a 25 bases que llevan un fluorocromo en uno de sus extremos y un secuestrador de fluorescencia en el extremo opuesto. Esta construcción sintética impide la emisión de fluorescencia mientras la sonda está intacta. Además en la mezcla de la sonda van incluidos los cebadores de la PCR del fragmento que se va a amplificar. La sonda es complementaria al centro del fragmento que se pretende detectar y cuando la polimerasa, que posee actividad 5'→3' exonucleasa, llega a la posición de la misma, comienza a degradarla. Esto hace que el fluorocromo se separe físicamente del secuestrador y pueda emitir su fluorescencia. La fluorescencia emitida será directamente proporcional a la cantidad de producto sintetizado. La ventaja que presentan este tipo de sondas es la alta especificidad, ya que si la sonda presenta algún desapareamiento al llegar la polimerasa saltará de su sitio de unión sin ser degradada y no se emitirá fluorescencia. En la figura 20 mostramos un esquema del proceso.

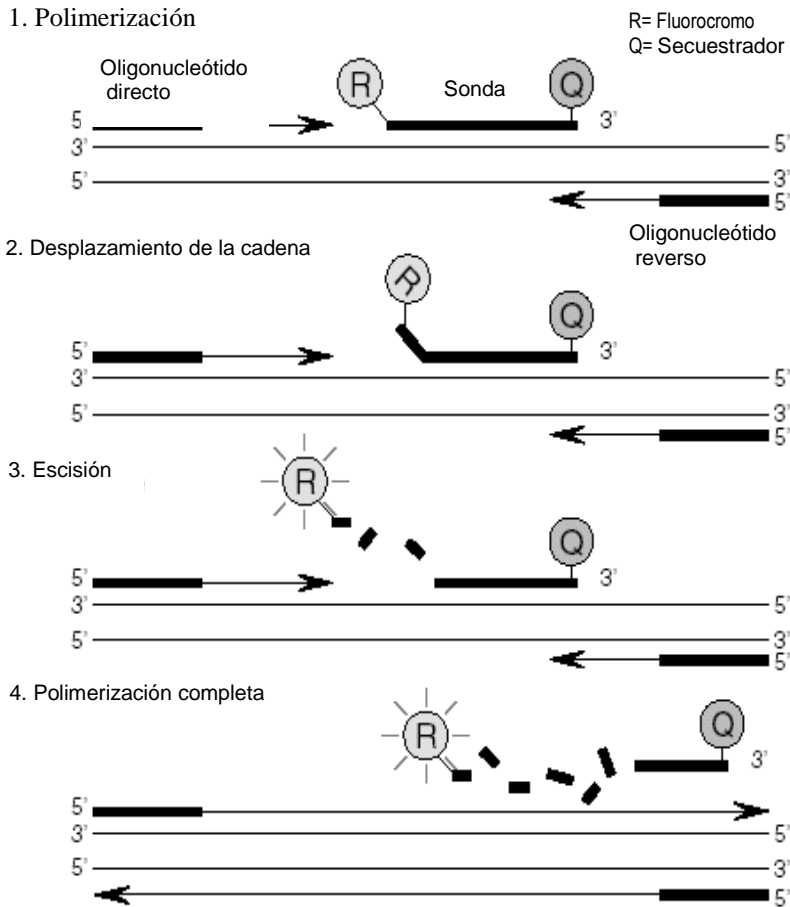


Figura 20: PCR cuantitativa fluorescente en tiempo real con sondas TaqMan. 1. La sonda TaqMan, con el fluorocromo en un extremo y el secuestrador en el otro aparece con el fragmento que se desea amplificar. 2. Cuando la polimerasa alcanza la posición en la que hibrida la sonda, su actividad exonucleasa 5'→3' comienza a degradarla. 3. Esta degradación permite que el fluorocromo se separe físicamente del secuestrador, pudiéndose registrar su fluorescencia. 4. La polimerasa completa su elongación y puede comenzar un nuevo ciclo.

5.3.1.- Protocolo de amplificación

Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando la mezcla de reacción *TaqMan Universal Master Mix* (5 mM MgCl₂; 200 mM de cada nucleótido dATP, dCTP, dGTP y dUTP; 0.05 unidades/ml AmpliTaq Gold DNA polimerasa y 0.01 unidades/ml AmpErase UNG) (*Applied Biosystems*), que incluye todos los reactivos necesarios excepto las sondas TaqMan®, los cebadores y el cDNA. Las sondas TaqMan® MGB contienen tanto la sonda a una concentración de 5 nM como los cebadores a una concentración de 18 nM. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante.

Todas las muestras se amplificaron por duplicado para cada marcador, excepto en el caso de las curvas de calibración donde la amplificación fue por triplicado.

Sondas

Las sondas y cebadores utilizados pertenecen a la colección de ensayos de expresión génica diseñados por *Applied Biosystems*. Dichos ensayos conocidos por el nombre de *Assays-on-Demand™*, están diseñados para evitar la amplificación de DNA genómico colocando la sonda en el punto de unión entre dos exones y son previamente probados para comprobar su eficacia de amplificación en las condiciones estándar propuestas para todos estos ensayos.

La secuencia de los cebadores y de las sondas no está públicamente disponibles, por lo que solamente daremos el número de referencia de los mismos.

Assays-on-Demand™	Gen
Hs99999905_m1	<i>GAPD</i>
Hs00165941_m1	<i>TH</i>
Hs00167057_m1	<i>DCX</i>

Mezcla de reacción

Componentes	Volumen
Mix (2X)	12,5 µl
Sonda TaqMan (20X)	1,25 µl
cDNA	1,5 µl
H ₂ O hasta 25 µl	9,75

Programa de PCR:

50 °C 2 minutos
95 °C 10 minutos
95 °C 15 segundos } x 50 ciclos
65 °C 1 minuto }

5.3.2.- Análisis de los resultados

El método utilizado para el análisis fue la cuantificación relativa por comparación del valor C_T . En nuestro caso se compararon los valores de C_T de los dos genes problema (*DCX* y *TH*) frente al gen de expresión constitutiva (*GAPD*).

Los *Assays-on-Demand*TM según las directrices del fabricante están diseñados para que la eficiencia en la amplificación sea cercana a 1. Esto significa que la cantidad de diana normalizada respecto de una referencia endógena y relativa al calibrador viene dada por la ecuación:

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

Donde:

$$\Delta C_T = C_T (\text{marcador}) - C_T (\text{GAPD})$$

Como la aplicación del método está condicionada a que las eficiencias en la amplificación de la diana y la referencia sean prácticamente iguales, este punto se comprobó analizando la variación de ΔC_T en función de la dilución de la muestra. Al haberse realizado para cada sonda una amplificación con 3 réplicas de 5 diluciones diferentes, se calculó la media de C_T para cada dilución, tanto para los genes problema como para *GAPD*, obteniendo el valor de ΔC_T . La pendiente de la recta de regresión que pasa por dichos puntos debe ser lo más próxima a 1. Si su valor absoluto es menor de 0,1, puede aplicarse el método que hemos descrito.

6.- Secuenciación

La secuenciación fue el método de elección para comprobar los productos de PCR que se utilizaron con posterioridad para elaborar las sondas necesarias en los experimentos de hibridación de las membranas del Southern blot.

El método de secuenciación utilizado está basado en el método de los didesoxinucleótidos (método de Sanger). El kit utilizado fue el *BigDye terminator 1.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems)*, que incorpora en una única mezcla todos los componentes necesarios para la secuenciación, excepto el DNA y el cebador. En esta mezcla se incluyen los cuatro desoxirribonucleótidos (dNTPs) al 90% y una mezcla de didesoxirribonucleótidos (ddNTPs) al 10%, marcados con 4 flourocromos diferentes, una polimerasa y el tampón de reacción.

6.1.- Purificación de la reacción de PCR

Previamente a la realización de la reacción de secuenciación, se necesita purificar los productos de PCR que se quieren secuenciar. Con dicho proceso se eliminan los restos de dNTPs sobrantes y secuencias de DNA de cadena sencilla (restos de oligonucleótidos). El método utilizado fue la reacción enzimática con el enzima ExoSap IT (*USB corporation*). Dicha enzima contiene una exonucleasa I y una fosfatasa alcalina. El protocolo utilizado fue el siguiente:

Mezcla de reacción:

2 μ l de ExoSap

8 μ l de producto de PCR

Incubación:

15 minutos a 37 °C

15 minutos a 80 °C

6.2.- Reacción de secuenciación

La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente:

Reactivos	Cantidad
PREMIX	2 μ l
Producto de PCR purificado (10-30 ng/ μ l)	5 μ l
Primer	3,2 pmoles (1 μ l)
Tampón	2 μ l

Programa de PCR

94 °C 3 minutos

96 °C 10 segundos
50 °C 6 segundos
60 °C 4 minutos } x 25 ciclos

6.3.- Purificación.

Existen diferentes métodos de purificación, en nuestro caso se utilizó la precipitación. En este proceso se consiguen eliminar los restos de sales oligonucleótidos y fluorocromos no incorporados previamente a la electroforesis.

Precipitación con etanol y acetato sódico:

1. Añadir a los 10 μ l de la reacción de secuenciación 40 μ l de H₂O para aumentar el volumen.
2. Transferir todo el volumen a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
3. Añadir 5 μ l de AcNa 3M pH=5,2 y 100 μ l de Etanol absoluto
4. Centrifugar 20 minutos a 13.000 rpm
5. Eliminar totalmente el sobrenadante.
6. Lavar con 250 μ l de etanol al 70%.
7. Centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm.
8. Eliminar totalmente el sobrenadante.
9. Secar.

6.4.- Electroforesis capilar.

A las reacciones de secuenciación se les añadió 25 μ l de TSR (*Template Supresión Reagent*) y se desnaturalizaron a 95°C durante 3 minutos enfriándolas posteriormente en hielo. La electroforesis capilar se realizó en el secuenciador automático ABI 310 de *Applied Biosystems* en condiciones estándar.

Tras la electroforesis las secuencias fueron examinadas y procesadas con la ayuda del programa *Sequencing Analysis* (*Applied Biosystems*).

7.- Análisis de secuencias.

Las secuencias se obtuvieron en dos formatos diferentes, el electroferograma y la secuencia en formato texto. Tras el análisis de los electroferogramas se procedió al alineamiento de las mismas con las secuencias consenso de las bases de datos. El algoritmo utilizado fue el BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI.

8.- Inmunocitología

La inmunocitología fue otro de los métodos empleados en nuestro caso para la detección de micrometástasis en neuroblastoma. En esta sección describiremos el procedimiento técnico de la hibridación con el anticuerpo GD2 así como los criterios utilizados para la interpretación de los resultados.

8.1.- Preparación de los citoextensiones

Como ya explicamos en el apartado 3.1 de esta sección, tras la separación de las células nucleadas de la sangre periférica, médula ósea o leucaféresis, se reservó una parte de las mismas disgregadas en tampón PBS. Estas células las destinamos a la preparación de las extensiones celulares para su posterior inmunotinción con el anticuerpo anti-GD2 descrito en los antecedentes.

Se realizó un conteo de células disgregadas en PBS utilizando una cámara cuentaglobos Bürker siguiendo las recomendaciones del fabricante. Tras el conteo y la estimación de la concentración se diluyeron a una concentración de 10^6 células por mililitro.

Tras la dilución se procedió a realizar las extensiones utilizando una citocentrífuga. Este proceso nos permite, mediante centrifugación, extender un número conocido de células de manera homogénea. En nuestro caso se procedió a centrifugar 1 ml de la suspensión celular (10^6 células totales) en un área de 17 mm de diámetro. Tener las células concentradas en un área pequeña y localizada es muy importante tanto desde el punto de vista técnico (permite el ahorro de reactivos y conocer en todo momento la localización de las células) como desde el punto de vista de observación al microscopio (nos permite recorrer de manera más sencilla el área de observación y tener en ella todas las células concentradas).

La citocentrifugación se hizo en una centrífuga *Hettich* durante 7 minutos a 7500 rpm. Los citospines (llamaremos así a las extensiones) se dejaron secar durante toda la noche a temperatura ambiente. Si la hibridación se iba a realizar en menos de una semana las preparaciones se reservaban a temperatura ambiente, en caso contrario se congelaron a -20 °C para su correcta conservación.

8.2.- Fijación

Las células nucleadas se fijaron con paraformaldehído al 4% preparado en PBS pH 7,2-7,4 durante 10 minutos. Las fijaciones se realizaron individualmente en horizontal para evitar la posible contaminación que supone una fijación en una jarra coplin. La utilización del paraformaldehído es importante ya que otros fijadores no conservan la morfología nuclear intacta necesaria para la correcta interpretación de los resultados.

8.3.- Inmunotinción

La inmunotinción se realizó en cámara húmeda durante todo el proceso colocando las preparaciones en horizontal encima de barras de vidrio paralelas. Se inmunotiniéron 2 preparaciones de cada caso y un control negativo del mismo al que no se le añadió anticuerpo primario. El proceso lo detallamos a continuación.

1. Lavar durante 5 minutos 2 veces con PBS.
2. Incubar 30 minutos con el anticuerpo primario anti-GD2 (anticuerpo ratón anti-GD2 14.G2a *BD Pharmigen*) diluido 1/100 en BSA/PBS al 1% a temperatura ambiente. Para el ahorro de anticuerpos se procedió a cubrir con parafilm el área de hibridación y así extender correctamente una cantidad mínima del mismo (50µl).
3. Lavar durante 5 minutos 2 veces con TBS.
4. Incubar con el anticuerpo secundario conejo anti-ratón (*DAKO*) diluido 1/20 en BSA/PBS durante ½ hora.
5. Lavar durante 5 minutos 2 veces con TBS.
6. Incubar durante ½ hora con el complejo asociado a la fosfatasa alcalina APAAP (*DAKO*) diluido 1/20 en BSA/PBS.
7. Lavar durante 5 minutos 2 veces con TBS.
8. Incubar 15 minutos con el sustrato (*Fuchsin+™ Substrate Chromogene System DAKO*). El sustrato se debe preparar previamente dejándolo activar durante 1 minuto y se debe utilizar durante los 30 minutos siguientes a su preparación.
9. Lavar 5 minutos en agua destilada y agitación
10. Contrastar con hematoxilina durante 5 minutos
11. Lavar con agua
12. Montar las preparaciones con una resina acuosa.

Soluciones

TBS (Tampón Tris-HCl salino 0,95 M pH 7,4)

Solución I: 18,0 g Tris
17,4 g NaCl
Hasta 3000 ml H₂O
Ajustar el pH hasta 7,4 con HCl

Solución II: 200 ml solución I + 800 ml de suero salino
(0,9 % NaCl)

Guardar las soluciones entre 2-8 °C.

BSA/PBS

300 ml de PBS
3 gr de albúmina sérica bovina (*Sigma*)
0,3 gr de azida sódica

8.4.- Evaluación de los resultados

La inspección de los citospines inmunoteñidos se hizo a microscopía óptica convencional. La observación consistió en la valoración del área total de cada una de las preparaciones previo visualizado del control negativo de las mismas. Se contaron el total de células inmunoteñidas (células tumorales) que cumplían los criterios que detallamos seguidamente.

Criterios de inclusión:

- Morfología:
 - núcleos redondos
 - cromatina granular
 - citoplasma pequeño
- Inmunotinción
 - Señal intensa
 - Alrededor de la membrana
 - No debe enmascarar el núcleo
 - No puede restringirse a compartimentos subcelulares

Criterios de exclusión:

- Células positivas fuera del área del citospín.
- Células rodeadas por material amorfo teñido positivamente.

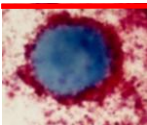
9.- Análisis Estadístico.

En el análisis de los resultados se utilizaron diferentes métodos estadísticos. El test χ^2 (Chi-cuadrado) para comparar diferencias de proporciones entre grupos. El cálculo de la pendiente, la intersección con el eje Y y el coeficiente de correlación en la obtención de las curvas estándar realizadas para *TH*, *DCX* y *GAPD*. Cálculos de medias, medianas y desviaciones típicas y la correlación de Pearson en los conjuntos de valores cuantitativos. Por otra parte, se utilizó el test de la t de Student para comparar las diferencias entre las medias de los valores de PCR cuantitativa obtenidos en diferentes momentos del tratamiento.

Para la realización y comparación de las curvas de supervivencia se empleó el método de Kaplan-Meier, utilizando como valor de significatividad del test el estadístico Log-Rang inferior a $p=0,05$ para la identificación de diferencias significativas entre los grupos. En este sentido, también se utilizó la regresión de COX mediante inclusiones sucesivas de variables y un nivel de significación inferior a $p=0,05$ para evaluar la posible independencia de variables clínicas y biológicas de la enfermedad conocidas, junto con la presencia/expresión de alguno de los marcadores estudiados.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS 15.0 y SPSS 17.0 en entorno Windows.

Resultados



V.- Resultados

1.- Introducción

En el diseño de cualquier trabajo de investigación uno de los primeros pasos es el planteamiento de los posibles objetivos que se desean alcanzar. En nuestro caso, tal y como planteamos anteriormente, los objetivos se centraron en:

- La evaluación de diferentes aproximaciones técnicas para la detección de células tumorales en médula ósea y sangre periférica.
- La valoración de la sensibilidad y especificidad de diferentes marcadores previamente descritos.
- La búsqueda y validación de nuevas dianas de detección.
- La evaluación del significado clínico de la detección de dichas dianas en los diferentes tejidos estudiados y en los diferentes momentos de la enfermedad.

Para abordar los objetivos más metodológicos, se decidió en un primer término, elegir múltiples dianas ya descritas como marcadores de enfermedad metastática, la búsqueda y validación de nuevas dianas y la utilización de diferentes técnicas de detección. Los marcadores elegidos inicialmente fueron *MAGE-A1*, *MAGE-A3*, *GAGE* y *TH* utilizando como técnica de detección la RT-PCR y el gangliósido GD2 detectado mediante inmunocitología. La metodología utilizada para la detección inmunocitológica se mantuvo a lo largo de todo el estudio, sin embargo, en la detección de células tumorales mediante RT-PCR se cambió el sistema de detección desde una primera aproximación mediante Southern blot a la detección mediante PCR cuantitativa fluorescente en tiempo real, por ser mucho más automatizable, sencilla y sensible.

A lo largo del presente apartado se desgranarán los diferentes resultados obtenidos para el abordaje de los objetivos planteados. De esta manera, se plantearán los resultados en diferentes bloques. Un primer bloque estará orientado a la descripción y validación de los marcadores y las técnicas utilizadas a lo largo del trabajo, un segundo bloque centrado en estudio de las diferentes dianas en tumor primario y un último bloque centrado en el estudio del valor pronóstico de la detección de EMR en los diferentes grupos de pacientes y momentos de la enfermedad.

2.- Validación de los marcadores para el estudio de EMR

Como ya comentamos en la introducción (apartado 2.6.4), los marcadores para la detección de EMR deben cumplir una serie de condiciones. En todos los casos los primeros experimentos, tras la puesta a punto de la técnica de

detección, fue la validación de los mismos comprobando que cumplían dichos criterios.

2.1.- Descripción de *DCX* como marcador de EMR en neuroblastoma.

Nuestra propia experiencia, junto con los datos publicados en la bibliografía cuando iniciamos este estudio, nos llevó a marcarnos como objetivo la búsqueda de nuevos marcadores de EMR en neuroblastoma. Los datos bibliográficos consultados, mostraban que se estaban utilizando diferentes dianas en los estudios de células circulantes en neuroblastoma. Estos marcadores eran *MAGE-A1*, *MAGE-A3*, *GAGE*, *TH*, *PGP9.5*, etc, pero sólo *TH* parecía ser idóneo para este tipo de estudios. No obstante, la heterogeneidad tumoral ponía de manifiesto la necesidad de la utilización de más de un marcador para no basar el diagnóstico (la existencia de micrometástasis) en un único dato. Se realizó una búsqueda de nuevos marcadores que cumplieran una serie de condiciones como tener un patrón de expresión específico de células nerviosas en migración y que no tuvieran expresión en los tejidos diana de nuestro estudio (sangre periférica y médula ósea).

Uno de los genes que resultó cumplir estos criterios fue *DCX*. El estudio mutacional de este gen ya se realizaba en nuestro laboratorio en casos de lisencefalia ligada al cromosoma X en varones o en casos de heterotopia laminar subcortical en mujeres. Los conocimientos previos que se tenían del gen nos animaron a intentar validar su utilización como marcador de EMR en neuroblastoma.

Las pruebas de especificidad, número de tumores que expresaban dicho gen y el nivel de expresión del mismo se muestran en los siguientes apartados junto con la validación del resto de marcadores utilizados a lo largo del trabajo.

2.2.- Especificidad de los marcadores

Para comprobar la especificidad de las diferentes dianas, estudiamos series de muestras procedentes de individuos control, con el fin de comprobar que no se expresaban en las mismas.

En el caso de la detección mediante RT-PCR/Southern, que fue la primera técnica puesta a punto, utilizamos 35 muestras de sangre periférica procedentes de individuos sanos remitidos al hospital para diferentes controles (cirugías menores, controles de salud rutinarios, etc.) y nunca relacionados con posibles patologías neoplásicas. A dichas muestras se les aplicó la técnica que posteriormente se utilizó en las muestras de pacientes con neuroblastoma. De forma resumida, se realizó la separación de células

mononucleadas, extracción de RNA, retrotranscripción, amplificación mediante PCR utilizando cebadores específicos para cada marcador y Southern blot utilizando como sonda el mismo producto de PCR previamente secuenciado y marcado con digoxigenina-dUTP.

En el caso de *TH*, *MAGE-A1* y *MAGE-A3* ninguna de las muestras control mostró expresión residual de estos genes por lo que se consideraron *a priori* potenciales candidatos para el estudio de EMR en neuroblastoma.

En el caso del gen *GAGE* el resultado fue diferente, se detectó la expresión de estos genes en 20 de las 35 muestras utilizadas (59%) (Figura 21). En un apartado posterior profundizaremos sobre la expresión de los mismos tanto en muestras control como en una serie de muestras procedentes de pacientes con neuroblastoma.

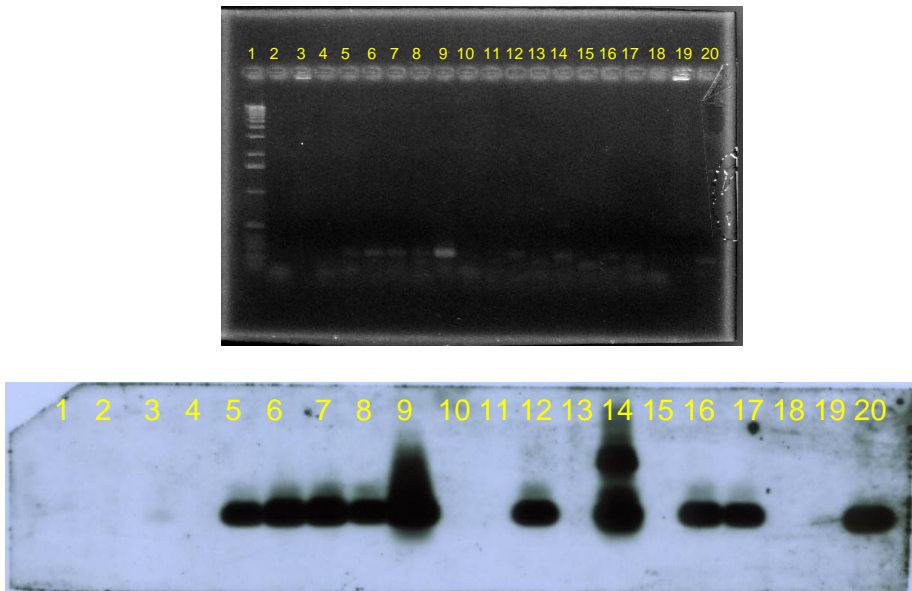


Figura 21: Gel de agarosa y Southern blot tras la amplificación mediante RT-PCR de los genes *GAGE* de 15 muestras de sangre periférica procedentes de controles sanos. Carrera 1: marcador de pesos moleculares; carrera 2: control negativo de la PCR; carreras 3 y 19: dilución 1/10.000 del producto de PCR obtenido a partir de una muestra tumoral diluida en un tampón que contiene ADN de esperma de salmón (50ng/ μ l); carreras 4-18: muestras procedentes de controles sanos; carrera 20 control positivo.

Cuando la detección se realizó mediante RT-PCR cuantitativa (*DCX* y *TH*) la metodología utilizada fue la misma que hemos resumido anteriormente excepto la amplificación por PCR y la detección de los productos amplificados. En este caso, como se describe en el apartado de metodología, la amplificación se realizó en un termociclador diseñado para la detección mediante fluorescencia de los productos de PCR en tiempo real. Los controles de *TH* se repitieron ya que el fragmento amplificado era diferente y porque se pensaba que la sensibilidad de la técnica podía ser mayor.

En esta ocasión se utilizaron un total de 34 muestras control de sangre periférica y 7 muestras de médula ósea, procedentes de individuos sanos.

En ninguno de los casos se evidenció expresión de *TH* ni de *DCX* en las muestras de sangre periférica y médula ósea estudiadas (Figura 22).

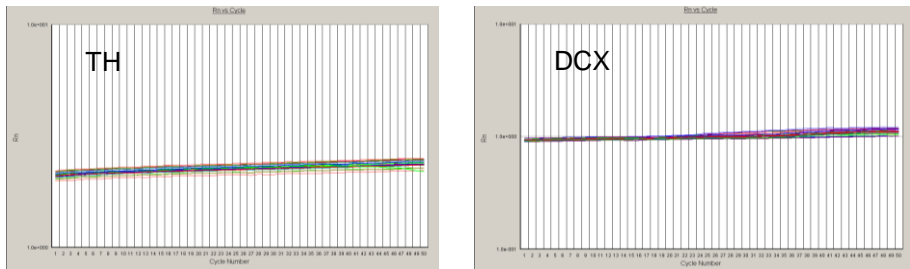


Figura 22: Graficas de amplificación mediante PCR en tiempo real de 10 individuos control sanos.

2.3.- Expresión de los marcadores en tejido tumoral

Para el estudio de expresión de los diferentes marcadores en tumor, se utilizó una colección de 59 tumores primarios de neuroblastoma. En este caso se pretendía estudiar el número de casos que mostraban expresión de cada uno de los genes que pretendíamos utilizar y demostrar en todos los casos, que los niveles de expresión eran muy elevados lo que nos indicaría que podrían ser útiles para detectar pequeños porcentajes de células tumorales. Se estudiaron 53 tumores en el caso de *MAGE-A1* y *MAGE-A3* (Figura 23), 33 en el caso de *GAGE*, 58 en el caso de *TH* (estudiados mediante PCR/Southern) y 59 para *DCX* detectado únicamente mediante QF-PCR. En el caso de *TH*, también se estudiaron 12 tumores mediante QF-PCR y los resultados obtenidos fueron idénticos a los observados mediante RT-PCR/Southern.

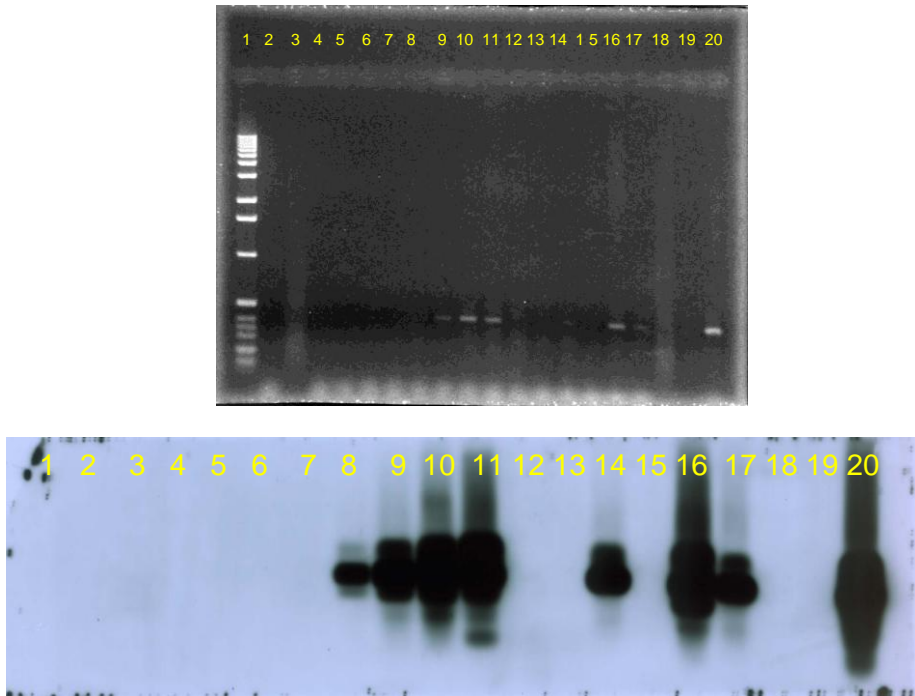
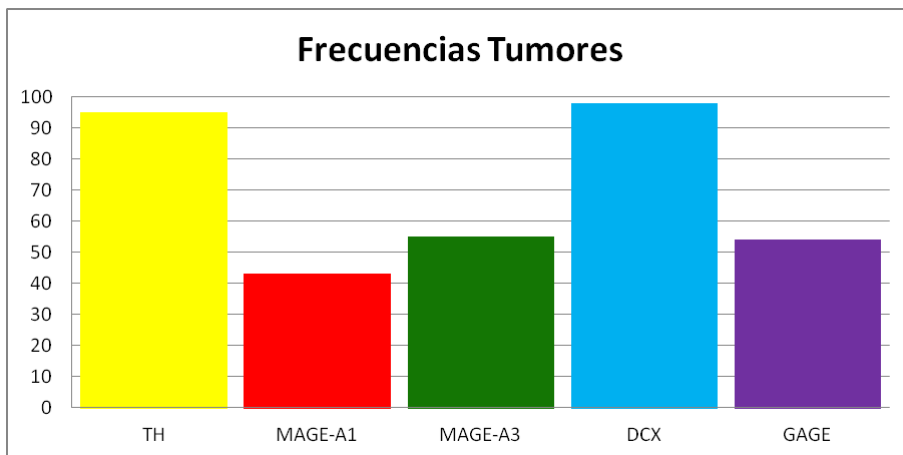


Figura 23: Gel de agarosa y southern blot tras la amplificación mediante RT-PCR de *MAGE-A3* con 15 muestras tumorales. Carrera 1: marcador de pesos moleculares; carrera 2: control negativo de la PCR; carrera 3 y 19: dilución 1/10.000 del producto de PCR obtenido a partir de una muestra tumoral diluida en un tampón que contiene ADN de esperma de salmón (50ng/ μ l); carreras 4-18: muestras tumorales; carrera 20: control positivo.

Los porcentajes de expresión en los 59 tumores se muestran en la Figura 24.



Marcadores	TH	MAGE-A1	MAGE-A3	DCX	GAGE
Frecuencia detección %	95	43	55	98	54
n	59	53	53	58	34

Figura 24: Frecuencias de expresión de *TH*, *MAGE-A1*, *MAGE-A3*, *DCX* y *GAGE* en los tumores primarios estudiados.

Como podemos observar en la figura, los marcadores que demostraron una mayor frecuencia de expresión en tumores fueron *TH* y *DCX*, ambos se expresaban en la práctica totalidad de las muestras tumorales estudiadas. Sólo en uno de los tumores no detectó expresión de *DCX*, esta muestra tampoco mostró expresión del resto de genes estudiados por lo que se podría tratar de un caso en el que no se expresara ninguno de ellos o que se tratara de tejido sano del paciente. Por tanto, con la combinación de *TH* y *DCX* estaríamos cubriendo la práctica totalidad de los casos. En el resto de marcadores, la frecuencia de tumores en los que se detectó expresión de estos genes fue de aproximadamente la mitad. La posible utilización futura para la detección de EMR se vería condicionada por los datos obtenidos.

Los niveles de expresión de los marcadores en los tumores se midieron de forma diferente a lo largo de la tesis. En el caso de *MAGE-A1*, *MAGE-A3*, *GAGE* y *TH* detectados mediante RT-PCR/Southern se comprobó que se podían detectar diluciones 1/10.000 de los productos de PCR resultado de la amplificación de los mismos, lo que demostraba que la expresión en el tejido tumoral era elevada. Posteriormente con la introducción de la técnica de la PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron cuantificaciones relativas de la expresión de *TH* y *DCX*. Dicha cuantificación se realizó midiendo la expresión de los mismos frente al gen de expresión constitutiva *GAPD*. Los resultados demostraron que la expresión de ambos era muy elevada. Los

rangos de expresión mostrados fueron semejantes a los del gen de expresión constitutiva e incluso mayores. Los datos obtenidos para algunos tumores se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Valores obtenidos en 10 de los tumores primarios estudiados mediante RT-PCR cuantitativa. Los datos que se muestran se obtuvieron al restar al CT obtenido con *TH* y *DCX* el CT obtenido con la misma muestra al amplificar el gen de expresión constitutiva (Δ CT).

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Δ CT <i>TH</i>	-0,6	-0,47	-3,31	5,27	-1,97	0,57	-1,49	2,26	5,06	1,64
Δ CT <i>DCX</i>	0,5	1,28	-0,29	6,29	0,28	1,52	-0,84	3,63	7,3	3,46

3.- Exclusión de la expresión de los genes *GAGE* como marcadores de EMR en neuroblastoma

En vista de la alta tasa de expresión de *GAGE* en las muestras procedentes de individuos control y que en las publicaciones previas existentes sólo referían un falso positivo en una muestra de un control de sangre periférica (*Cheung et al., 1998-A*), se decidió profundizar alrededor de este hallazgo.

Por una parte se procedió al estudio de la homología entre los 8 genes de dicha familia, sobre todo en la zona diana que estábamos amplificando. El alineamiento lo podemos observar en la figura 18 del apartado de material y métodos. La homología resultó ser superior al 90% y además el alineamiento reflejaba la existencia de dos subgrupos, uno formado por los genes *GAGE 1, 2 y 8* y otro formado por los genes *GAGE* del 3 al 7. Para poder comparar con los estudios previos, además de los cebadores diseñados para amplificar simultáneamente todos los miembros de la familia diseñamos cebadores para amplificar el subgrupo formado por *GAGE 1,2 y 8* y el grupo *GAGE 3 al 7*.

Para la parte experimental, además de las 35 muestras de controles sanos, se utilizaron muestras de sangre periférica y médula ósea de 75 pacientes de neuroblastoma en diferentes momentos de la enfermedad (diagnóstico, durante el tratamiento y seguimiento tras el final del tratamiento). De estos pacientes, 32 se clasificaban como estadio 4, 18 estadio 3, 7 estadio 2 y 18 estadio 1. También se usaron 34 muestras tumorales. En el caso de los tumores, únicamente se amplificó el total de la familia génica (*GAGE 1 al 8*), tal y como nos habíamos planteado en un principio en el estudio. Además de la detección de *GAGE*, también se amplificaron *MAGE-A1*, *MAGE-A3* y *TH*. Todos estos estudios se diseñaron con el fin de poder comparar la expresión de todos ellos en pacientes en estadios 1 y 2 y en estadios 3 y 4 así como dilucidar la utilidad de los genes *GAGE* en la detección de EMR en neuroblastoma.

Resultados

En el caso de las muestras control se estudió por una parte el total de la familia simultáneamente y por otra parte los dos subgrupos de genes por separado. Este diseño nos permitió la comparación de nuestros resultados con los previamente descritos, donde utilizaban la presencia de la expresión de los genes del subgrupo *GAGE 1, 2 y 8* para la detección de EMR en este tumor.

Los resultados obtenidos los podemos observar en la tabla 11. En el caso de las muestras clínicas sólo mostramos los resultados de las que se obtuvieron al diagnóstico de la enfermedad.

Tabla 11: Frecuencias de expresión de los diferentes marcadores en las muestras de sangre periférica y médula ósea estudiadas.

	SANGRE PERIFÉRICA			MÉDULA ÓSEA	
	CONTROLES	Estadio 1 y 2	Estadio 3 y 4	Estadio 1 y 2	Estadio 3 y 4
TH	0/35	2/15 (13%)	18/46 (39%)	2/11 (18%)	24/43 (56%)
MAGE-A1 MAGE-A3	0/35	1/15 (6%)	6/46 (13%)	0/11	15/43 (35%)
GAGE 1-8	20/35 (59%)	6/10 (60%)	15/24 (62%)	4/6 (66%)	17/23 (74%)
GAGE 1,2,8	10/35 (29%)				
GAGE 3-7	18/35 (51%)				

Como ya hemos mencionado anteriormente, en el caso de las muestras control observamos la expresión del total de los genes de la familia *GAGE* en un 59% de ellas. En el caso del subgrupo de los genes *GAGE 1,2 y 8* en el porcentaje fue del 29%. En este caso, dos de las muestras control mostraron un alto nivel de expresión ya que se podía visualizar directamente el producto de PCR amplificado en el gel agarosa teñido con bromuro de etidio, esto supone aproximadamente un 5%, porcentaje que es concordante con lo publicado anteriormente. En el subgrupo formado por los genes *GAGE 3* al *GAGE 7*, el número de casos positivos fue mucho mayor pudiéndose detectar expresión en 18 de los 35 controles estudiados (51%).

Las frecuencias de expresión génica de *GAGE* observadas en muestras control son similares a las que se observan en las muestras de los pacientes. Al comparar los resultados de la expresión de *GAGE* en las muestras clínicas no se observan diferencias entre los pacientes estadio 1 y

2 y los pacientes 3 y 4 tanto en MO como en SP. Además, en el caso de los estadios localizados 1 y 2, no es habitual la existencia de micrometástasis, y los resultados de *GAGE* significarían la existencia de células metastáticas en un número elevadísimo de casos, contradiciendo otros muchos estudios. Por otra parte, los resultados obtenidos en estos casos con *TH* y los genes *MAGE* son los que se esperarían de la detección de enfermedad mínima residual en estos pacientes con métodos muy sensibles, lo que nos demuestra que la técnica utilizada fue adecuada.

4.- Validación de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real de *GAPD*, *TH* y *DCX*.

Para la validación de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real de *GAPD*, *TH* y *DCX* se hicieron dos tipos de experimentos, por una parte el análisis de las curvas estándar de los tres genes y por otra parte la estimación de la variabilidad en la cuantificación entre las réplicas. Ambos tipos de experimentos son imprescindibles para garantizar la fiabilidad y reproducibilidad de la técnica, lo que permite finalmente obtener una cuantificación fiable de los niveles de expresión de los diferentes genes.

4.1.- Análisis de las curvas estándar.

Para la realización de las curvas estándar, se amplificaron por triplicado la muestra pura y 5 diluciones seriadas de cDNA tumoral (de 1/10 a 1/100.000) utilizando las condiciones de PCR reflejadas en el apartado de material y métodos. Un ejemplo del resultado obtenido para el gen *GAPD* se muestra en la Figura 25. La parte A de figura nos muestra las curvas de amplificación de derecha a izquierda para la muestra sin diluir y las diluciones 1/10 a 1/10.000. En este caso, la dilución 1/100.000 no mostró amplificación. El apartado B de la gráfica nos muestra la curva estándar calculada a partir del punto de corte del delta RN (intensidad de fluorescencia) marcado por la barra verde horizontal en el gráfico A. Dicha gráfica nos muestra el ajuste del experimento al rango dinámico de amplificación en este caso. Los resultados obtenidos de la pendiente, intersección con el eje Y y coeficiente de correlación para *TH*, *DCX* y *GAPD* se muestran en la Tabla 12.

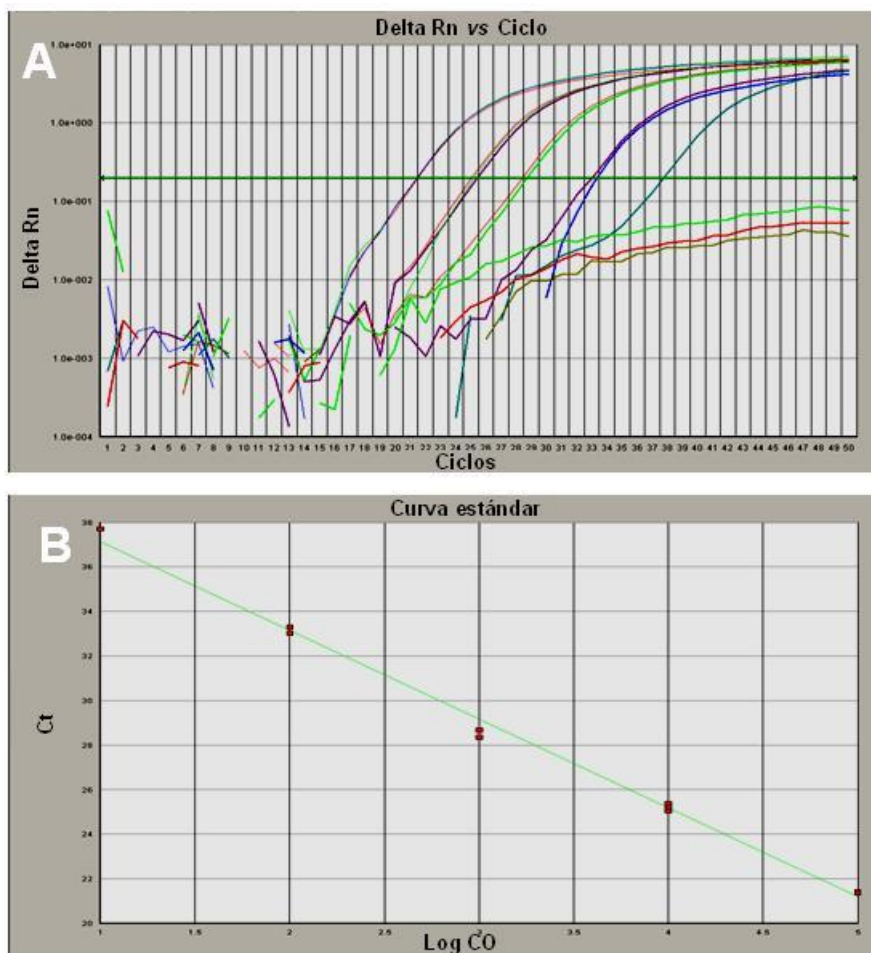


Figura 25: Curvas de amplificación (A) y curva estándar (B) obtenida en la amplificación de diluciones seriadas de cDNA tumoral para el gen *GAPD*.

Tabla 12: Pendiente, intersección con el eje Y y coeficiente de correlación obtenidos de las curvas estándar realizadas para *TH*, *DCX* y *GAPD*.

	<i>TH</i>	<i>DCX</i>	<i>GAPD</i>
Pendiente	-3.026	-3.288	-3.981
Intersección con el eje Y	41.060	42.573	41.104
Coeficiente de correlación R²	0.998	0.994	0.995

Como se puede observar en la tabla, el coeficiente de correlación en los tres casos es prácticamente 1. Este dato nos indica que la PCR se comporta de forma cuantitativa, en el rango de concentraciones estudiado, independientemente de la cantidad inicial de RNA molde. La pendiente, en este tipo de curvas, está en relación con la eficiencia de la amplificación, en los tres casos está alrededor del 100%. En el caso de la intersección con el eje Y, nos indica la sensibilidad del proceso, que en este caso es similar para los tres ensayos. Esta situación permite comparar de manera fiable los resultados de las cuantificaciones obtenidas para todos ellos.

4.2.- Estimación de la variabilidad entre las réplicas.

Este tipo de experimento nos permite evaluar la variabilidad en la cuantificación en las diferentes réplicas debida a los errores de pipeteo. Para la estimación de esta variabilidad calculamos la desviación de los valores de C_T en dos diluciones diferentes (1/10 y 1/100) y 12 réplicas para cada uno de los genes utilizados en el estudio. La variación obtenida fue aproximadamente 0,1, lo que supone un error relativo inferior al 1%. Este dato confirma que esta metodología ofrece un alto grado de precisión y reproducibilidad.

5.- Comparación de los estudios de expresión realizados para *TH*, mediante Southern Blot y QF-PCR.

Uno de los objetivos del trabajo era la evaluación de las diferentes técnicas de estudio de la enfermedad mínima residual en Neuroblastoma. El único marcador estudiado con más de una aproximación diferente fue *TH*. Las dos técnicas utilizadas están basadas en la PCR, en ambos casos la extracción del RNA y la posterior retrotranscripción fue común y la parte de amplificación y posterior detección fue diferente. En los inicios del estudio utilizamos la aproximación de la amplificación mediante PCR, electroforesis

en gel de agarosa del producto de PCR obtenido, la transferencia a una membrana de nylon mediante Southern blot y para su posterior hibridación con una sonda específica y detección con quimioluminiscencia. Al adquirir un termociclador para PCR cuantitativa en tiempo real, adaptamos la detección de la expresión de *TH* a esta tecnología.

A continuación presentaremos la comparación de los resultados apareados obtenidos con ambas técnicas en un total de 918 muestras, distribuidas de la siguiente manera:

- 12 Tumores
- 480 MO
- 401 SP
- 25 AF

La concordancia en el total de las muestras estudiadas con ambas técnicas fue del 87% (Tabla 13 y Tabla 14). Por el contrario, 96 muestras mostraron expresión para *TH* mediante PCR cuantitativa en tiempo real y no para PCR/Southern. En la mayoría de los casos el nivel de expresión observado fue muy bajo (Media $\Delta CT = 17,26$, Desviación típica=3,41). En cambio, 23 muestras fueron positivas por Southern y negativas por QF-PCR. En todos los casos se trataba de muestras antiguas de la colección en las que no se estudiaron simultáneamente en el tiempo ambos marcadores. Los estudios por Southern blot se realizaron tras la recepción de la muestra y en el caso de la QF-PCR se realizó de manera retrospectiva sobre las muestras antiguas y prospectivamente desde el momento de la introducción de esta técnica. Además, en aquellas donde se observó expresión de *DCX* mediante QF-PCR siempre fue baja (Media $\Delta CT = 18,28$, desviación típica=1,39). Este fenómeno podría explicarse por la fragilidad y el alto grado de degradación de las muestras de cDNA a lo largo del tiempo y sometidas a ciclos de congelación y descongelación para realizar los diferentes experimentos.

En las 172 muestras positivas donde existe concordancia en la expresión de *TH* estudiada con ambos métodos la media de los ΔCT obtenidos mediante QF-PCR fue de 11,12 con una desviación típica de 5,46.

Todos los datos obtenidos para el total de las muestras nos demuestran que la técnica más sensible es la QF-PCR.

Tabla 13: Tabla de contingencia de la detección de la expresión de *TH* mediante PCR/Southern frente a la detección mediante QF-PCR en la totalidad de muestras apareadas.

Marcadores	QF_TH +	QF_TH -	Total
TH Southern +	172	23	195
TH Southern -	96	627	723
Total	268	650	918

Si separamos los resultados por tipo de muestra, en el caso de los tumores, la concordancia en los 12 casos estudiados fue del 100%. Al observar las aféresis la concordancia también es muy elevada, en este caso del 96%. En las 25 aféresis estudiadas sólo una de ellas mostró expresión de *TH* detectada por ambas técnicas y sólo observamos una discordancia en una muestra en la que se detectó expresión de *TH* mediante QF-PCR ($\Delta CT=20,07$) y no mediante PCR/Southern.

En el caso de las muestras de sangre periférica y médula ósea los resultados se muestran en la Tabla 5.5.2.

Tabla 14: Tabla de contingencia de la detección de la expresión de *TH* mediante PCR/Southern frente a la detección mediante QF-PCR en sangre periférica y médula ósea.

Marcadores	MO			SP		
	QF_TH +	QF_TH -	Total	QF_TH +	QF_TH -	Total
TH Southern +	127	12	139	32	11	43
TH Southern -	57	268	341	38	320	358
Total	184	296	480	70	331	401

La coincidencia en el caso de las muestras de médula ósea fue del 83% y en la sangre periférica del 88%. Al igual que en la totalidad de muestras la PCR cuantitativa en tiempo real mostró una mayor sensibilidad en la detección de expresión de la *TH*. La proporción de muestras discrepantes cuando se detectó expresión mediante PCR/Southern y no con QF-PCR fue de 2,5% en MO y 2,7% en SP y como ya hemos comentado en el apartado anterior corresponden a muestras antiguas que no se estudiaron simultáneamente. La media de los valores de ΔCT en los casos donde se detectó sólo expresión mediante QF-PCR en médula ósea fue de 17,31 y la desviación típica de 3,88. En el caso de la sangre periférica fue de 17,11 con una desviación típica de 2,61. En ambos casos el valor de la media de los valores de ΔCT revela un nivel de expresión bajo.

Con la técnica de PCR/Southern las muestras se clasificaron según si la expresión de los marcadores era evidente en la electroforesis en el gel de agarosa, asignándole un nivel de expresión 2, en aquellos casos donde sólo

se observaba tras el Southern se le asignó un valor 1 y aquellos en los que no se observó expresión se les asignó el valor 0. La correspondencia entre estos valores con los que se obtuvieron con la QF-PCR se muestra en la Figura 26. En los casos donde el valor asignado mediante PCR/Southern fue 0, para hacer la media de los valores obtenidos mediante QF-PCR sólo se utilizaron aquellos en los que se detectó expresión del gen.

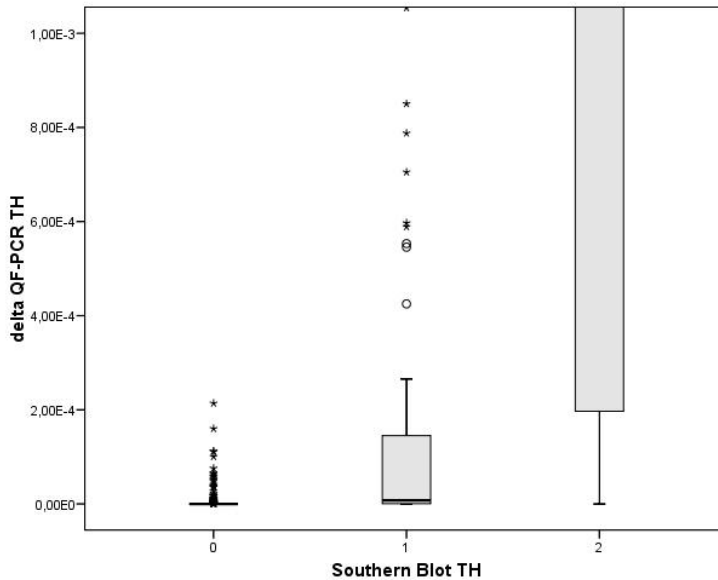


Figura 26: Diagrama de cajas para los valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ obtenidos mediante QF-PCR clasificados según los valores obtenidos mediante PCR/Southern.

Estos valores muestran que existen diferencias entre las medianas en los niveles de expresión obtenidos mediante PCR cuantitativa en tiempo real, en función del resultado obtenido con la técnica de la PCR/Southern. Sin embargo, podemos observar que los rangos de valores presentan cierto solapamiento, especialmente para los valores extremos.

6.- Comparación de los estudios de expresión realizados mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real para la expresión de *TH* y *DCX*.

Tras los análisis de los datos de validación de los diferentes marcadores y técnicas mostrados en los apartados anteriores, se decidió realizar la comparación de los datos obtenidos de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa con los marcadores *TH* y *DCX*.

Una primera valoración de la utilización de estos dos marcadores consistió en el análisis de los resultados obtenidos para ambos en la totalidad de las muestras estudiadas.

A continuación presentaremos la comparación de los resultados obtenidos con ambas técnicas en un total de 1339 muestras, distribuidas de la siguiente manera:

- 12 Tumores
- 765 MO
- 529 SP
- 33 AF

El primer análisis realizado fue el grado de coincidencia en la expresión de ambos marcadores en el total de las muestras que fue del 87% (Tabla 15). Un total de 91 muestras mostraron expresión para *TH* y no para *DCX* y en 88 casos se evidenció el fenómeno contrario, en la mayoría de los casos el nivel de expresión observado fue muy bajo (Media $\Delta CT = 18,33$, Desviación típica=3,41 en el caso de *TH* positivo y *DCX* negativo y de 18,09 Desviación típica=2,72 en el caso contrario). En esta ocasión, todas las muestras se estudiaron simultáneamente, por lo que las diferencias en la expresión de ambos marcadores se podría explicar bien por la no expresión de alguno de los dos en las células tumorales o por los bajos niveles de expresión detectados en las muestras discordantes y que pudieran estar cerca del límite de sensibilidad de la técnica.

Tabla 15: Tabla de contingencia de la detección de la expresión de *DCX* y *TH* mediante QF-PCR en la totalidad de muestras apareadas estudiadas.

Marcadores	<i>DCX</i> negativo	<i>DCX</i> positivo
<i>TH</i> negativo	838	88
<i>TH</i> positivo	91	322

El análisis anterior también se realizó en función del tipo de muestra. Los resultados obtenidos (Tabla 16) ponen de manifiesto que existe una total coincidencia en la expresión de ambos marcadores en tumor, este dato era esperable ya que ambos marcadores mostraron expresión en la mayoría de los casos estudiados, como hemos visto en el apartado 2.3 de los resultados. En este apartado, sólo mostramos los resultados observados en 12 de ellos, ya que no se dispone del dato de expresión mediante QF-PCR para *TH* del resto. Por otra parte, los resultados obtenidos en MO y SP son similares a los obtenidos en la totalidad de las muestras, la coincidencia en el caso de la MO es de un 85,35% y del 87,73% en el caso de la SP. Por último, en el caso de las aféresis, la mayoría son negativas para ambos

Resultados

marcadores, sólo existe expresión de ambos en una de ellas, del mismo modo que existe expresión de *TH* y no de *DCX* en otra muestra y el caso contrario en otra.

Tabla 16: Tabla de contingencia de la detección de la expresión de *DCX* y *TH* mediante QF-PCR en tumor, aféresis, sangre periférica y médula ósea.

Muestra	T		MO		SP		AF	
Marcadores	DCX-	DCX+	DCX-	DCX+	DCX-	DCX+	DCX-	DCX+
TH-	0	0	420	51	388	36	30	1
TH+	0	12	62	232	28	77	1	1

Tras el análisis descriptivo, realizamos una correlación entre el grado de expresión de ambos marcadores utilizando los valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$, tanto con el total de las muestras considerando los dobles negativos, como en aquellos casos donde únicamente ambos marcadores resultaron positivos, en ambos supuestos, la correlación resultó ser positiva con un nivel de significatividad del 0,01. Los resultados se muestran en la Tabla 17 y la Tabla 18.

Tabla 17: Correlación de Pearson entre los niveles de expresión observados mediante la técnica de QF-PCR para los marcadores *TH* y *DCX*.

		$2^{-\Delta\Delta CT}$ TH	$2^{-\Delta\Delta CT}$ DCX
$2^{-\Delta\Delta CT}$ TH	Correlación de Pearson	1	,792(**)
	Sig. (bilateral)		,000
	N	1339	1339
$2^{-\Delta\Delta CT}$ DCX	Correlación de Pearson	,792(**)	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	1339	1339

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

El análisis de regresión mostró un valor de R^2 de 0,627.

Tabla 18: Correlación de Pearson entre los niveles de expresión observados mediante la técnica de QF-PCR en los casos doble positivos para los marcadores *TH* y *DCX*.

		$2^{-\Delta\Delta CT}$ DCX	$2^{-\Delta\Delta CT}$ TH
$2^{-\Delta\Delta CT}$ DCX	Correlación de Pearson	1	,790(**)
	Sig. (bilateral)		,000
	N	322	322
$2^{-\Delta\Delta CT}$ TH	Correlación de Pearson	,790(**)	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	322	322

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

El análisis de regresión mostró un valor de R^2 de 0,624.

Por otra parte realizamos la representación de la correlación de los valores de ΔCT de los casos dobles positivos para los diferentes tipos de muestras, los resultados de muestran en la Figura 27.

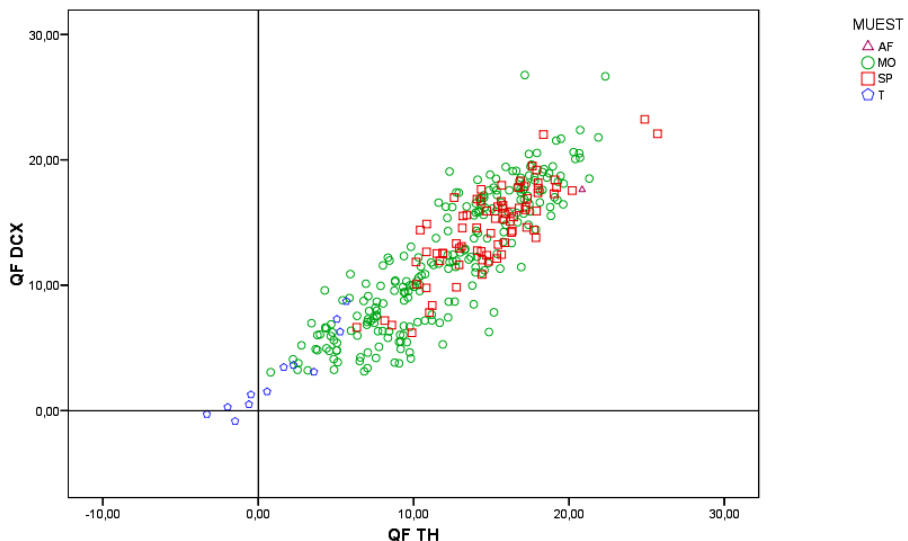


Figura 27: Correlación entre los valores de expresión de DCX y TH en los diferentes tipos de muestras estudiadas (MO, SP, AF y T).

La gráfica nos demuestra que la mayor tasa de expresión se observa en los tumores seguido por altos valores de expresión en MO y en los rangos más bajos de expresión ya observamos las muestras de SP, AF y MO.

7.- Estudio mediante inmunocitología con anticuerpos Anti-GD2.

Se realizó hibridación inmunocitológica con anticuerpos Anti-GD2 en un total de 405 muestras de 117 pacientes, de los cuales 48 estaban diagnosticados de enfermedad localizada (11 estadio 1, 13 estadio 2, 24 estadio 3) y 67 con enfermedad diseminada (62 estadio 4, 5 estadio 4S). En 2 pacientes no se dispone del dato. La evaluación de los resultados, se realizó mediante 2 observadores y siguiendo los criterios descritos en el punto 8 del apartado de material y métodos.

La distribución de las muestras fue:

- 22 AF
- 219 MO
- 164 SP

Los resultados observados se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19: Resultados obtenidos en el estudio de EMR mediante inmunocitología por tipo de muestra, en pacientes con enfermedad localizada y enfermedad diseminada. Las tres muestras pertenecientes a los dos pacientes de los que no se dispone del dato del estadio no fueron consideradas.

	SP		MO		AF	Total
	Localizados	Diseminados	Localizados	Diseminados		
GD2 +	4 (8%)	18 (16%)	14 (23%)	63 (40%)	3	102
GD2-	46 (92%)	96 (84%)	48 (77%)	93 (60%)	17	300
Total	50	114	60	156	20	402

Como se puede observar en la tabla, tanto en SP como en MO el número de muestras positivas es mayor en los casos con enfermedad diseminada que en los casos con tumores localizados, como cabría esperar por la clasificación de los pacientes. El análisis estadístico realizado mediante el estadístico Chi-cuadrado en SP, no arrojó diferencias significativas entre el número de muestras positivas y negativas obtenidas en casos localizados y diseminados ($p=0,178$), sin embargo, en el caso de las muestras de MO, sí que existen diferencias significativas en el número de muestras en las que se detectaron células tumorales en los dos grupos de pacientes ($p=0,013$).

Tras la observación de los datos anteriores, se decidió hacer un análisis pormenorizado de los mismos. Para ello se separaron los resultados por estadios y momentos de la enfermedad. El primer grupo de muestras analizadas fueron las pertenecientes al diagnóstico. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20: Resultados obtenidos en el momento del diagnóstico en las muestras estudiadas mediante inmunocitología con el anticuerpo Anti-GD2.

Muestras	Estadio					Total
	1	2	3	4	4S	
MO	1/7	0/3	8/19	29/33	1/2	64
SP	1/5	0/1	2/7	10/16	1/1	30

Como se puede observar en la tabla, el mayor porcentaje de muestras positivas se concentra en los casos diseminados siendo de un 87% en los estadio 4 en MO y de un 62% en el caso de la SP, sin embargo, observamos un alto número de muestras positivas en los casos estadio 3 que alcanza un 42% en el caso de la MO y un 28% en el caso de la SP.

En el otro momento en el que se disponen de un número suficiente de muestras es en el de la cirugía. En este caso, se dispone de 29 muestras (8 SP y 21 MO). En todos los casos las muestras pertenecen a pacientes estadio 3 y 4. Todas las muestras de SP fueron negativas, en el caso de las muestras de MO, se observaron 7 muestras positivas con un bajo número de células tumorales. Dichas muestras pertenecen a 5 pacientes diferentes, un paciente estadio 3 (considerado paciente del grupo de Alto Riesgo) y 4 pacientes estadio 4.

Finalmente, también se disponía de muestras de 16 pacientes en el momento de la recaída (1 paciente estadio 1, 3 pacientes estadio 3 y 12 pacientes estadio 4). Los resultados observados en las 46 muestras disponibles se detallan en la Tabla 21.

Tabla 21: Resultados obtenidos en el momento de la recaída en las muestras estudiadas mediante inmunocitología con el anticuerpo Anti-GD2.

Estadio	Nº pacientes	Muestras SP	Nº pacientes	Muestras MO	Muestras AF
1	1	0/1	1	2/2	
3	1	0/1	3	1/5	0/1
4	10	4/12	10	16/24	

Como podemos observar, sólo se dispone de un número considerable de muestras en el caso de los pacientes estadio 4. Si analizamos estos datos,

podemos observar que un 40% de los pacientes resultó ser positivo en el análisis realizado en sangre periférica. Esta cifra aumentó al 80% en el caso de la MO.

Debido a la complejidad de la técnica y la dedicación de tiempo necesaria para la obtención de los resultados al microscopio, se decidió hacer un análisis comparativo de los resultados obtenidos mediante inmunocitología y la detección de EMR mediante la expresión de *TH* y *DCX* utilizando la QF-PCR con el fin de valorar la posible utilidad de la misma. Dicho análisis se realizó en un total de 252 muestras de las que se disponía de los tres datos (150 MO, 90 SP y 12 AF). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22: Resumen de los resultados obtenidos para las muestras estudiadas mediante inmunocitología con Anti-GD2 y QF-PCR de la expresión de *TH* y *DCX*. La tabla muestra el número de muestras positivas en cada uno de los casos.

Marcadores	Muestras		
	MO (n=150)	SP (n=90)	AF (n=12)
<i>DCX</i> +	71	27	0
<i>TH</i> +	67	20	1
GD2 +	47	11	0

Sólo en 4 casos se observó la presencia de células tumorales mediante la utilización de la inmunocitología y no se observó expresión de *DCX* o *TH*. Las diferencias fueron en tres MO, en dos de ellas se observó una única célula tumoral en el citospín y en la otra se observaron 10 células tumorales y en una SP donde se observaron 2 células tumorales.

Un total de 117 muestras fueron positivas para alguno de los tres marcadores, y como hemos comentado antes, sólo en 4 de ellas se pueden considerar positivas para GD2 y no para *TH* y *DCX* lo que supone un 3,4% del total de positivos y un 1,5% de discordancia frente a la detección combinada de EMR mediante QF-PCR (*TH+DCX*). Por el contrario, GD2 resultó negativo en un 52% de muestras con expresión de *TH* o *DCX*.

8.- Evaluación del valor pronóstico de la expresión de los marcadores de EMR en tumor primario.

Para la evaluación del posible valor pronóstico de la expresión de los marcadores estudiados en la evolución de la enfermedad, se utilizaron un total de 59 tumores primarios de neuroblastoma. Debido a la duración del proyecto y a la ausencia de material tumoral suficiente, no fue posible la determinación de la expresión de los marcadores en todos los tumores. En

la siguiente tabla resumimos las principales características clínicas de los mismos.

Tabla 23: Distribución y principales características clínicas de la serie de tumores utilizadas para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR.

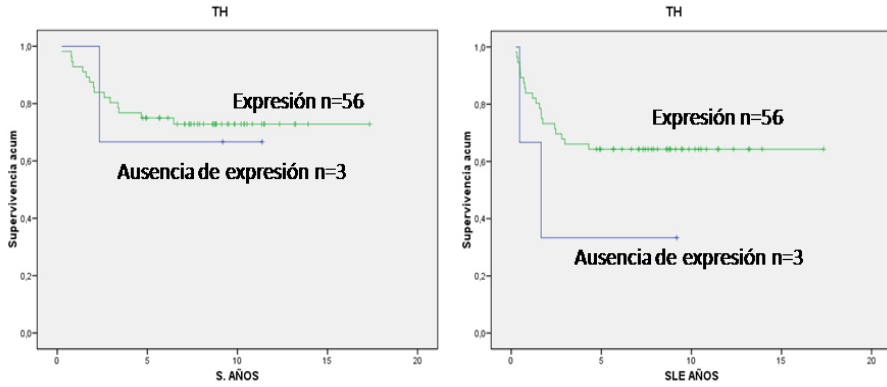
Características	Estadio INSS					Total
	1	2	3	4	4S	
n	16	5	18	17	3	59
Sexo						
Niño	6	2	12	8	2	30
Niña	10	3	6	9	1	29
Amplificación MYCN						
Amplificado	0	0	1	8	1	10
No Amplificado	16	5	15	8	2	46
Edad al diagnóstico						
>18 meses	5	4	12	6	3	30
<18 meses	11	1	6	11	0	29

Los datos de MYCN mostrados en la tabla, y los mostrados a lo largo del trabajo, se obtuvieron mediante la técnica de FISH según las recomendaciones de la *European Association for Quality Assurance* (ENQUA) en el laboratorio Español de Referencia para estudios biológicos de Neuroblastoma. Dicho laboratorio está situado en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

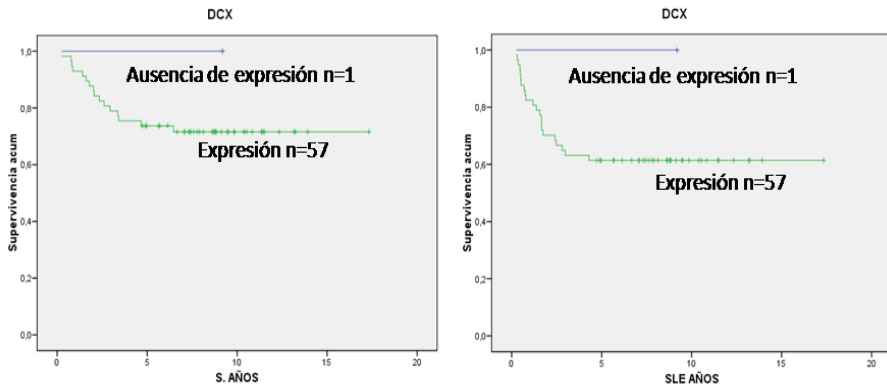
En los pacientes de los que se estudió muestra tumoral, el tiempo mínimo de seguimiento fue de 5,7 años, el máximo de 17,7 años y la mediana de tiempo de seguimiento de 7,6 años.

Para todos los casos se evaluó la posible correlación entre la expresión de cada uno de los marcadores y la evolución de la enfermedad. Las curvas de supervivencia y SLE obtenidas para los diferentes marcadores se muestran en la Figura 28.

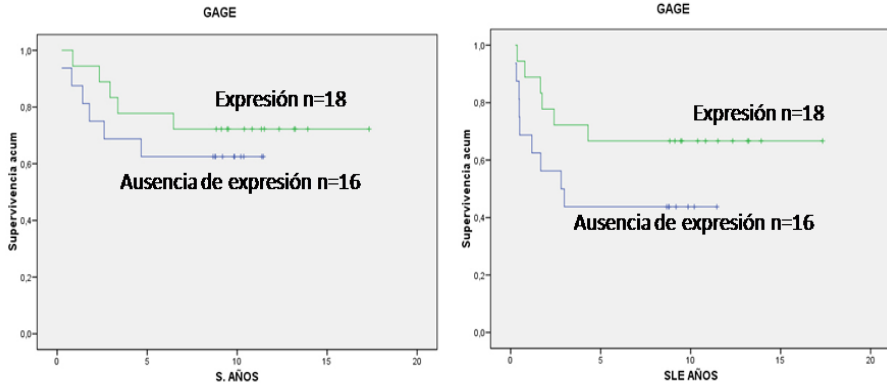
A: TH, izquierda supervivencia total ($p= 0,837$), derecha supervivencia libre de eventos ($p= 0,185$).



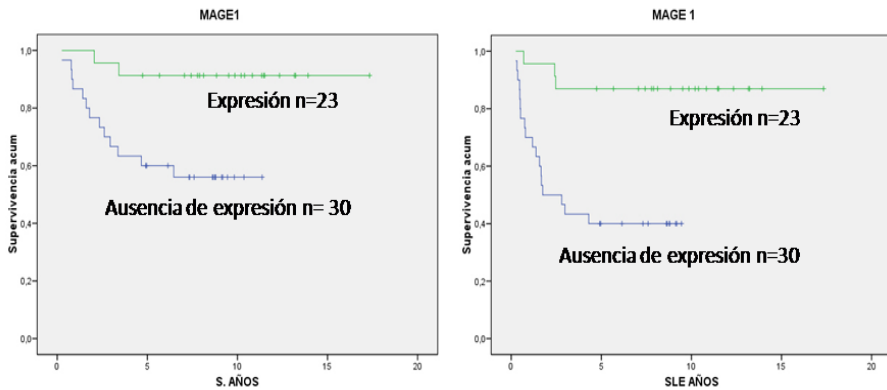
B: DCX, izquierda supervivencia total ($p= 0,565$), derecha supervivencia libre de eventos ($p= 0,467$).



C: *GAGE*, izquierda supervivencia total ($p= 0,457$), derecha supervivencia libre de eventos ($p= 0,134$).



D: *MAGE-A1*, izquierda supervivencia total ($p= 0,005$), derecha supervivencia libre de eventos ($p= 0,001$).



E: *MAGE-A3*, izquierda supervivencia total ($p= 0,382$), derecha supervivencia libre de eventos ($p= 0,097$).

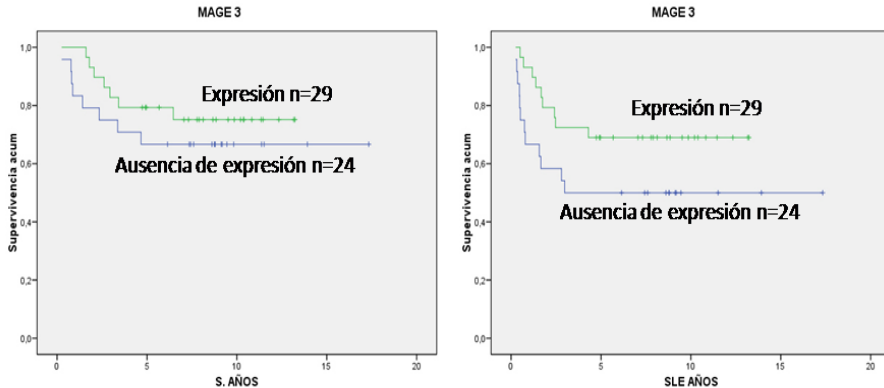


Figura 28: Curvas de Supervivencia y Supervivencia Libre de Eventos obtenidas en el análisis de los diferentes marcadores analizados en tumor primario.

Como se puede observar en las diferentes curvas de supervivencia y SLE, sólo en el caso de *MAGE-A1*, existe una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de dicho gen en tejido tumoral y el pronóstico de la enfermedad. La presencia de expresión resultó ser un factor pronóstico positivo. En pacientes cuyos tumores expresan *MAGE-A1* se ve aumentada de forma estadísticamente significativa tanto la supervivencia ($p=0,005$) como la SLE ($p=0,001$).

Tras la observación de estos resultados se decidió profundizar en el análisis de los datos obtenidos investigado su correlación con parámetros clínicos de los pacientes y biológicos del tumor.

Para determinar si la correlación entre supervivencia y expresión de *MAGE-A1* era exclusiva de algún subgrupo de tumores, se dividieron los tumores en dos subgrupos, tumores localizados (estadios 1, 2 y 3) y tumores diseminados (estadios 4 y 4S). También se procedió a comparar los datos obtenidos con los de la expresión de *MAGE-A3*, ya que se trata de genes de la misma familia pero diferente comportamiento. En la Tabla 24 podemos observar los datos de expresión de ambos genes en los dos subgrupos de tumores.

Tabla 24: Expresión de *MAGE-A1* y *MAGE-A3* frente a estadio tumoral agrupado en tumores localizados y diseminados.

	<i>MAGE-A1</i>		Total	<i>MAGE-A3</i>		Total
	Tumores Localizados	Tumores Diseminados		Tumores Localizados	Tumores Diseminados	
Ausencia Expresión	16	14	30	14	10	24
Expresión	19	4	23	21	8	29
	p= 0,024		53	p= 0,215		53

Como podemos ver, *MAGE-A1* se expresa en 23/53 tumores y *MAGE-A3* en 29/53 tumores. Así mismo existe una correlación significativa entre la expresión de *MAGE-A1* y el estadio tumoral ($p=0,024$), con una expresión predominante en tumores localizados. Sin embargo en el caso de *MAGE-A3* no se observa una asociación significativa de la expresión del mismo y el estadio tumoral.

Al analizar la expresión de *MAGE-A1* y *MAGE-A3* con otras características biológicas del tumor como la amplificación de *MYCN* o parámetros clínicos como la edad al diagnóstico (separada en mayores o menores de 18 meses) o el sexo, no observamos ninguna correlación significativa.

Aunque no se observaron diferencias significativas entre la expresión de *TH*, *DCX* o *GAGE* y la supervivencia o la SLE, y pese al pequeño número de muestras disponible, también se realizaron los análisis de supervivencia en función del estadio del tumor (localizados y diseminados), sexo, edad al diagnóstico o amplificación de *MYCN*. En este caso sólo se observaron diferencias significativas entre la expresión de *GAGE* y la SLE en el subgrupo de niñas ($p=0,013$). En el caso de *TH*, al analizar separadamente los tumores según la amplificación de *MYCN*, se observó una tendencia en la SLE en los tumores no amplificados, sin embargo no se alcanzó la significatividad ($p=0,057$). Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 29.

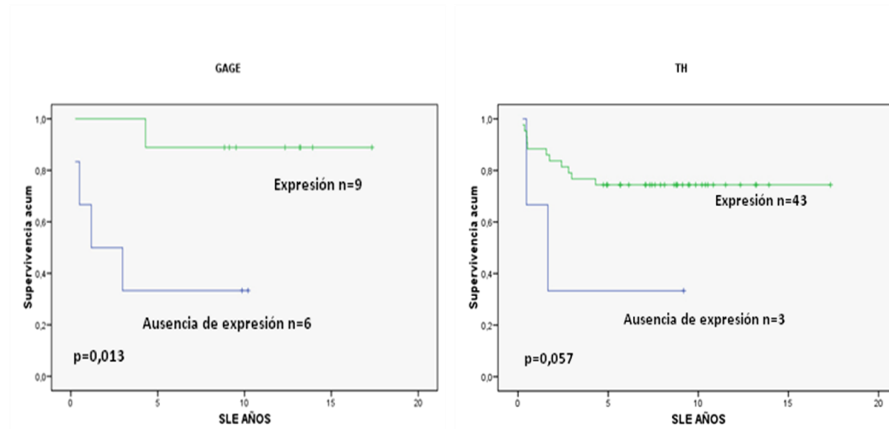


Figura 29: Curvas de Supervivencia Libre de Eventos obtenidas en el análisis de *GAGE* en niñas y *TH* en Tumores con *MYCN* no amplificado.

Los posteriores estudios los centramos en el análisis del posible valor pronóstico de la expresión de *MAGE-A1* en los diferentes subgrupos de tumores. Los resultados obtenidos los podemos observar en las siguientes figuras.

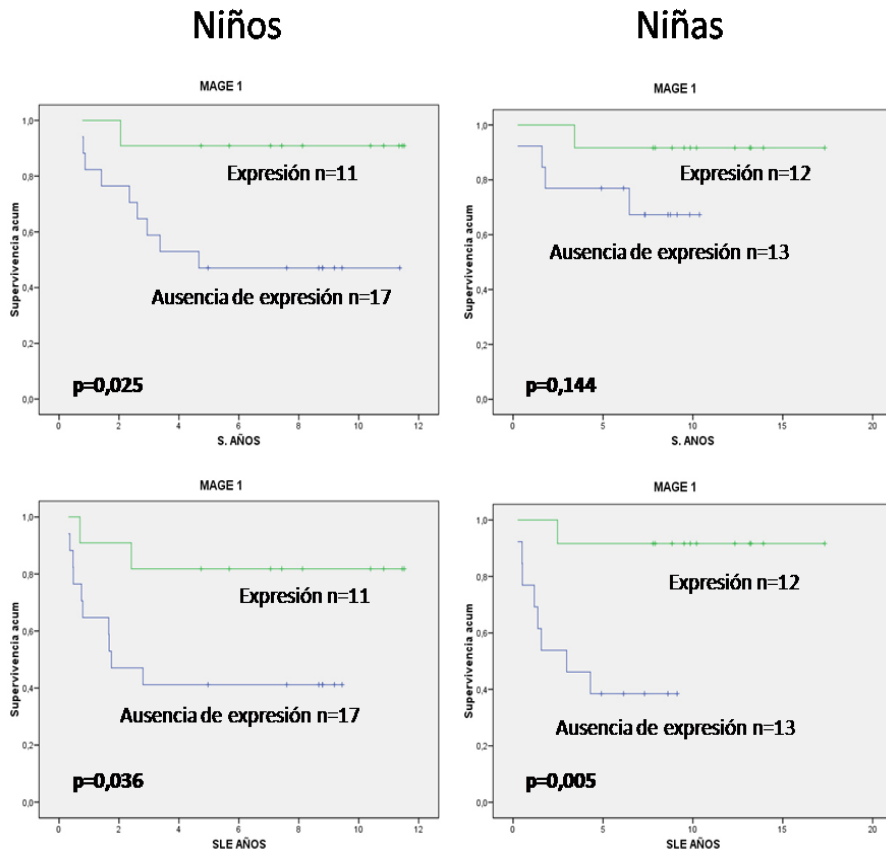


Figura 30: Curvas de Supervivencia y Supervivencia Libre de Eventos obtenidas en el análisis de *MAGE-A1* según el sexo de los pacientes.

Este análisis nos muestra que la expresión de *MAGE-A1* en tumor primario es un indicador de buen pronóstico en la SLE, independientemente del sexo de los pacientes. En el caso de la supervivencia total, observamos que este indicador solamente es significativo en el grupo de niños, aunque en el de las niñas se sigue observando la misma tendencia.

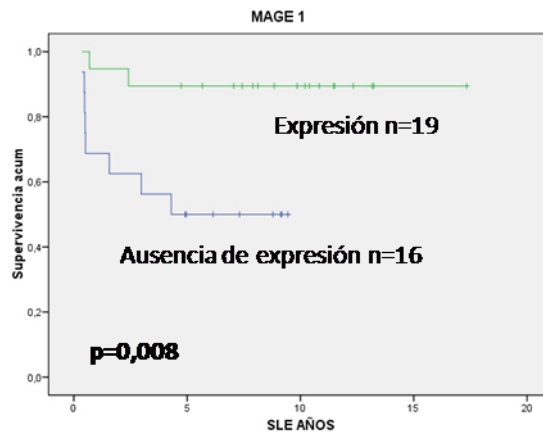


Figura 31: Curva de Supervivencia Libre de Eventos obtenidas en el análisis de *MAGE-A1* en tumores localizados.

El análisis de la supervivencia global y la SLE en los tumores divididos en localizados y diseminados, únicamente demostró una asociación significativa entre el aumento de la SLE y la expresión de *MAGE-A1* para los tumores localizados.

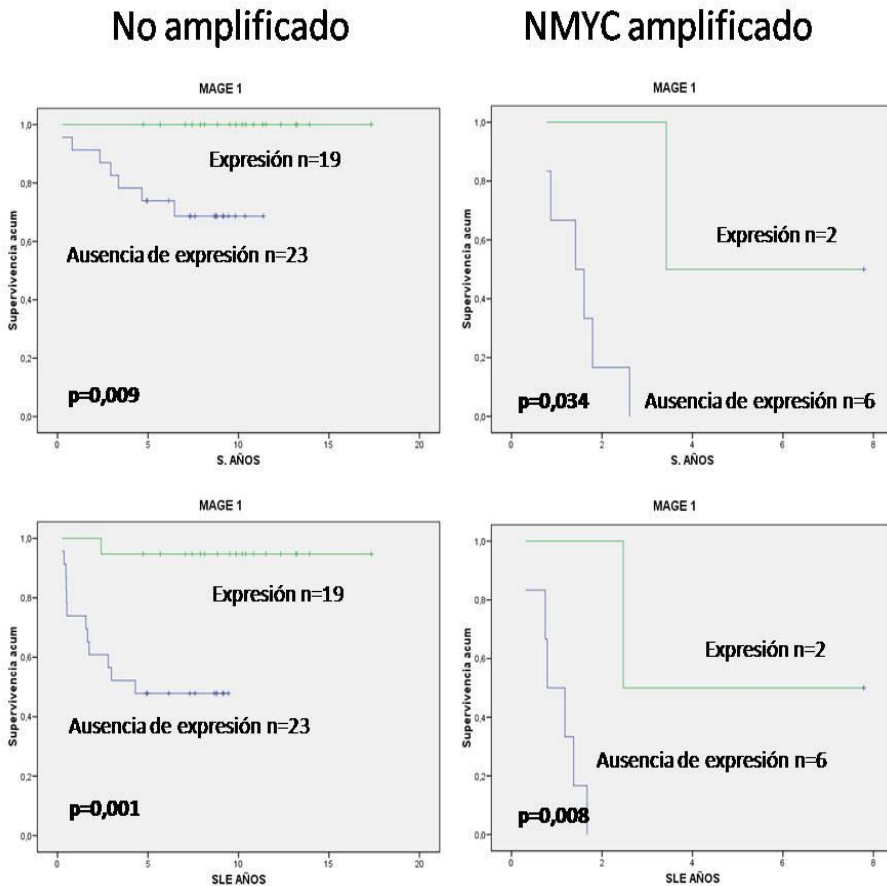


Figura 32: Curvas de Supervivencia y Supervivencia Libre de Eventos obtenidas en el análisis de *MAGE-A1* según el estado de *MYCN* en la totalidad de tumores.

Al realizar el análisis en función de la amplificación de *MYCN*, tal y como podemos observar en la figura 32, en todos los casos existe una asociación entre la expresión de *MAGE-A1* y el pronóstico de la enfermedad independientemente del estado de *MYCN*.

También se analizaron las funciones de supervivencia y SLE para el grupo de tumores diseminados con ausencia de amplificación del oncogén *MYCN*, donde no se observó una asociación significativa entre ambos factores.

Al no existir tumores localizados con amplificación de *MYCN*, las curvas de supervivencia global, así como el cálculo de la SLE para este grupo no se pudieron realizar, ya que existía un solo estado para el mismo. De la misma

manera, todos los tumores con *MYCN* amplificado pertenecen al grupo de tumores diseminados y por tanto, los resultados de este grupo son los que podemos observar en la Figura 28 C.

Para tratar de estudiar la independencia de la influencia de la expresión de *MAGE-A1* y *MYCN* en el pronóstico de la enfermedad y la influencia de ambos, se realizó una regresión de Cox introduciendo en el modelo estos factores, la edad al diagnóstico y la variable de tumores localizados *versus* diseminados. Los resultados del test estadístico lo podemos observar en la Tabla 25.

Tabla 25: Resultados de las variables *MAGE-A1*, *MYCN*, edad al diagnóstico y tumores localizados vs diseminados, incluidas en la regresión de Cox para la supervivencia total y la supervivencia libre de eventos.

SUPERVIVENCIA		VARIABLES	Sig.	Exp(B)	95% del Intervalo de Confianza para Exp(B)	
					Mínimo	Máximo
Total	Paso 1	Localizado vs diseminado	0,292	2,184	0,510	9,342
		<i>MAGE-A1</i>	0,004	0,035	0,004	0,344
		<i>MYCN</i>	0,000	15,822	3,366	74,373
		Edad al Diagnóstico	0,141	2,355	0,752	7,375
	Paso 2	<i>MAGE-A1</i>	0,004	0,038	0,004	0,359
		<i>MYCN</i>	0,000	21,735	4,974	94,981
		Edad al diagnóstico	0,168	2,097	0,697	6,309
	Paso 3	<i>MAGE-A1</i>	0,007	0,052	0,006	0,447
		<i>MYCN</i>	0,000	20,876	4,948	88,070
	Libre de eventos	Paso 1	Localizado vs diseminado	0,470	1,533	0,481
<i>MAGE-A1</i>			0,003	0,103	0,023	0,457
<i>MYCN</i>			0,008	4,507	1,479	13,736
Edad al diagnóstico			0,874	0,927	0,363	2,370
Paso 2		Localizado vs diseminado	0,422	1,576	0,519	4,781
		<i>MAGE-A1</i>	0,003	0,102	0,023	0,449
		<i>MYCN</i>	0,008	4,454	1,475	13,452
Paso 3		<i>MAGE-A1</i>	0,002	0,097	0,022	0,427
		<i>MYCN</i>	0,002	5,306	1,869	15,059

Los valores de significatividad demuestran diferencias significativas en la Supervivencia y la SLE con la amplificación de *MYCN* o la expresión de *MAGE-A1* por lo que ambos factores tienen un valor predictivo independiente en ambos casos. En el caso de *MYCN*, tal y como se espera, la amplificación del mismo resulta ser un factor de mal pronóstico de la

enfermedad, tanto en la supervivencia global como en la supervivencia libre de enfermedad. En el caso de *MAGE-A1*, como se había observado previamente en el análisis de las curvas de supervivencia, la expresión del mismo, demostró ser un factor de buen pronóstico en ambos casos.

Por otra parte, si observamos el valor calculado del coeficiente $\text{Exp}(B)$ para *MAGE-A1* y *MYCN*, correspondiente al riesgo relativo de cada factor, ambos presentan, en nuestra serie, un valor equivalente como valor pronóstico de la enfermedad, adverso en el caso de *MYCN* y de buen pronóstico en el caso de *MAGE-A1*.

9.- Resultados del estudio de EMR en pacientes con enfermedad no metastática.

Para el siguiente análisis se disponía de datos de 232 pacientes con diagnóstico de Neuroblastoma no metastático, 86 estadio 1, 36 estadio 2 y 109 estadio 3.

Tanto en el presente apartado como en el resto de estudios de EMR que presentaremos, no disponíamos de muestras de MO y SP de todos los pacientes, así como tampoco de datos de todos los marcadores estudiados a lo largo del trabajo. Además, con el fin de reclutar el número máximo de pacientes, se utilizaron todos los casos aunque sólo se dispusiera de una de ellas, ya que el tratamiento de los resultados se hizo por separado.

De la misma manera, en los análisis de datos, se tratará indistintamente de pacientes o muestras, ya que cada muestra considerada pertenece a un único paciente en el momento estudiado. En el caso de existir varias muestras de MO, se fusionaron los datos, de manera que se consideró la positividad de cada marcador tanto si era positivo en ambas o si lo era en sólo una.

Al tratarse de pacientes con enfermedad localizada, el único momento en el se disponía de suficiente número de muestras para la realización de cualquier tipo de análisis estadístico robusto fue el diagnóstico de la enfermedad. El otro momento del que se disponían muestras suficientes fue la recaída, aunque en número claramente inferior. El resto de muestras procesadas pertenecían a diferentes momentos de seguimiento de los pacientes en función del protocolo de tratamiento. La gran variabilidad no nos permitió un análisis agrupado de los datos por momentos del tratamiento.

9.1.- Estudio global de EMR en pacientes con enfermedad localizada al diagnóstico.

Para el análisis de la presencia de enfermedad residual, se seleccionaron aquellos pacientes de los que se disponía de muestra de MO o SP en el momento del diagnóstico.

En una primera aproximación, se calcularon las frecuencias de casos positivos de manera global tanto en MO como en SP, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 26. Posteriormente ya se analizaron pormenorizadamente todos ellos.

Tabla 26: Datos obtenidos en el total de las muestras de MO y SP estudiadas al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada.

	<i>TH</i>	<i>MAGE-A1</i>	<i>MAGE-A3</i>	<i>QF-DCX</i>	<i>QF-TH</i>	<i>GD2</i>
% MO +	13,6	6,9	5,3	19,4	17,3	30
n	125	58	57	108	104	20
% SP +	11,5	1,7	1,7	15,8	12,6	23,1
n	122	59	59	95	95	13

El análisis de los datos nos permitió observar una baja frecuencia en la detección de EMR en los pacientes con enfermedad localizada. En todos los marcadores estudiados se observa un mayor porcentaje de pacientes positivos en el caso de la MO que en la SP. Los datos obtenidos en el estudio de *TH* mediante PCR/Southern blot y QF-PCR cuantitativa, demuestran una mayor sensibilidad de la PCR cuantitativa frente al estudio mediante Southern blot, dato que es concordante al obtenido en el global de la serie de muestras estudiadas a lo largo de todo el trabajo.

La mayor frecuencia de detección de células tumorales se obtuvo mediante inmunocitología para GD2. El dato es sorprendente, ya que la sensibilidad teórica de la técnica es inferior a la de la PCR. Este resultado podría tener su explicación en un posible efecto aleatorio debido al bajo número de muestras estudiadas tanto para MO como para SP.

Los siguientes marcadores con índice de detección más elevado fueron *DCX* y *TH* estudiados mediante QF-PCR, con unos resultados muy homogéneos, obteniéndose un mayor número de casos positivos para *DCX* tanto en MO como en SP.

La combinación de todos los datos obtenidos nos permitió observar que en un 27% de las MO y en un 23% de las SP estudiadas, al menos uno de los marcadores estudiados demostró la posible existencia de células tumorales circulantes en pacientes con enfermedad localizada.

9.1.1- Estudio de EMR en MO al diagnóstico de pacientes con tumor localizado.

Para el estudio de EMR al diagnóstico en MO se disponía de muestras de 161 pacientes. Los datos clínicos básicos de los mismos se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27: Distribución y principales características clínicas de la serie de muestras de MO utilizadas, para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR en pacientes con enfermedad localizada.

Características	Estadio INSS			Total
	1	2	3	
n	61	19	81	161
Sexo				
Niño	29	9	48	86
Niña	32	10	33	75
Amplificación MYCN				
Amplificado	0	2	22	24
No Amplificado	55	16	52	123
No disponible	6	1	7	14
Edad al diagnóstico				
>18 meses	28	5	44	77
<18 meses	33	14	37	84

Los resultados obtenidos que sirvieron de base para los análisis de supervivencia se muestran en la Tabla 28.

Tanto en este apartado como en el resto de análisis de supervivencia, además de los resultados separados por estadios y marcadores, también se agruparon los datos de QF-PCR para la positividad de cualquiera de los dos genes analizados (TH y DCX) y una última fila para considerar la positividad de cualquiera de los marcadores analizados.

La decisión de fusionar los datos obtenidos mediante QF-PCR para TH y DCX se debe a que ambos son los dos marcadores que se expresan en la mayoría de los tumores, que ambos se han determinado por la misma técnica y que es la técnica que ha demostrado mayor sensibilidad y sencillez. Estos factores han determinado el que además de realizar análisis de supervivencia por separado, consideramos interesante realizar un análisis conjunto de los mismos.

Resultados

Por último, se decidió combinar la totalidad de los datos de todos los marcadores, para aprovechar este parámetro en los análisis de supervivencia y poder valorar de esta manera cada marcador por separado y todos ellos en conjunto.

A partir de los datos presentados y con el fin de valorar el posible factor pronóstico de la detección de enfermedad residual para cada uno de los marcadores, se realizaron análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos. Los resultados obtenidos los pasamos a detallar a continuación.

Tabla 28: Datos obtenidos para la totalidad de marcadores en MO al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada. En cada casilla se muestra el número de casos positivos frente a la totalidad de casos estudiados.

	Médula Ósea			
	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3	Todos los estadios
<i>TH</i>	4/49	1/15	12/61	17/125
<i>MAGE-A1</i>	0/25	0/3	4/30	4/58
<i>MAGE-A3</i>	1/25	0/3	2/29	4/57
<i>QF-DCX</i>	6/38	1/15	14/55	21/108
<i>QF-TH</i>	5/35	2/14	11/55	18/104
<i>QF DCX+TH</i>	9/35	3/14	17/55	29/104
<i>GD2</i>	1/6	0/3	5/11	6/20
Cualquier marcador positivo	14/61	3/19	27/81	44/161

Como podemos observar en los datos presentados anteriormente, el mayor número de casos positivos se dan en los pacientes clasificados en estadio 3. El bajo número de pacientes en estadio 2 impide sacar conclusiones en ellos.

De la misma manera que en los datos globales, los marcadores que presentan una mayor tasa de casos positivos son *DCX*, *TH* y *GD2*.

Como ya hemos comentado anteriormente, en el caso de la comparación de los datos obtenidos para *TH* mediante las dos técnicas utilizadas, sigue mostrando una mayor sensibilidad la detección de la expresión del mismo mediante QF-PCR.

En el caso de *MAGE-A1* y *MAGE-A3*, mostraron el menor porcentaje de pacientes positivos. En los pacientes estadio 1 y 2 sólo se detectó un caso con expresión de *MAGE-A1*.

En una primera aproximación, se consideró a todos los pacientes con enfermedad localizada en un único grupo y se realizaron los análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos considerando como factor

pronóstico la expresión o positividad de cada uno de los marcadores analizados.

Los p valores y los gráficos de supervivencia obtenidos se muestran en la Tabla 29 y la Figura 33-A y la Figura 33-B respectivamente.

Tabla 29: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos para cada uno de los marcadores en MO al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada.

Marcador	P-valor (Log-Rank)	
	Supervivencia	Supervivencia Libre de Eventos
<i>TH</i>	0,778	0,094
<i>MAGE-A1</i>	0,270	0,007*
<i>MAGE-A3</i>	0,132	0,000*
<i>QF-DCX</i>	0,429	0,773
<i>QF-TH</i>	0,983	0,270
<i>QF-PCR (DCX+TH)</i>	0,480	0,299
<i>GD2</i>	0,893	0,350
Cualquier Marcador	0,543	0,097

Como se puede ver en la tabla, sólo pudimos observar una correlación estadísticamente significativa entre la supervivencia libre de eventos y la expresión de *MAGE-A1* y *MAGE-A3*. En ambos casos, la expresión de ambos genes demostró ser un factor pronóstico adverso.

Resultados

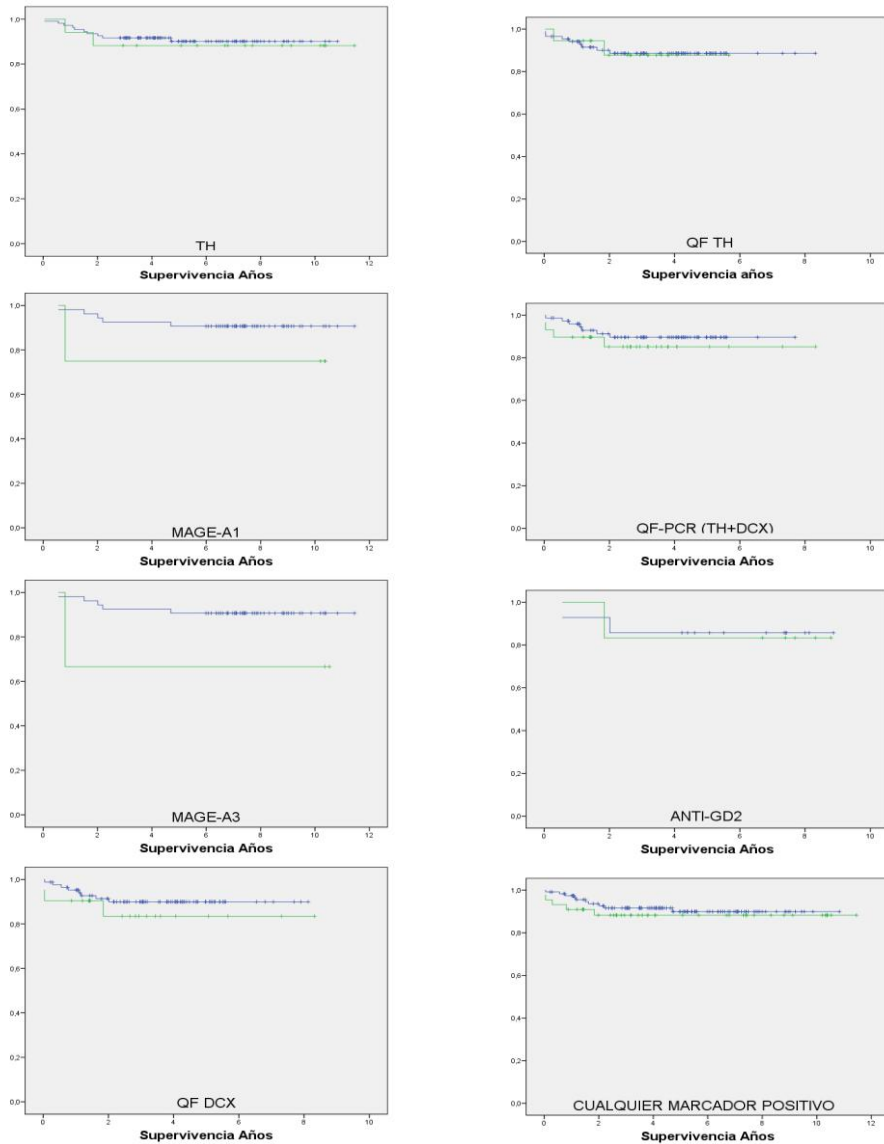


Figura 33-A: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en MO al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada. La curva QF-PCR (*TH+DCX*) representa la combinación de resultados obtenidos por QF-PCR para estos marcadores. La última curva representa la combinación de los resultados de todos los marcadores. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

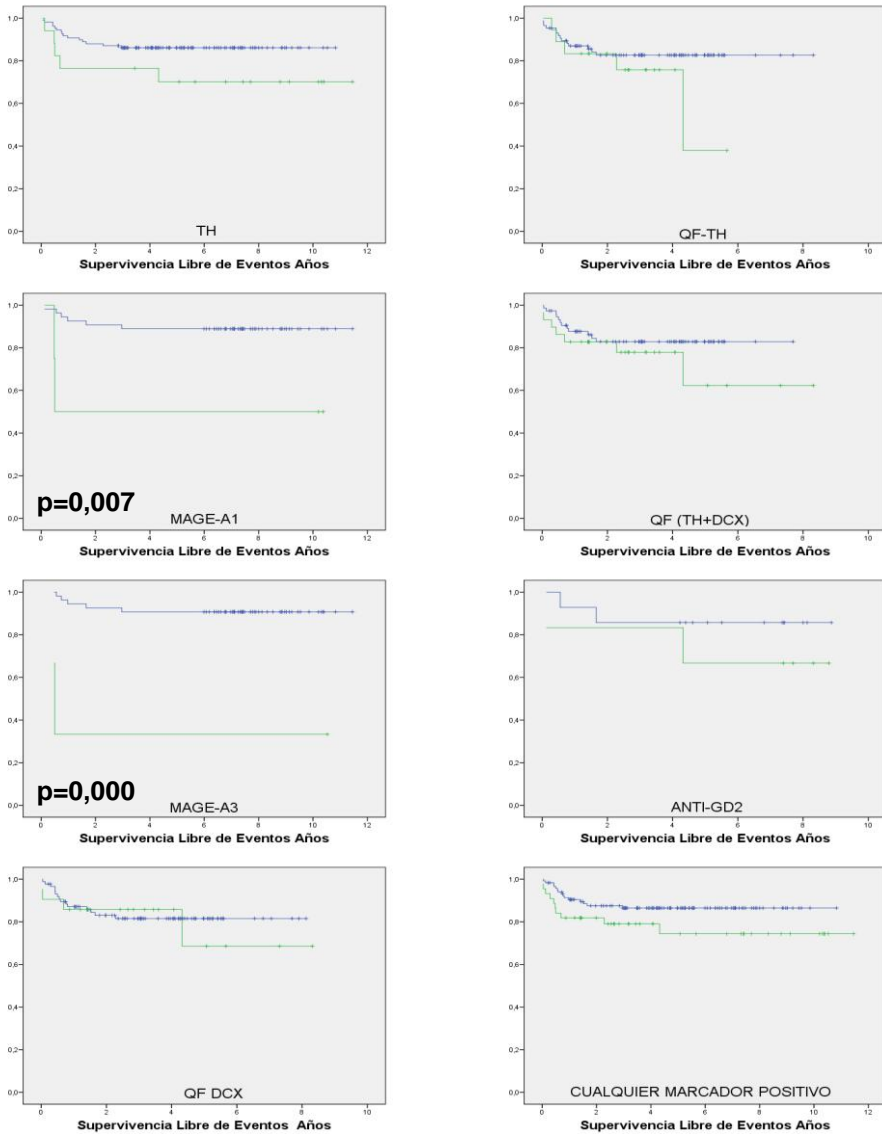


Figura 33-B: Curvas de supervivencia libre de eventos obtenidas para los diferentes marcadores en MO al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada. La curva QF-PCR (*TH+DCX*) representa la combinación de resultados obtenidos por QF-PCR para estos marcadores. La última curva representa la combinación de los resultados de todos los marcadores. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

Finalmente se procedió al análisis de supervivencia separando los casos por estadios. En el caso de los pacientes en estadio 1 y 2, dicho análisis no fue posible ya que en todos los casos los pacientes estaban vivos y sólo hubo cinco recaídas (dos pacientes estadio 1 y tres pacientes estadio 2). De esta manera, el análisis sólo se realizó en los pacientes clasificados en estadio 3.

En este caso sólo pudimos observar una correlación estadísticamente significativa entre la supervivencia libre de eventos y la expresión de *MAGE-A1* ($p=0,0009$), que demostró ser un factor pronóstico adverso. En cuanto a *MAGE-A3*, que en el total de muestras de pacientes con enfermedad localizada mostró el mismo comportamiento, en este caso muestra una tendencia similar sin llegar a la significatividad ($p=0,144$) (Figura 34).

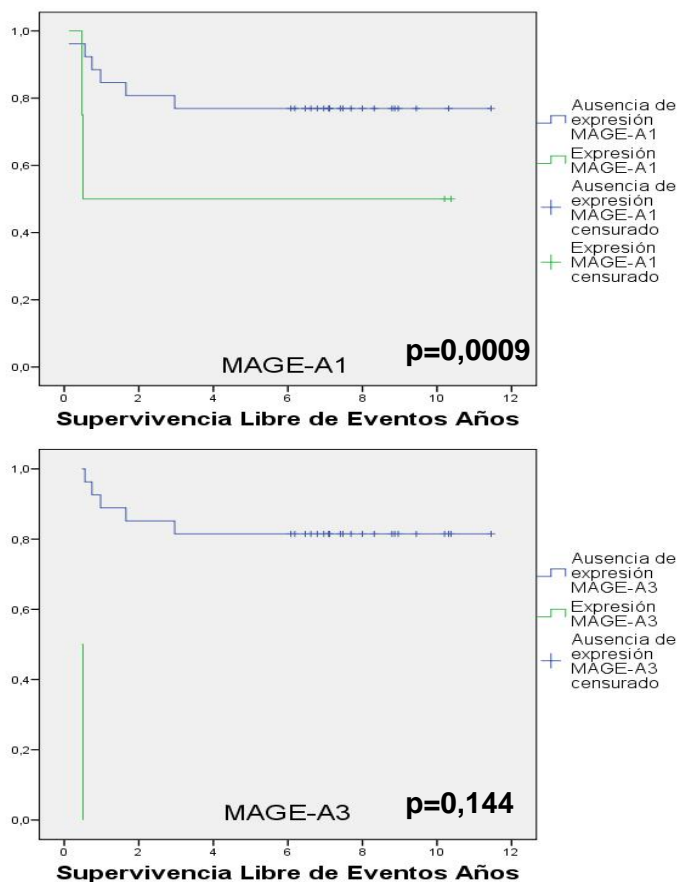


Figura 34: Curvas de supervivencia libre de eventos obtenidas para la expresión de *MAGE-A1* y *MAGE-A3* en muestras de MO al diagnóstico en pacientes estadio 3.

9.1.2- Estudio de EMR en SP al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada.

Para el estudio de EMR al diagnóstico en SP se disponía de muestras de 153 pacientes. Los datos clínicos básicos de los mismos se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30: Distribución y principales características clínicas de la serie de muestras de SP al diagnóstico, en pacientes con enfermedad localizada, utilizadas para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR.

Características	Estadio INSS			Total
	1	2	3	
n	62	16	75	153
Sexo				
Niño	35	8	43	86
Niña	27	8	32	67
Amplificación MYCN				
Amplificado	0	1	18	19
No Amplificado	58	14	50	122
No disponible	4	1	7	12
Edad al diagnóstico				
>18 meses	25	6	44	75
<18 meses	37	10	31	78

Los resultados obtenidos que sirvieron de base para los análisis de supervivencia se muestran en la Tabla 31.

Tabla 31: Datos obtenidos para la totalidad de marcadores estudiados en SP al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada. En cada casilla se muestra el número de casos positivos frente a la totalidad de casos estudiados.

	Sangre Periférica			
	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3	Todos los estadios
<i>TH</i>	3/50	0/10	11/62	14/122
<i>MAGE-A1</i>	0/26	0/2	1/31	1/59
<i>MAGE-A3</i>	1/26	0/2	0/31	1/59
<i>QF-DCX</i>	6/36	0/12	9/47	15/95
<i>QF-TH</i>	5/36	1/12	6/47	12/95
<i>QF DCX+TH</i>	10/36	1/12	11/47	22/95
<i>GD2</i>	1/5	0/1	2/7	3/13
Cualquier marcador positivo	13/62	1/16	21/75	35/153

De manera similar a lo que se observó en las muestras de MO al diagnóstico, el mayor número de casos positivos se dan en los pacientes clasificados en estadio 3, sin embargo, la diferencia no alcanza la significación (test exacto de Fisher). En el caso de la detección de TH, esta tendencia se invierte en la detección mediante QF-PCR. Este mismo fenómeno lo observamos en los datos conjuntos de QF-PCR. En el caso de los pacientes en estadio 2, el bajo número de pacientes no nos permite saber si realmente la expresión de los diferentes marcadores queda en un nivel intermedio entre los pacientes en estadio 1 y 3 o se trata de un fenómeno debido al azar.

De la misma manera que en los datos globales, los marcadores que presentan una mayor frecuencia de casos positivos son *DCX*, *TH* y *GD2*. En el caso de *MAGE-A1* y *MAGE-A3*, mostraron el menor porcentaje de pacientes positivos. Sólo se detectó un caso positivo para *MAGE-A1* en un paciente estadio 3 y un caso positivo para *MAGE-A3* en un paciente estadio 1.

A partir de los datos presentados y con el fin de valorar el posible factor pronóstico de la detección de enfermedad residual para cada uno de los marcadores, se realizaron análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos. Los resultados obtenidos los pasamos a detallar a continuación.

En una primera aproximación, se consideró a todos los pacientes en un único grupo considerando como factor pronóstico la expresión o positividad de cada uno de los marcadores analizados.

Los p valores y los gráficos de supervivencia obtenidos se muestran en la Tabla 32, la Figura 35-A y la Figura 35-B respectivamente.

Tabla 32: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos para cada uno de los marcadores en SP al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada.

Marcador	P-valor (Log-Rank)	
	Supervivencia	Supervivencia Libre de Eventos
<i>TH</i>	0,852	0,332
<i>MAGE-A1</i>	0,006*	0,013*
<i>MAGE-A3</i>	0,762	0,683
<i>QF-DCX</i>	0,138	0,232
<i>QF-TH</i>	0,888	0,817
<i>QF-PCR (DCX+TH)</i>	0,581	0,897
<i>GD2</i>	ND	ND
Cualquier Marcador	0,328	0,571

En el caso de la detección de *GD2* no se pudo calcular la curva de supervivencia porque se censuraron todos los casos.

Como se puede ver en la tabla, sólo pudimos observar una correlación estadísticamente significativa entre la supervivencia libre de eventos y la expresión de *MAGE-A1*. La expresión del gen demostró ser un factor pronóstico adverso, aunque somos conscientes que este resultado se basa en un bajo número de casos.

Resultados

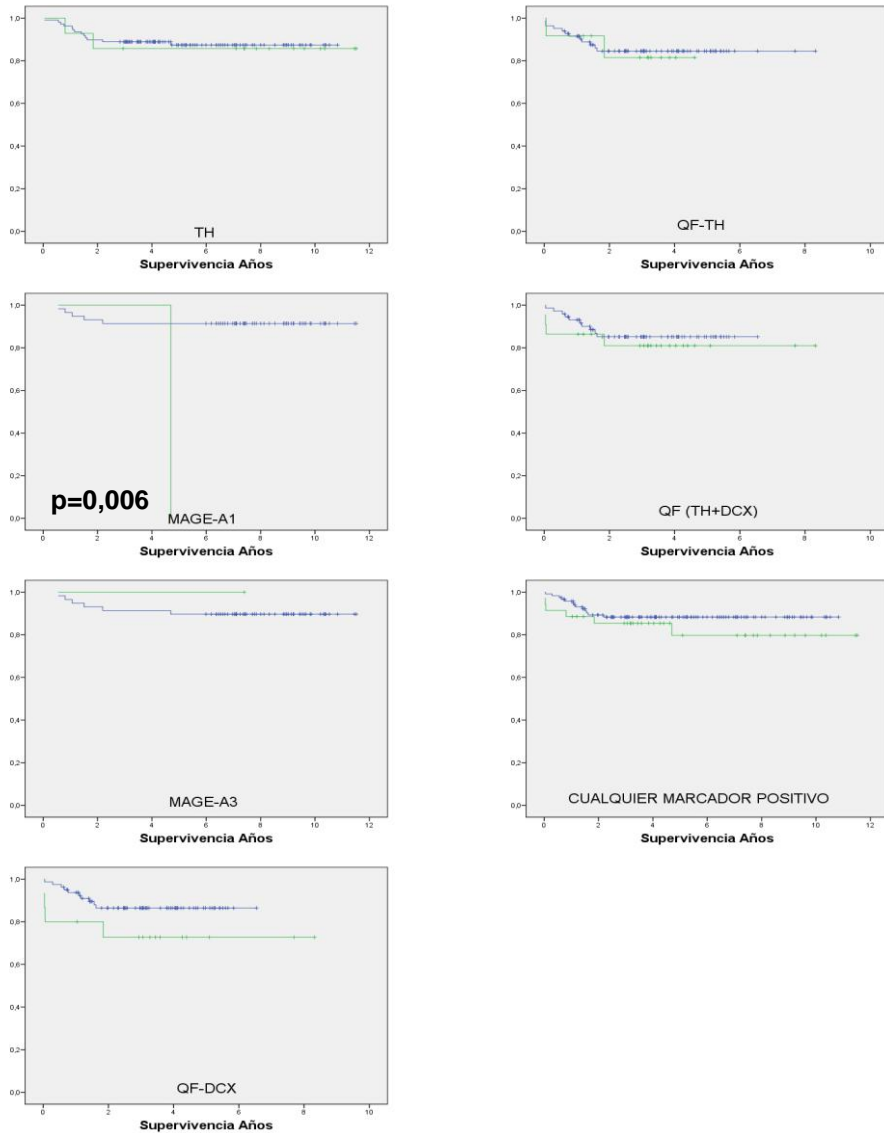


Figura 35-A: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en SP al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada. La curva QF-PCR (TH+DCX) representa la combinación de resultados obtenidos por QF-PCR para estos marcadores. La última curva representa la combinación de los resultados de todos los marcadores. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

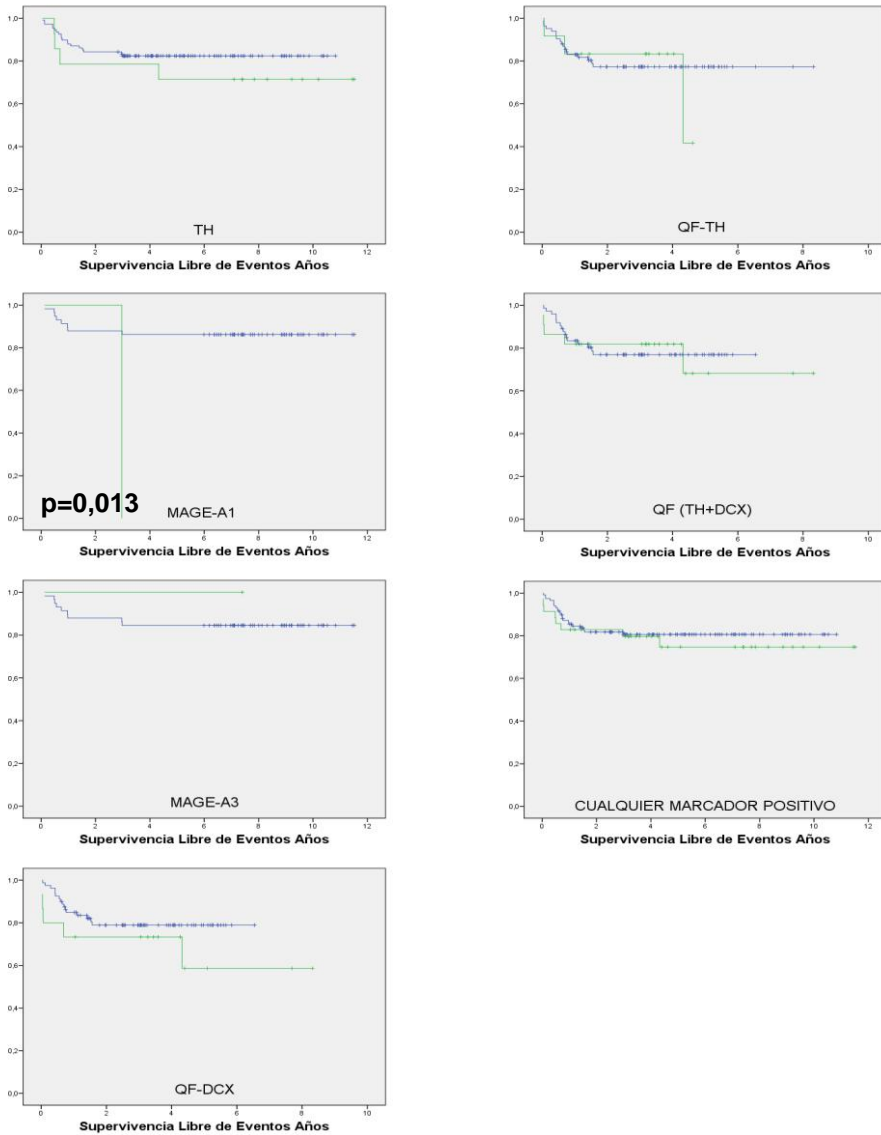


Figura 35-B: Curvas de supervivencia libre de eventos obtenidas para los diferentes marcadores en SP al diagnóstico en pacientes con enfermedad localizada. La curva QF-PCR (TH+DCX) representa la combinación de resultados obtenidos por QF-PCR para estos marcadores. La última curva representa la combinación de los resultados de todos los marcadores. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

Siguiendo el esquema utilizado en la MO, se procedió al análisis de supervivencia separando los casos por estadios. En el caso de los pacientes en estadio 1 y 2, como en el caso anterior, el análisis no fue posible ya que en todos los casos los pacientes estaban vivos, y sólo hubo seis recaídas (dos pacientes estadio 1 y cuatro pacientes estadio 2). De esta manera, el análisis sólo se realizó en los pacientes clasificados en estadio 3.

En este caso no pudimos observar ninguna correlación estadísticamente significativa entre la supervivencia o la supervivencia libre de eventos y la expresión de ninguno de los marcadores. En el caso de *MAGE-A1*, que en el análisis con el total de las muestras de pacientes con enfermedad localizada sí que mostró una correlación estadísticamente significativa, no la alcanzó con las muestras de los pacientes estadio 3. Los resultados se muestran en la Figura 36.

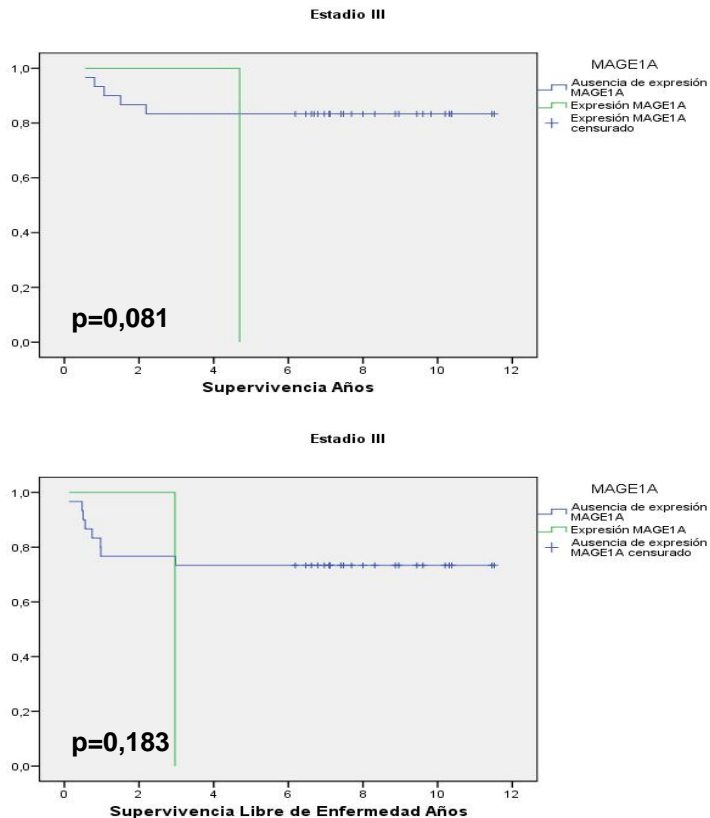


Figura 36: Curvas de supervivencia y supervivencia libre de eventos obtenidas para la expresión de *MAGE-A1* en muestras de SP al diagnóstico en pacientes estadio 3.

9.2.- Estudio de EMR en pacientes con enfermedad localizada en la recaída.

Para el presente apartado se seleccionaron las muestras de MO y SP de pacientes que sufrieron una recaída. Al tratarse de pacientes con enfermedad localizada, existen muy pocos casos en los que se produjo dicho evento. Aunque se disponía de pocas muestras, se decidió analizar los datos obtenidos en las mismas, ya que los resultados, aunque probablemente no tuvieran mucha entidad, sí que podrían mostrar posibles tendencias que se podrían llegar a observar en una serie más grande.

Como se realizó en el grupo de muestras al diagnóstico, la primera aproximación en el análisis de datos fue el estudio de las frecuencias de casos positivos de manera global tanto en MO como en SP, los resultados obtenidos los podemos observar en la Tabla 33. Como hemos hecho anteriormente, se ha trabajado con una muestra por paciente, fusionando los datos de los aspirados de MO, en el caso de que hubiese más de uno en la recaída.

Tabla 33: Tabla de datos obtenidos en el total de las muestras de MO y SP en la recaída en pacientes con enfermedad localizada.

	<i>TH</i>	<i>MAGE-A1</i>	<i>MAGE-A3</i>	<i>QF-DCX</i>	<i>QF-TH</i>	<i>GD2</i>
MO +	7	2	2	5	5	3
n	12	7	7	11	10	3
SP +	2	0	0	3	4	0
n	13	9	5	10	10	2

De forma contraria que en el análisis realizado al diagnóstico, en este grupo de pacientes, observamos un alto porcentaje de pacientes positivos para los diferentes marcadores en la recaída. De la misma manera, el porcentaje de muestras positivas es mayor en los aspirados de médula ósea que en las muestras de sangre periférica.

El mayor grado de detección de células tumorales se obtuvo mediante inmunocitología para GD2 en MO, pero sólo se disponía de tres muestras, por lo que el dato es poco fiable.

Los siguientes marcadores con índice de detección más elevado fueron *DCX* y *TH*, con unos resultados muy homogéneos, obteniéndose un mayor número de casos positivos para *TH* tanto en MO como en SP.

Sorprende también el porcentaje de casos positivos para *TH* detectados mediante Southern blot en MO que son ligeramente superiores a los

obtenidos mediante QF-PCR, ya que en el resto de análisis, tanto globales como pormenorizados, observamos el fenómeno contrario.

La combinación de todos los datos obtenidos nos permitió observar que en un 75% de las MO y en un 33% de las SP, al menos uno de los marcadores demostró la posible existencia de células tumorales circulantes en pacientes con enfermedad localizada en el momento de la recaída.

9.2.1- Estudio de EMR en MO en la recaída de pacientes con enfermedad localizada.

Para el estudio de EMR en la recaída se disponía de muestras de 16 pacientes. Los datos clínicos básicos de los mismos se muestran en la Tabla 34

Tabla 34: Distribución y principales características de la serie de muestras de MO utilizadas para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR en la recaída en pacientes con enfermedad localizada.

Características	Estadio INSS			Total
	1	2	3	
n	1	4	11	16
Sexo				
Niño	0	1	5	6
Niña	1	3	6	10
Amplificación MYCN				
Amplificado	0	0	4	4
No Amplificado	1	4	6	11
No disponible	0	0	1	1
Edad al diagnóstico				
>18 meses	0	2	7	9
<18 meses	1	2	4	7

Los resultados obtenidos que sirvieron de base para los análisis de supervivencia se muestran en la Tabla 33. En este caso se decidió no separarlos por estadios debido al bajo número de muestras disponibles.

Los p valores y los gráficos de supervivencia obtenidos se muestran en la Tabla 35 y la Figura 37.

Tabla 35: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia para cada uno de los marcadores analizados.

Marcador	P-valor (Log-Rank)
	Supervivencia
<i>TH</i>	0,107
<i>MAGE-A1</i>	0,187
<i>MAGE-A3</i>	0,429
<i>QF-DCX</i>	0,003*
<i>QF-TH</i>	0,105
<i>QF-PCR (DCX+TH)</i>	0,004*
GD2	ND
Cualquier Marcador	0,054

En el caso de la detección de GD2 no se pudo calcular la curva de supervivencia porque se censuraron todos los casos.

En este análisis pudimos observar una asociación entre la expresión de *DCX*, *DCX+TH* o la expresión de cualquiera de los marcadores y la supervivencia de los pacientes. Esta asociación fue estadísticamente significativa en el caso de *DCX* y la expresión conjunta de *DCX* y *TH*, en el caso de la expresión de cualquiera de los marcadores, el p valor calculado está próximo a la significatividad.

En todos los casos mencionados, dicha asociación se daba con un mal pronóstico de la enfermedad. De todos modos, como ya hemos expresado anteriormente, el pequeño tamaño muestral, nos obliga a considerar con mucha cautela los resultados obtenidos.

Resultados

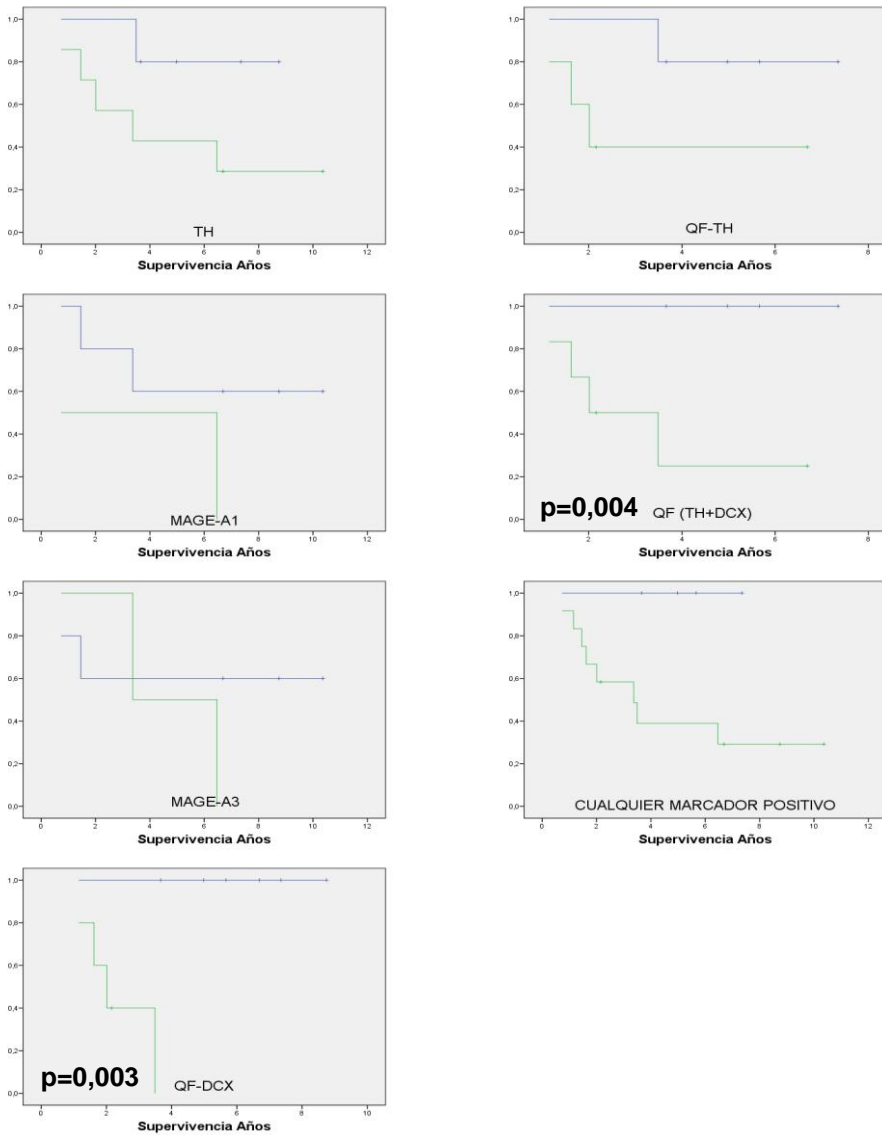


Figura 37: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en MO en la recaída en pacientes con enfermedad localizada. La curva QF-PCR (TH+DCX) representa la combinación de resultados obtenidos por QF-PCR para estos marcadores. La última curva representa la combinación de los resultados de todos los marcadores. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

9.2.2- Estudio de EMR en SP en la recaída en pacientes con enfermedad localizada.

Para el estudio de EMR en la recaída se disponía de muestras de 18 pacientes. Los datos clínicos básicos de los mismos se muestran en la Tabla 36.

Tabla 36: Distribución y principales características de la serie de muestras de SP utilizadas para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR en la recaída en pacientes con enfermedad localizada.

Características	Estadio INSS			Total
	1	2	3	
n	1	4	13	18
Sexo				
Niño	0	1	8	9
Niña	1	3	5	9
Amplificación MYCN				
Amplificado	0	0	4	4
No Amplificado	1	4	7	12
No disponible	0	0	2	2
Edad al diagnóstico				
>18 meses	0	2	10	12
<18 meses	1	2	3	6

Los resultados obtenidos que sirvieron de base para los análisis de supervivencia se muestran en la Tabla 33. En este caso, como en la MO, se decidió no separarlos por estadios debido al bajo número de muestras disponibles.

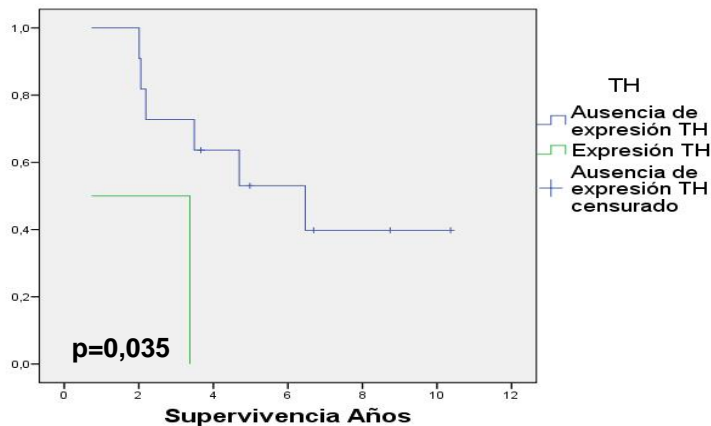
Los p valores obtenidos se muestran en la Tabla 37.

Tabla 37: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia para cada uno de los marcadores en SP en pacientes con enfermedad localizada en la recaída.

Marcador	P-valor (Log-Rank)
	Supervivencia
<i>TH</i>	0,035*
<i>MAGE-A1</i>	ND
<i>MAGE-A3</i>	ND
<i>QF-DCX</i>	0,017*
<i>QF-TH</i>	0,156
<i>QF-PCR (DCX+TH)</i>	0,156
GD2	ND
Cualquier Marcador	0,073

En la detección de GD2, *MAGE-A1* y *MAGE-A3* no se pudo calcular la curva de supervivencia. Esto se debió a que se censuraron todos los casos en el caso de GD2 y en el caso de *MAGE-A1* y *MAGE-A3*, no se detectó expresión en ninguna de las muestras, por lo que sólo existe un valor para cada estado.

Como observamos en la tabla, sólo en la detección de *TH* mediante Southern blot y *DCX* se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes con diferencias de expresión en los mismos. La figura 38 muestra las dos curvas obtenidas para ambos.



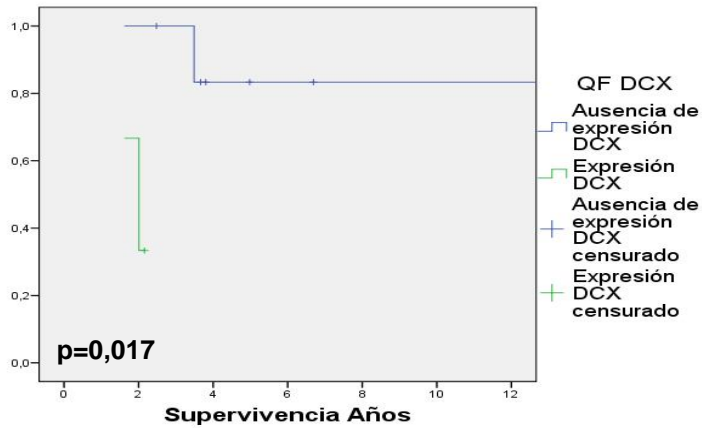


Figura 38: Curvas de supervivencia obtenidas para *TH* (Southern blot) y *DCX* en SP en la recaída en pacientes con enfermedad localizada.

10.- Resultados del estudio de EMR en pacientes estadio 4S.

Para el siguiente apartado se disponía de datos de 35 pacientes con diagnóstico de neuroblastoma estadio 4S. Sin embargo, no se disponía de muestras de MO y SP de todos ellos así como datos de todos los marcadores estudiados a lo largo del trabajo.

Al tratarse de un número reducido, el único momento del que disponíamos de muestras homogéneas para la realización de cualquier tipo de análisis fue al diagnóstico de la enfermedad. El resto de muestras procesadas pertenecían a diferentes momentos, lo que no nos permitió un análisis detallado por momentos del tratamiento.

Para el análisis de la presencia de enfermedad residual, se seleccionaron aquellos pacientes de los que se disponía de muestra de MO o SP en el momento del diagnóstico.

En una primera aproximación, se calculó la frecuencia de casos positivos de manera global tanto en MO como en SP, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 38. En el caso de existir varias muestras de MO, se fusionaron los datos. Se consideró la positividad de cada marcador tanto si era positivo en ambas o si lo era en sólo una.

Tabla 38: Frecuencia relativa de la expresión de cada marcador en el total de las muestras de MO y SP al diagnóstico en pacientes estadio 4S.

	<i>TH</i>	<i>MAGE-A1</i>	<i>MAGE-A3</i>	<i>QF-DCX</i>	<i>QF-TH</i>	<i>GD2</i>
% MO +	56,3	7,1	0	80	60	50
n	16	14	14	10	10	2
% SP +	45,5	0	0	33,3	55,6	100
n	11	9	9	9	9	1

Como podemos observar en los datos presentados, los marcadores que mostraron un mayor porcentaje de casos positivos tanto en SP como en MO fueron *TH* y *DCX*. El caso de *GD2* no lo consideramos ya que sólo se estudiaron dos muestras de MO y una de SP. En el caso de *MAGE-A1* y *MAGE-A3*, sólo en una muestra de MO se detectó expresión del primero.

En todos los casos, el porcentaje de muestras de MO en las que se detectó la expresión de cualquiera de los marcadores fue mayor que en SP. Si consideramos la combinación de *TH* y *DCX* un 80% de las muestras de MO y un 44% de las de SP al diagnóstico mostraron la presencia de células tumorales. La combinación de cualquier marcador positivo arrojó datos similares en ambos tejidos.

El análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos en SP y MO no fue posible por ausencia de eventos ya que en algunos casos existía un solo valor para cada estado, y en los casos en que sí existían dos valores por estado, se censuraron todos los casos.

11.- Resultados del estudio de EMR en pacientes del grupo de Alto Riesgo.

Para el abordaje del presente apartado partimos de un total de 1208 muestras pertenecientes a 178 pacientes clasificados como de Alto Riesgo. Esta categoría, incluye a los pacientes estadio 4, a excepción de los menores de 18 meses sin *MYCN* amplificado, y los pacientes estadio 2 y 3 con amplificación de *MYCN*. De esta manera los pacientes se distribuyen en 3 pacientes estadio 2, 27 pacientes estadio 3 y 148 pacientes estadio 4.

Del total de la muestras, se disponía de 661 MO, 470 SP, 61 AF y 16 T. Los estudios de los tumores ya los tratamos en un apartado anterior. Por otra parte, a pesar del gran número de muestras, como observaremos posteriormente, muchas de ellas no nos fueron de utilidad en los análisis realizados en esta sección del trabajo. La razón principal es que muchas de ellas pertenecen a diversos momentos del tratamiento no homogéneos. Por

ello, los resultados de este apartado se centran en dos momentos: el diagnóstico de la enfermedad y la evaluación de los pacientes tras la quimioterapia de inducción, por la importancia del momento y por el número de muestras disponibles. Aunque no existe un gran número de muestras, como en el caso de los pacientes con enfermedad localizada, dedicaremos también un apartado al estudio de las muestras de la recaída. Finalmente también describiremos los resultados obtenidos en las aféresis.

11.1.- Estudio de EMR en pacientes de alto riesgo al diagnóstico.

Para el análisis de la presencia de enfermedad residual, se seleccionaron aquellos pacientes de los que se disponía de muestra de MO o SP en el momento del diagnóstico.

En una primera aproximación, se calcularon las frecuencias de casos positivos de manera global tanto en MO como en SP, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 39. Posteriormente ya se analizaron pormenorizadamente todos ellos.

Tabla 39: Tabla de datos obtenidos en el total de las muestras de MO y SP al diagnóstico en pacientes de alto riesgo.

	<i>TH</i>	<i>MAGE-A1</i>	<i>MAGE-A3</i>	<i>QF-DCX</i>	<i>QF-TH</i>	<i>GD2</i>
% MO +	62,5	36,4	50	77	75,9	78,6
n	80	44	44	87	87	28
% SP +	42,3	12,8	23,1	65,2	58	55,6
n	71	39	39	69	69	18

El análisis de los datos nos permitió observar una elevada frecuencia de pacientes en los que fueron positivos los diferentes marcadores utilizados al diagnóstico.

Se obtuvo un porcentaje muy similar de detección de células tumorales tanto en los estudios mediante inmunocitología para GD2 como en los estudios de expresión de *DCX* y *TH* mediante QF-PCR. Estos tres marcadores fueron los que demostraron un mayor número de pacientes positivos. El dato es sorprendente, ya que la sensibilidad teórica de la técnica inmunohistoquímica es inferior a la de la PCR. En este caso, al tratarse de muestras al diagnóstico en pacientes en su mayoría con enfermedad diseminada, la sensibilidad en este momento no debería ser limitante, ya que se espera alto grado de infiltración de células tumorales en MO.

Los marcadores que demostraron una menor tasa de positivos fueron *MAGE-A1* y *MAGE-A3*, siendo la tasa de positividad mayor en el segundo de ellos.

La combinación de todos los datos obtenidos nos permitió observar que en un 79,8% de las muestras de MO y en un 68,2% de las de SP, al menos uno de los marcadores demostró la existencia de células tumorales en estos tejidos en pacientes de alto riesgo al diagnóstico.

11.1.1- Estudio de EMR en MO en pacientes de alto riesgo al diagnóstico.

El presente apartado se desarrolló con los resultados obtenidos en 104 pacientes de los que de disponía de muestra de MO al diagnóstico. Los datos clínicos básicos de los mismos se muestran en la Tabla 40.

Tabla 40: Distribución y principales características de la serie de muestras de MO utilizadas para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR al diagnóstico en pacientes de alto riesgo.

Características	Estadio INSS			Total
	2	3	4	
n	3	15	86	104
Sexo				
Niño	0	12	55	67
Niña	3	3	31	37
Amplificación MYCN				
Amplificado	3	15	45	63
No Amplificado	0	0	32	32
No disponible	0	0	9	9
Edad al diagnóstico				
>18 meses	1	12	75	88
<18 meses	2	3	11	16

Los resultados obtenidos que sirvieron de base para los análisis de supervivencia se muestran en la Tabla 41.

Tabla 41: Datos obtenidos para la totalidad de marcadores en MO al diagnóstico en pacientes de alto riesgo. En cada casilla se muestra el número de casos positivos frente a la totalidad de casos estudiados.

	Médula Ósea			
	Estadio 2	Estadio 3	Estadio 4	Todos los estadios
<i>TH</i>	1/3	3/13	46/64	50/80
<i>MAGE-A1</i>	0/1	0/4	16/39	16/44
<i>MAGE-A3</i>	0/1	0/4	22/39	22/44
<i>QF-DCX</i>	1/3	4/15	62/69	67/87
<i>QF-TH</i>	0/3	3/15	63/69	66/87
<i>QF DCX+TH</i>	1/3	5/15	63/69	69/87
<i>GD2</i>	0/2	3/6	19/20	22/28
Cualquier marcador positivo	1/3	6/15	76/86	83/104

Como se puede observar en los datos presentados en la tabla, existe una marcada diferencia entre las frecuencias de expresión de los diferentes marcadores en los distintos estadios dentro del grupo de pacientes de alto riesgo. El porcentaje de casos positivos en los pacientes estadio 4 es, en la mayoría de casos, el doble que en los estadios 2 y 3. En algunos casos, observamos un mayor porcentaje de positividad en pacientes en estadio 2 que en pacientes en estadio 3, pero el escaso número de muestras disponibles de casos de alto riesgo en estadio 2 al diagnóstico ($n=3$) hace que no podamos tener este dato en consideración. Por otra parte, no se aprecian diferencias significativas entre los pacientes estadio 2 y 3, a pesar del pequeño número de muestras.

Los marcadores que mostraron una menor tasa de casos positivos fueron *MAGE-A1* y *MAGE-A3*, siendo en este caso *MAGE-A1*, el marcador que menor porcentaje de MO positivas al diagnóstico mostró.

Por otra parte, los marcadores que demostraron una mayor tasa de detección de células tumorales fueron *GD2*, *DCX* y *TH*, con porcentajes muy similares, rondando en todos los casos el 80% de las muestras estudiadas.

A partir de los datos presentados y con el fin de valorar el posible valor pronóstico de la detección de enfermedad residual al diagnóstico para cada uno de los marcadores, se realizaron análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos.

Al tratarse de pacientes de alto riesgo y no disponer de un elevado número de ellos en estadio 2, se trataron todos los pacientes en un único grupo y después separadamente los pacientes estadio 3 y 4 únicamente.

Los p valores y los gráficos de supervivencia obtenidos se muestran en la Tabla 42, la Figura 39-A y la Figura 39-B.

Tabla 42: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos para cada uno de los marcadores analizados en MO al diagnóstico en pacientes de alto riesgo.

Marcador	P-valor (Log-Rank)	
	Supervivencia	Supervivencia Libre de Eventos
<i>TH</i>	0,716	0,836
<i>MAGE-A1</i>	0,948	0,352
<i>MAGE-A3</i>	0,200	0,296
<i>QF-DCX</i>	0,711	0,567
<i>QF-TH</i>	0,958	0,182
<i>QF-PCR (DCX+TH)</i>	0,444	0,581
<i>GD2</i>	0,925	0,379
Cualquier Marcador	0,913	0,667

Como podemos observar, no existen diferencias significativas entre la expresión de los diferentes marcadores analizados en MO al diagnóstico y la supervivencia o supervivencia libre de eventos en los pacientes analizados.

En los análisis de supervivencia realizados separadamente para los pacientes estadio 3 o 4, tampoco observamos diferencias significativas entre la expresión de los diferentes marcadores y la supervivencia o la supervivencia libre de eventos.

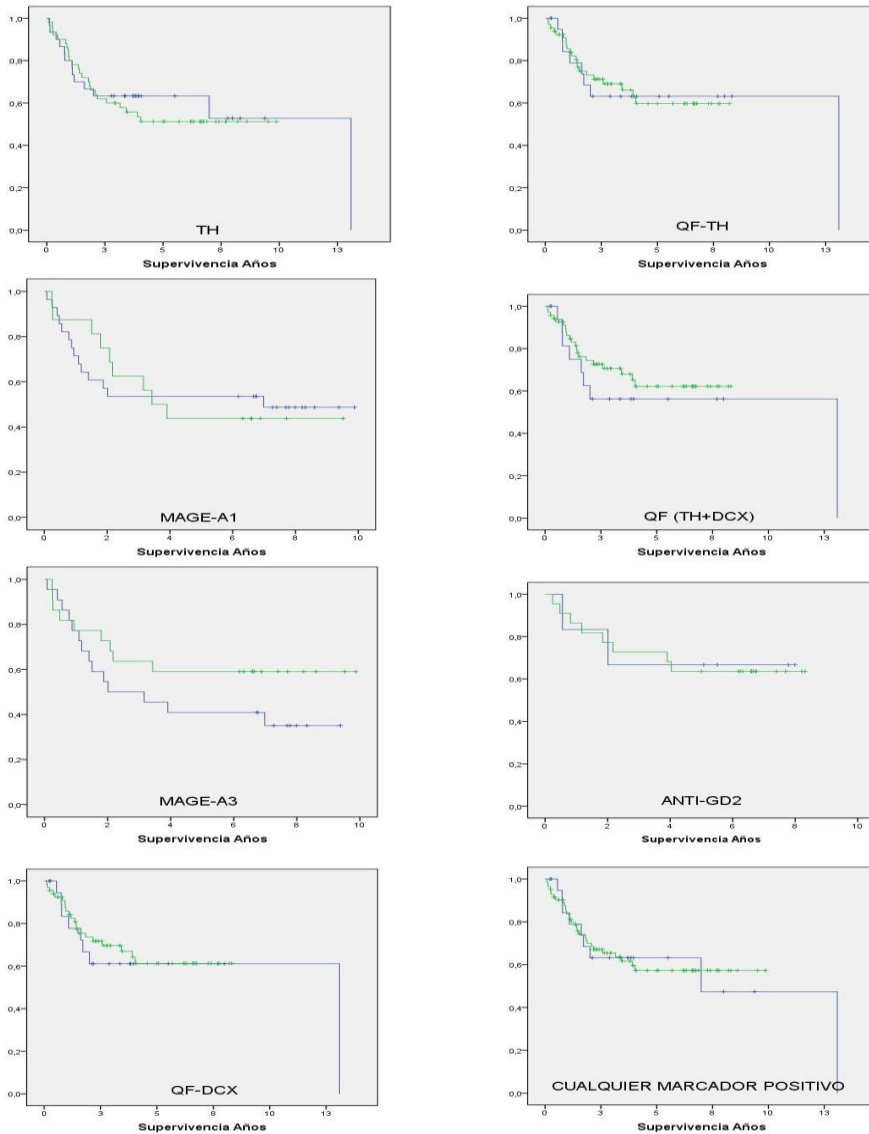


Figura 39-A: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en MO al diagnóstico en pacientes de alto riesgo. La curva QF-PCR (*TH+DCX*) representa la combinación de resultados obtenidos por QF-PCR para estos marcadores. La última curva representa la combinación de los resultados de todos los marcadores. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

Resultados

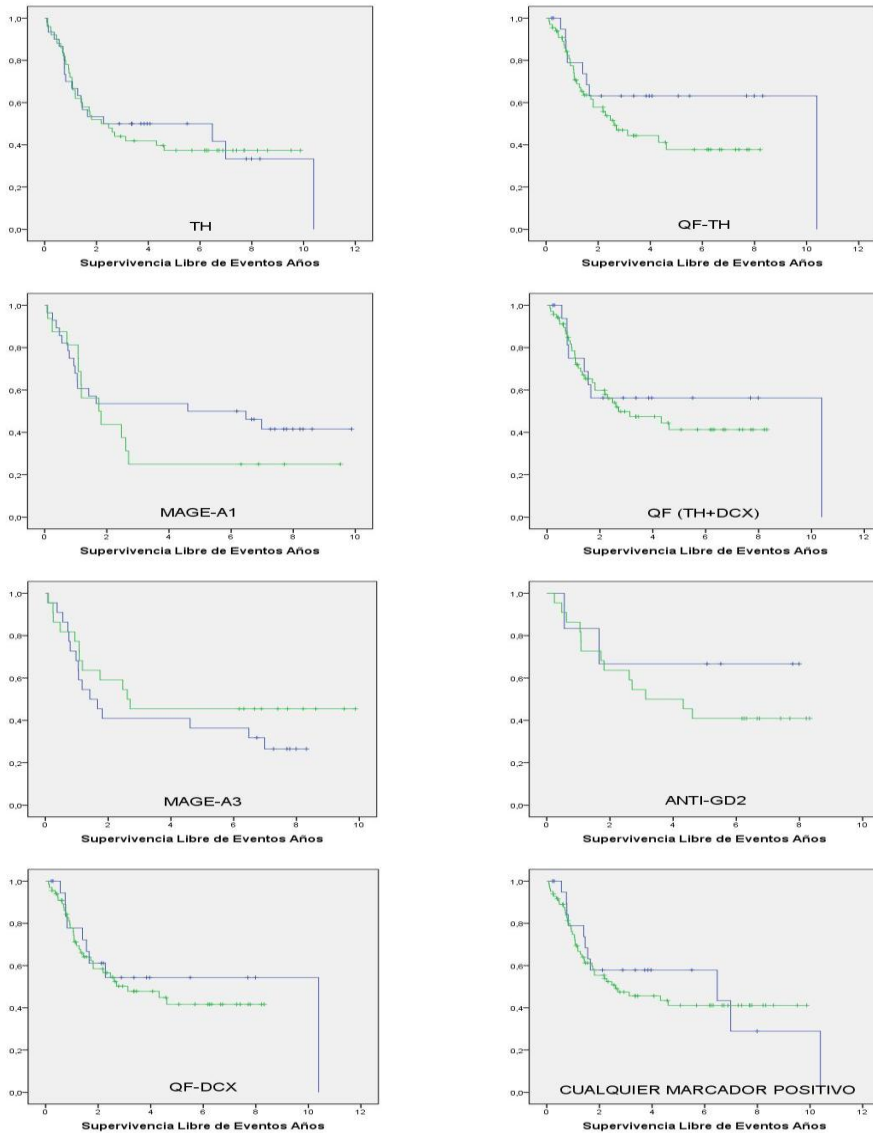


Figura 39-B: Curvas de supervivencia libre de eventos obtenidas para los diferentes marcadores en MO al diagnóstico en pacientes de alto riesgo. La curva QF-PCR ($TH+DCX$) representa la combinación de resultados obtenidos por QF-PCR para estos marcadores. La última curva representa la combinación de los resultados de todos los marcadores. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

11.1.2- Estudio de EMR en SP en pacientes de alto riesgo al diagnóstico.

El presente apartado se desarrolló con los resultados obtenidos en 88 pacientes de los que de disponía de muestra de SP al diagnóstico. Los datos clínicos básicos se muestran en la Tabla 43.

Tabla 43: Distribución y principales características de la serie de muestras SP utilizadas, para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR en pacientes de alto riesgo al diagnóstico.

Características	Estadio INSS			Total
	2	3	4	
n	1	14	73	88
Sexo				
Niño	0	11	45	56
Niña	1	3	28	32
Amplificación MYCN				
Amplificado	1	14	31	46
No Amplificado	0	0	28	28
No disponible	0	0	14	14
Edad al diagnóstico				
>18 meses	1	12	65	78
<18 meses	0	2	8	10

Los resultados obtenidos que sirvieron de base para los análisis de supervivencia se muestran en la Tabla 44.

Tabla 44: Datos obtenidos para la totalidad de marcadores en SP al diagnóstico en pacientes de alto riesgo. En cada casilla se muestra el número de casos positivos frente a la totalidad de casos estudiados.

	Sangre Periférica			
	Estadio 2	Estadio 3	Estadio 4	Todos los estadios
<i>TH</i>	0/1	4/14	26/56	30/71
<i>MAGE-A1</i>	0/0	0/4	5/35	5/39
<i>MAGE-A3</i>	0/0	0/4	9/35	9/39
<i>QF-DCX</i>	0/1	4/13	41/55	45/69
<i>QF-TH</i>	1/1	2/13	37/55	40/69
<i>QF DCX+TH</i>	1/1	4/13	45/55	50/69
<i>GD2</i>	0/1	1/3	9/15	10/19
Cualquier marcador positivo	1/1	5/14	54/73	60/88

De manera similar a lo que observamos en la MO al diagnóstico, existe una marcada diferencia entre la frecuencia de expresión de los diferentes marcadores en los diferentes estadios dentro del grupo de pacientes de alto riesgo. El porcentaje de casos positivos en los pacientes estadio 4 es en la mayoría de casos mucho más del doble que en los estadios 3.

Los marcadores que mostraron una menor tasa de casos positivos fueron igualmente *MAGE-A1* y *MAGE-A3*.

Por otra parte, los marcadores que demostraron una mayor tasa de detección de células tumorales fueron *GD2*, *DCX* y *TH*, con porcentajes muy similares rondando en todos los casos el 60% y 70% respectivamente de las muestras.

Al tratarse de pacientes de alto riesgo y disponer sólo de una muestra de un paciente en estadio 2, se trataron todos los pacientes en un único grupo y después separadamente para los estadios 3 y 4.

Los p valores y los gráficos de supervivencia obtenidos se muestran en la Tabla 45 y la Figura 40-A y la Figura 40-B.

Tabla 45: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos para cada uno de los marcadores en SP al diagnóstico en pacientes de alto riesgo.

Marcador	P-valor (Log-Rank)	
	Supervivencia	Supervivencia Libre de Eventos
<i>TH</i>	0,412	0,420
<i>MAGE-A1</i>	0,223	0,478
<i>MAGE-A3</i>	0,049*	0,163
<i>QF-DCX</i>	0,199	0,774
<i>QF-TH</i>	0,714	0,494
<i>QF-PCR (DCX+TH)</i>	0,248	0,738
<i>GD2</i>	0,086	0,051
Cualquier Marcador	0,246	0,423

Como se puede ver en la tabla, sólo pudimos observar una correlación estadísticamente significativa entre la supervivencia y la expresión de *MAGE-A3*. La expresión de *MAGE-A3* en SP al diagnóstico en pacientes de alto riesgo, demostró ser un factor pronóstico adverso. La detección de *GD2* también mostró una tendencia similar, tanto en la supervivencia como en la supervivencia libre de eventos quedándose en ambos casos al borde de la significatividad.

Resultados

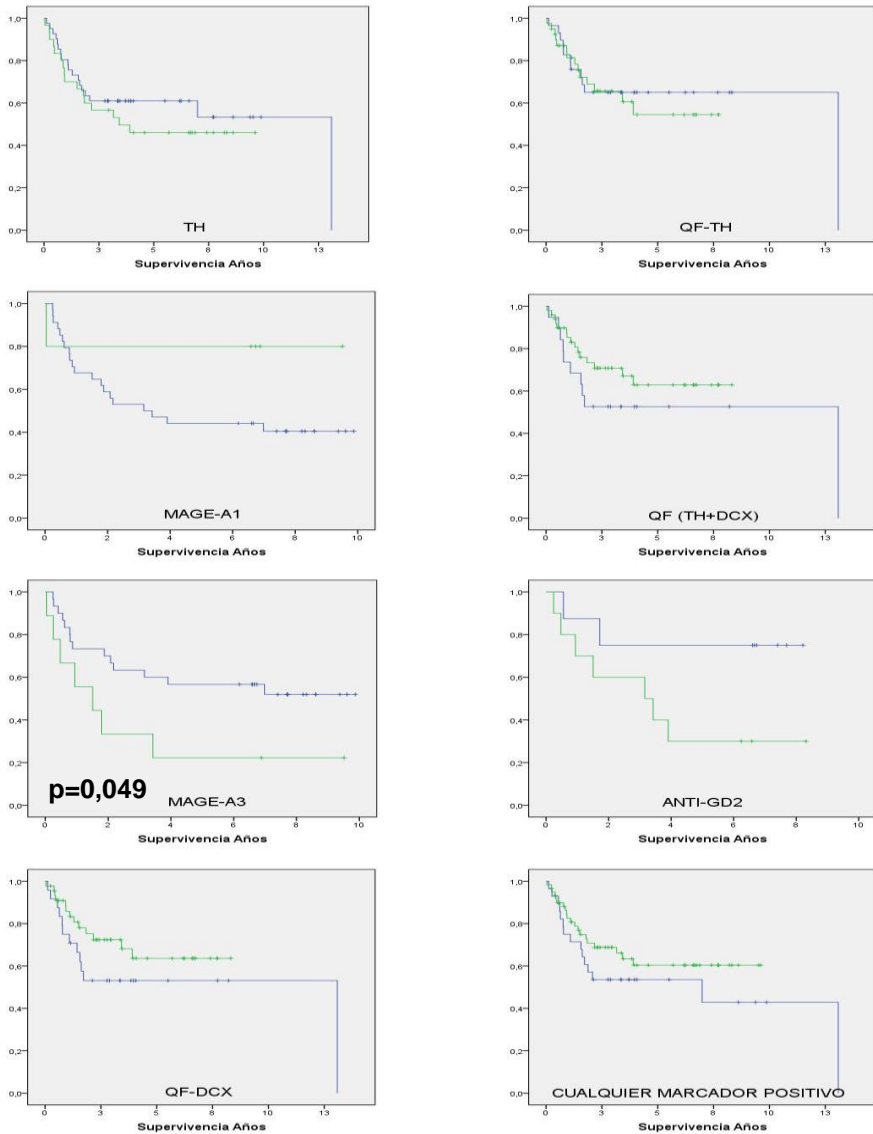


Figura 40-A: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en SP al diagnóstico en pacientes de alto riesgo. La curva QF-PCR (TH+DCX) representa la combinación de resultados obtenidos por QF-PCR para estos marcadores. La última curva representa la combinación de los resultados de todos los marcadores. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

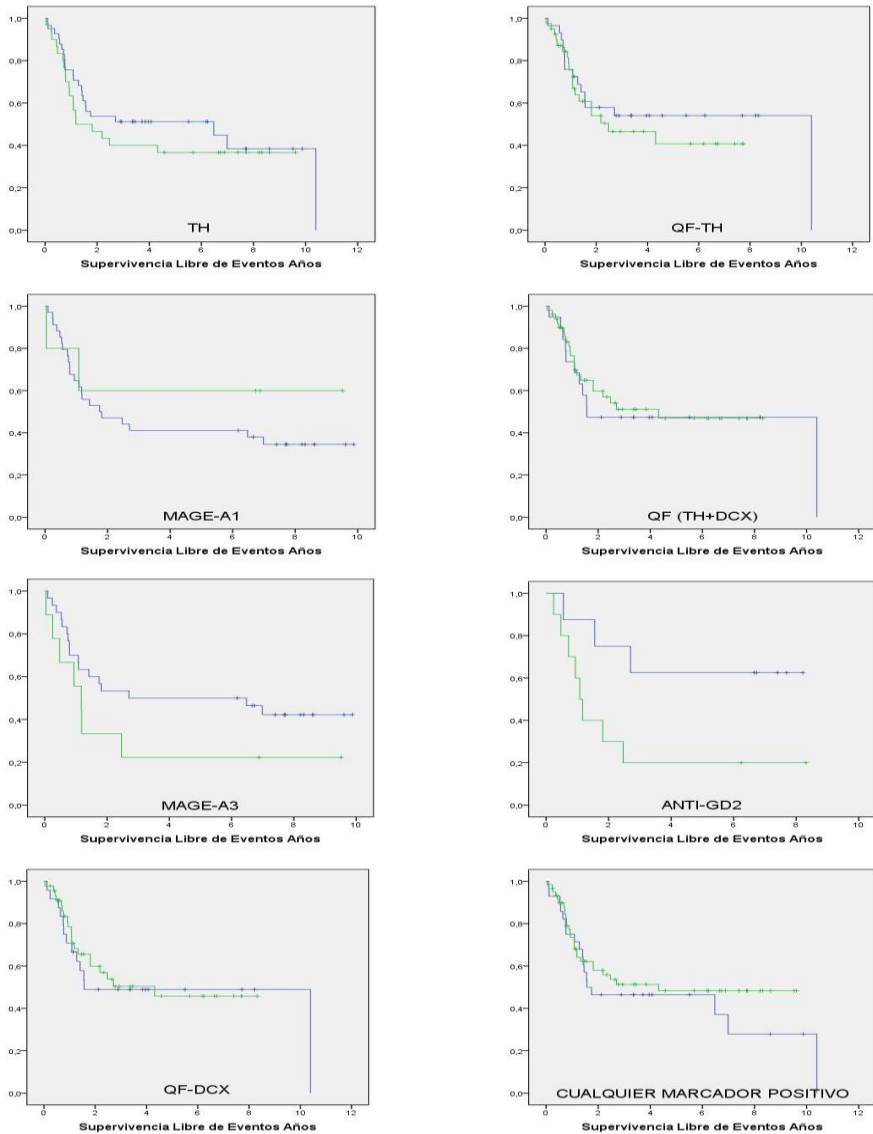
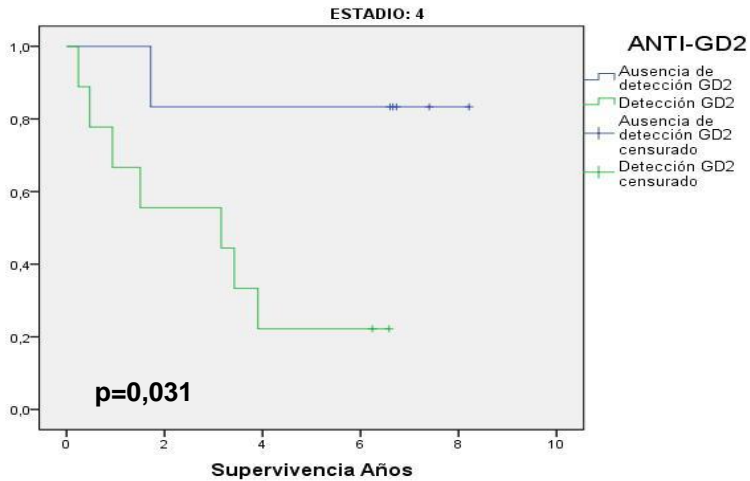


Figura 40-B: Curvas de supervivencia libre de eventos obtenidas para los diferentes marcadores en SP al diagnóstico en pacientes de alto riesgo. La curva QF-PCR (TH+DCX) representa la combinación de resultados obtenidos por QF-PCR para estos marcadores. La última curva representa la combinación de los resultados de todos los marcadores. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

Como en el caso de la MO, se realizó el análisis de supervivencia por separado para los pacientes estadio 3 y 4. En este caso sí que se observaron diferencias significativas tanto en la supervivencia como en la supervivencia libre de eventos en los pacientes estadio 4 que fueron positivos para GD2. La presencia de células tumorales, detectadas mediante este marcador, resultó ser un factor de pronóstico adverso para la enfermedad. Las gráficas de supervivencia para GD2 se muestran en la Figura 41.

La expresión de *MAGE-A3* detectada en los pacientes estadio 4, en el análisis de la supervivencia global, mostró una tendencia similar a la observada en la serie global de alto riesgo quedando cerca de la significatividad. Para el resto de marcadores, no se observaron diferencias significativas entre la presencia o ausencia de expresión y la supervivencia.



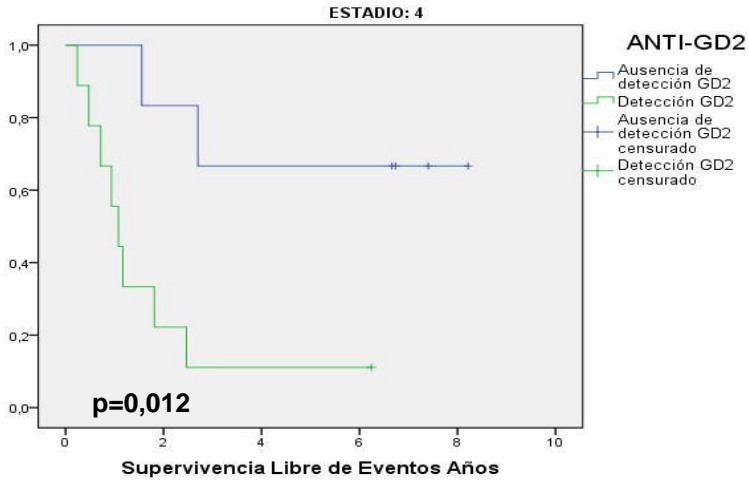


Figura 41: Curvas de supervivencia y supervivencia libre de eventos obtenidas para la detección de GD2 en sangre periférica al diagnóstico en pacientes de alto riesgo.

11.2.- Estudio de EMR en pacientes de alto riesgo tras quimioterapia de inducción.

Como hemos hecho hasta el momento, se seleccionaron aquellos pacientes de los que se disponía de muestra de MO o SP tomada al final de la quimioterapia de inducción.

En una primera aproximación, se calcularon las frecuencias de casos positivos de manera global tanto en MO como en SP, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 46.

Tabla 46: Datos obtenidos en el total de las muestras de MO y SP tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.

	TH	MAGE-A1	MAGE-A3	QF-DCX	QF-TH	GD2
% MO +	30,6	17,2	17,2	35,9	31,3	15
n	49	29	29	64	64	20
% SP +	8,8	9,1	0	7,9	13,2	0
n	34	22	22	38	38	11

En todos los marcadores se observa un mayor porcentaje de pacientes positivos en el caso de la MO que en la SP. En sangre periférica no se observó ningún caso positivo para *MAGE-A3* o *GD2*. Los datos obtenidos en el estudio de *TH* mediante PCR/Southern blot y QF-PCR cuantitativa, demuestran una sensibilidad muy similar de ambas técnicas, siendo levemente inferior la primera de ellas.

En este caso, el porcentaje mayor de casos positivos se observó para los marcadores *DCX* y *TH* detectados mediante QF-PCR. En este momento del tratamiento se espera un bajo número de casos positivos y un bajo número de células tumorales, los datos observados serían concordantes con una mayor sensibilidad de la PCR frente a la detección de células tumorales mediante inmunocitología.

De manera similar a lo observado a lo largo de todo el estudio, los marcadores que demostraron una menor tasa de positivos en MO fueron *MAGE-A1* y *MAGE-A3*. Sin embargo, en el caso de la SP, *MAGE-A1* mostró un porcentaje similar de casos positivos a los observados para *TH* y *DCX*.

La combinación de todos los datos obtenidos nos permitió observar que en un 44,3% de las MO y en un 20,7% de las SP, al menos uno de los marcadores demostró la presencia de células tumorales en estos tejidos, en pacientes de alto riesgo tras la quimioterapia de inducción.

El análisis de los datos, en términos generales, nos permite observar un fuerte descenso de casos positivos frente a los datos obtenidos al diagnóstico de la enfermedad. Dicho descenso se produce tanto en MO como en SP, siendo en sangre periférica mucho más acusado (Figura 42).

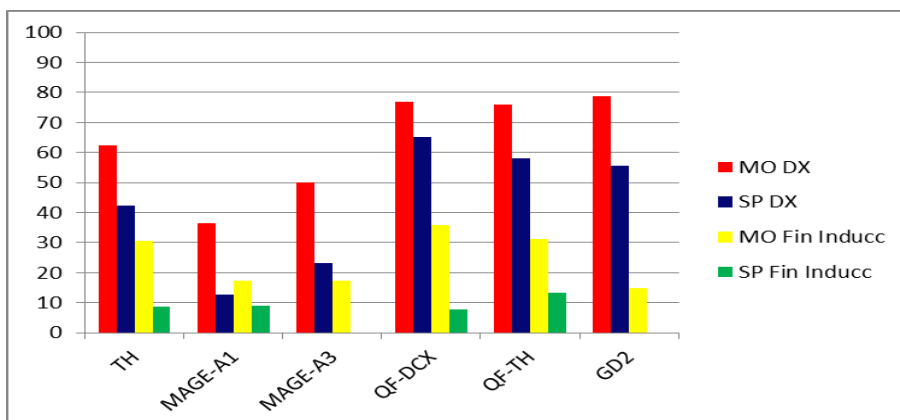


Figura 42: Frecuencias de casos positivos al diagnóstico y tras quimioterapia de inducción en pacientes de Alto Riesgo para cada uno de los marcadores estudiados.

Con el fin de comprobar si la disminución de la expresión de los marcadores tras la quimioterapia de inducción, era tanto en porcentaje como en el nivel de expresión de los mismos, se utilizaron los datos obtenidos mediante PCR cuantitativa para los marcadores *DCX* y *TH*. Para ello se compararon las medias de los valores obtenidos para ambos marcadores en SP y MO en los dos momentos estudiados. Los resultados se muestran en la Tabla 47.

Tabla 47: Media y desviación típica (DT) de valores de Δ CT positivos obtenidos mediante PCR cuantitativa para los marcadores *TH* y *DCX* al diagnóstico y tras quimioterapia de inducción en SP y MO en pacientes de alto riesgo.

Marcador	Muestra	Diagnóstico			Fin Inducción		
		n	media	DT	n	media	DT
<i>DCX</i>	MO	119	9,57	4,69	28	18,51	3,18
	SP	48	13,89	3,15	4	21,13	2,34
<i>TH</i>	MO	119	10,28	4,87	29	16,49	2,77
	SP	44	14,22	2,80	6	21,35	3,19

Tras quimioterapia de inducción, un elevado número de casos se negativiza y en los que no ocurre, como podemos observar en la tabla, la diferencia en las medias entre este momento y el diagnóstico es elevada. La diferencia en los valores de Δ CT supone una expresión de hasta 1000 veces menor para cada uno de los genes analizados incluso en aquellos casos en los que se mantiene cierta expresión de estos marcadores. Estos datos nos revelan una clara disminución del porcentaje de células tumorales frente a las células normales en las muestras de SP y MO tras la quimioterapia de inducción respecto a las detectadas al diagnóstico de la enfermedad. Así, tras la quimioterapia de inducción observamos tanto un menor número de pacientes con células tumorales detectadas en ambos tejidos, como una disminución de la proporción de células tumorales en las muestras positivas.

Además, mediante el estadístico t de comparación de medias para muestras relacionadas, se demostró que existen diferencias significativas entre los valores observados para las muestras de SP y MO al diagnóstico y tras la quimioterapia de inducción para ambos marcadores. Los resultados se muestran en la Tabla 48.

Tabla 48: Prueba t para muestras relacionadas, de la comparación de las medias de los valores de Δ CT en muestras de SP y MO al diagnóstico y tras quimioterapia de inducción para los marcadores DCX y TH en pacientes de alto riesgo.

		Diferencias relacionadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	MO_DX_DCX - MO_Fin_Inducc_DCX	-7,87464	7,06502	1,33516	-10,61417	-5,13511	-5,898	27	,000
Par 2	MO_DX_TH - MO_Fin_Inducc_TH	-6,80897	6,42289	1,19270	-9,25210	-4,36583	-5,709	28	,000
Par 3	SP_DX_DCX - SP_Fin_Inducc_DCX	-6,31750	2,71875	1,35938	-10,64364	-1,99136	-4,647	3	,019
Par 4	SP_DX_TH - SP_Fin_Inducc_TH	-8,47500	3,22172	1,31526	-11,85599	-5,09401	-6,444	5	,001

11.2.1- Estudio de EMR en MO tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.

El presente apartado se desarrolló con los resultados obtenidos en 79 pacientes de los que de disponía de muestra de MO tras quimioterapia de inducción. Los datos clínicos básicos de los mismos se muestran en la Tabla 49.

Tabla 49: Distribución y principales características de la serie de muestras de MO utilizadas, para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.

Características	Estadio INSS			Total
	2	3	4	
n	2	5	72	79
Sexo				
Niño	0	3	45	48
Niña	2	2	27	31
Amplificación MYCN				
Amplificado	2	5	40	47
No Amplificado	0	0	29	29
No disponible	0	0	3	3
Edad al diagnóstico				
>18 meses	0	5	64	69
<18 meses	2	0	8	10

Los resultados obtenidos que sirvieron de base para los análisis de supervivencia se muestran en la Tabla 50.

Tabla 50: Datos obtenidos para la totalidad de marcadores en MO tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo. En cada casilla se muestra el número de casos positivos frente a la totalidad de casos estudiados.

	Médula Ósea			
	Estadio 2	Estadio 3	Estadio 4	Todos los estadios
<i>TH</i>	1/2	0/3	14/44	15/49
<i>MAGE-A1</i>	0/1	1/1	4/27	5/29
<i>MAGE-A3</i>	0/1	0/1	5/27	5/29
<i>QF-DCX</i>	1/2	1/5	21/57	23/64
<i>QF-TH</i>	0/2	1/5	19/57	20/64
<i>QF DCX+TH</i>	1/2	2/5	23/57	26/64
<i>GD2</i>	0/2	0/1	3/17	3/20
Cualquier marcador positivo	1/2	2/5	30/72	33/79

Si nos centramos en los pacientes estadio 4, los marcadores que mostraron una menor tasa de casos positivos fueron *MAGE-A1*, *MAGE-A3* y *GD2*, siendo en este caso *MAGE-A1*, el marcador que menor porcentaje de MO positivas tras quimioterapia de inducción mostró. Por otra parte, los marcadores que demostraron una mayor tasa de detección de células tumorales fueron *DCX* y *TH*, es este caso, los porcentajes obtenidos son muy similares siendo del 35% y 31% respectivamente. La combinación de resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa elevó este porcentaje alrededor del 40%, al igual que la combinación de cualquier marcador positivo.

Al tratarse de pacientes de alto riesgo y disponer sólo de dos muestras de pacientes estadio 2 y cinco de estadio 3, se trataron todos los pacientes en un único grupo y después separadamente sólo los pacientes estadio 4.

Los p valores y los gráficos de supervivencia obtenidos se muestran en la Tabla 51 y la Figura 43-A y la Figura 43-B.

Tabla 51: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos para cada uno de los marcadores en MO tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.

Marcador	P-valor (Log-Rank)	
	Supervivencia	Supervivencia Libre de Eventos
<i>TH</i>	0,769	0,400
<i>MAGE-A1</i>	0,816	0,871
<i>MAGE-A3</i>	0,580	0,768
<i>QF-DCX</i>	0,017*	0,128
<i>QF-TH</i>	0,938	0,392
<i>QF-PCR (DCX+TH)</i>	0,179	0,118
<i>GD2</i>	0,630	0,797
Cualquier Marcador	0,234	0,311

Como se puede ver en la tabla, sólo pudimos observar una correlación estadísticamente significativa entre la supervivencia y la expresión de *DCX*. La expresión de *DCX* en MO tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo, demostró ser un factor pronóstico adverso.

Si observamos las curvas de supervivencia, generalmente, la detección de cualquiera de los marcadores estudiados, parece ser un factor adverso tanto en la supervivencia como en la supervivencia libre de eventos, dichas diferencias, sin embargo, no fueron estadísticamente significativas a excepción del caso mencionado anteriormente.

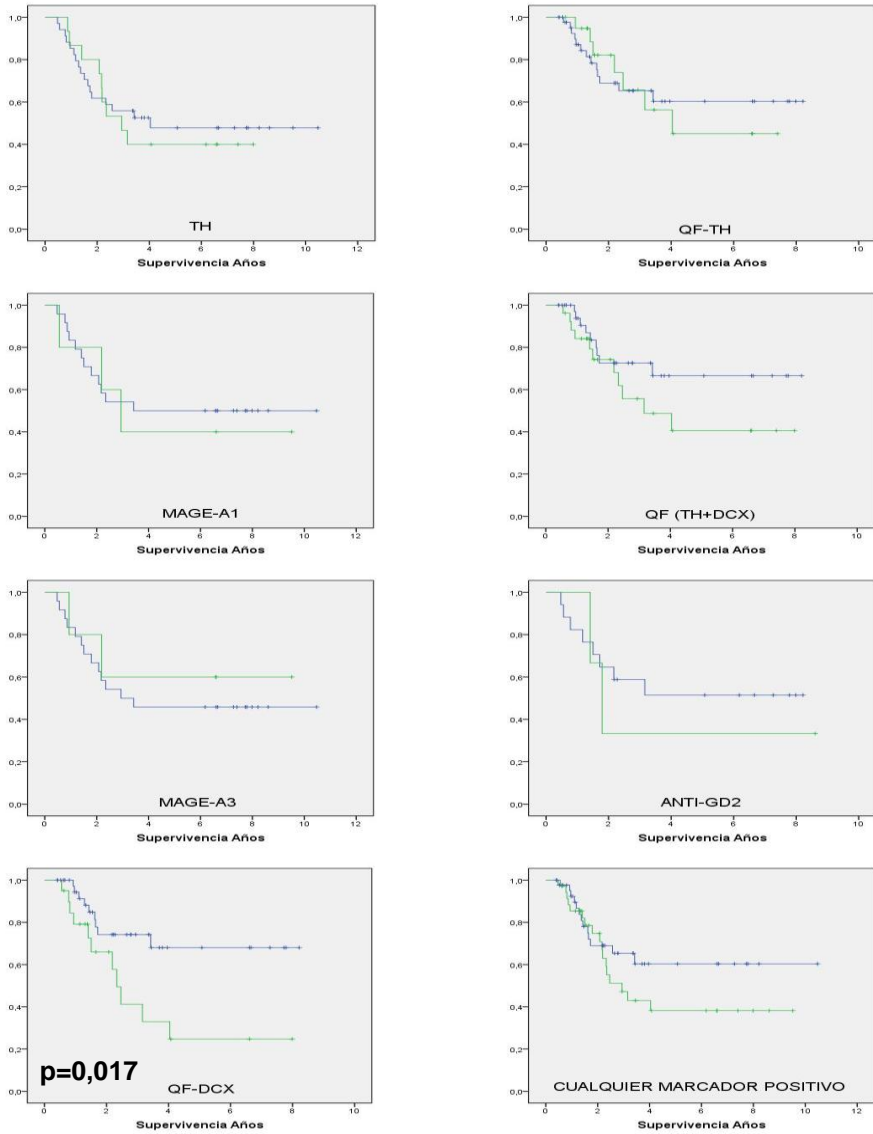


Figura 43-A: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en MO tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo. La curva QF-PCR (*TH+DCX*) representa la combinación de resultados de resultados obtenidos por QF-PCR para estos marcadores. La última curva representa la combinación de los resultados de todos los marcadores. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

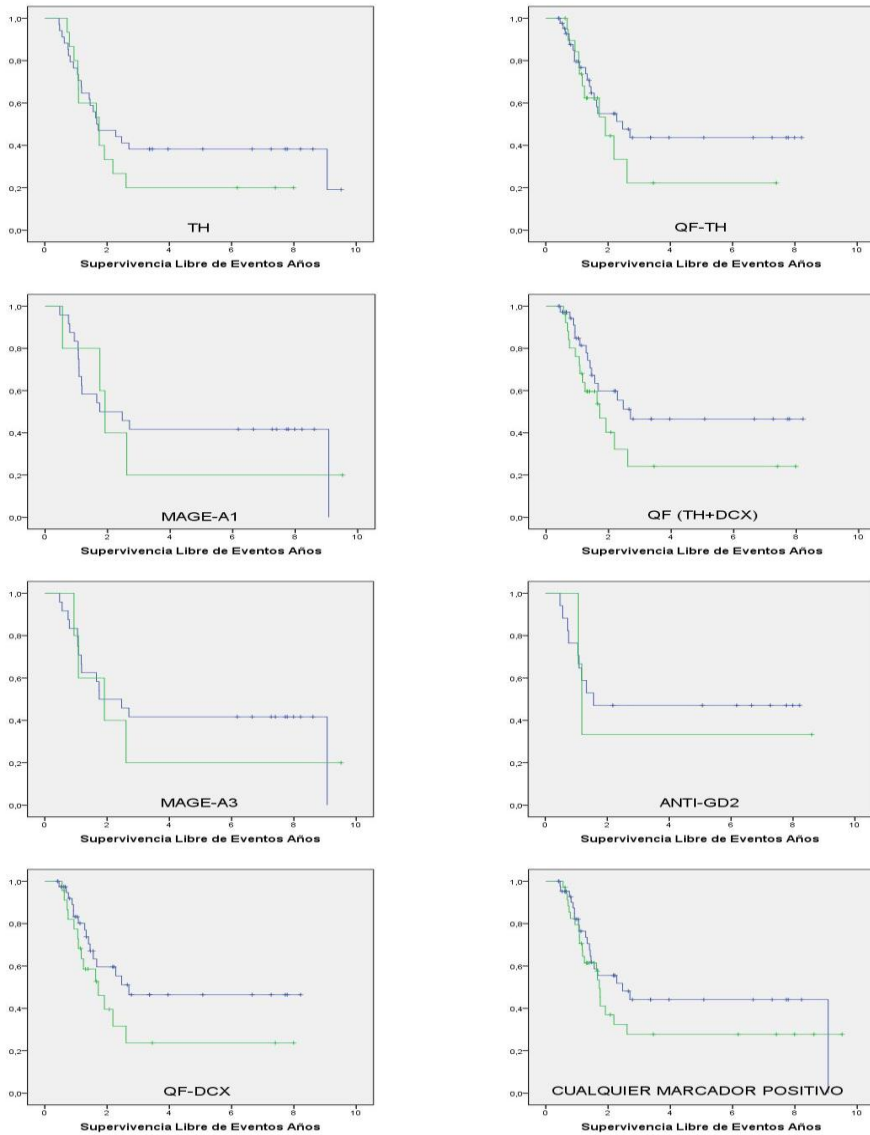
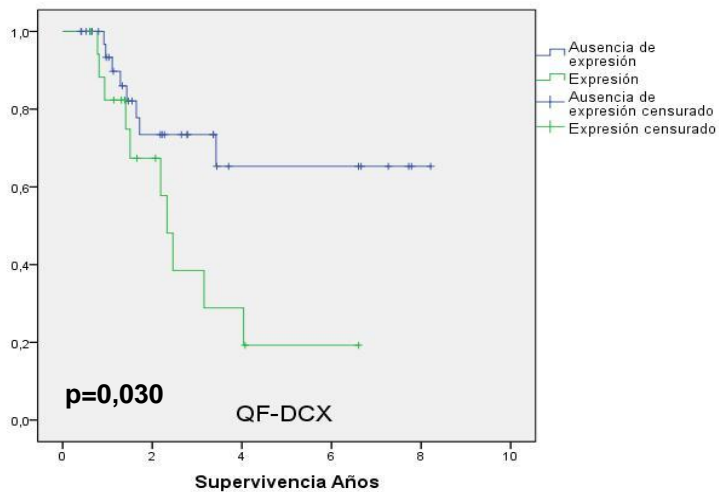


Figura 43-B: Curvas de supervivencia libre de eventos obtenidas para los diferentes marcadores en MO tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo. La curva QF-PCR (*TH+DCX*) representa la combinación de resultados obtenidos por QF-PCR para estos marcadores. La última curva representa la combinación de los resultados de todos los marcadores. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

Tras el análisis de supervivencia en el total de pacientes de alto riesgo, tal y como explicamos anteriormente, se realizó el mismo análisis por separado en los pacientes estadio 4. En este caso se observaron diferencias significativas tanto en la supervivencia como en la supervivencia libre de eventos en aquellos pacientes que fueron positivos para *DCX*. La presencia de células tumorales detectadas mediante este marcador, resultó ser un factor de pronóstico adverso para la enfermedad. Los gráficos de supervivencia y SLE para *DCX* se muestran en la Figura 44.

Para el resto de marcadores, no se observaron diferencias significativas entre la presencia o ausencia de expresión y la supervivencia o la SLE.



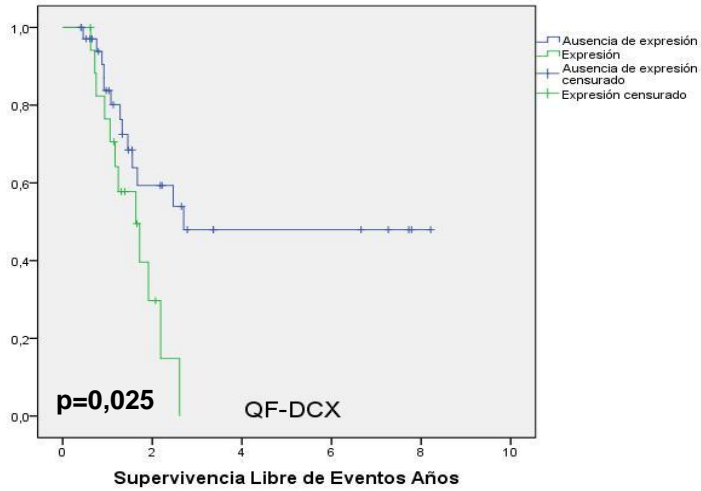


Figura 44: Curvas de supervivencia y supervivencia libre de eventos obtenidas para la detección de DCX en médula ósea tras quimioterapia de inducción en pacientes estadio 4.

11.2.2- Estudio de EMR en SP tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.

El presente apartado se desarrolló con los resultados obtenidos en 53 pacientes de los que de disponía de muestra de SP tras quimioterapia de inducción. Los datos clínicos básicos de los mismos se muestran en la Tabla 52.

Tabla 52: Distribución y principales características de la serie de muestras de SP utilizadas, para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.

Características	Estadio INSS		
	3	4	Total
n	4	49	53
Sexo			
Niño	3	28	31
Niña	1	21	22
Amplificación MYCN			
Amplificado	4	22	26
No Amplificado	0	20	20
No disponible	0	7	7
Edad al diagnóstico			
>18 meses	4	43	47
<18 meses	0	6	6

Los resultados obtenidos que sirvieron de base para los análisis de supervivencia se muestran en la Tabla 53.

Tabla 53: Datos obtenidos para la totalidad de marcadores en SP tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo. En cada casilla se muestra el número de casos positivos frente a la totalidad de casos estudiados.

	Sangre Periférica		
	Estadio 3	Estadio 4	Todos los estadios
<i>TH</i>	0/2	3/32	3/34
<i>MAGE-A1</i>	1/1	1/21	2/22
<i>MAGE-A3</i>	0/1	0/21	0/22
<i>QF-DCX</i>	0/2	3/36	3/38
<i>QF-TH</i>	0/2	5/36	5/38
<i>QF DCX+TH</i>	0/2	6/36	6/38
<i>GD2</i>	0/0	0/11	0/11
Cualquier marcador positivo	1/4	14/49	15/53

Si nos centramos en los pacientes estadio 4, los marcadores que mostraron una menor tasa de casos positivos fueron GD2, *MAGE-A3* en los que ningún caso fue positivo, seguidos de *MAGE-A1*. Por otra parte, los marcadores que demostraron una mayor tasa de detección de células tumorales fueron *TH* y *DCX*, con porcentajes de 13,8% y 8,3 % respectivamente. La combinación de resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa elevó este porcentaje al 16,6% y la combinación de cualquier marcador positivo fue de un 28,5%.

Al tratarse de pacientes de alto riesgo y disponer sólo de muestras de cuatro pacientes estadio 3, se trataron todos los pacientes en un único grupo y después separadamente sólo los pacientes estadio 4.

Los p valores y los gráficos de supervivencia obtenidos se muestran en la Tabla 54 y la Figura 45-A y la Figura 45-B.

Tabla 54: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos para cada uno de los marcadores en SP tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo.

Marcador	P-valor (Log-Rank)	
	Supervivencia	Supervivencia Libre de Eventos
<i>TH</i>	0,490	0,973
<i>MAGE-A1</i>	0,754	0,544
<i>MAGE-A3</i>	ND	ND
<i>QF-DCX</i>	0,452	0,844
<i>QF-TH</i>	0,487	0,594
<i>QF-PCR (DCX+TH)</i>	0,196	0,409
GD2	ND	ND
Cualquier Marcador	0,781	0,691

En el caso de la detección de *MAGE-A3* y GD2 no se pudo calcular la curva de supervivencia ya que no se detectó expresión en ninguna de las muestras, por lo que sólo existe un valor para cada estado.

Los resultados obtenidos revelaron que no existen diferencias significativas entre la expresión de los diferentes marcadores analizados en SP tras quimioterapia de inducción y la supervivencia o supervivencia libre de eventos en estos pacientes.

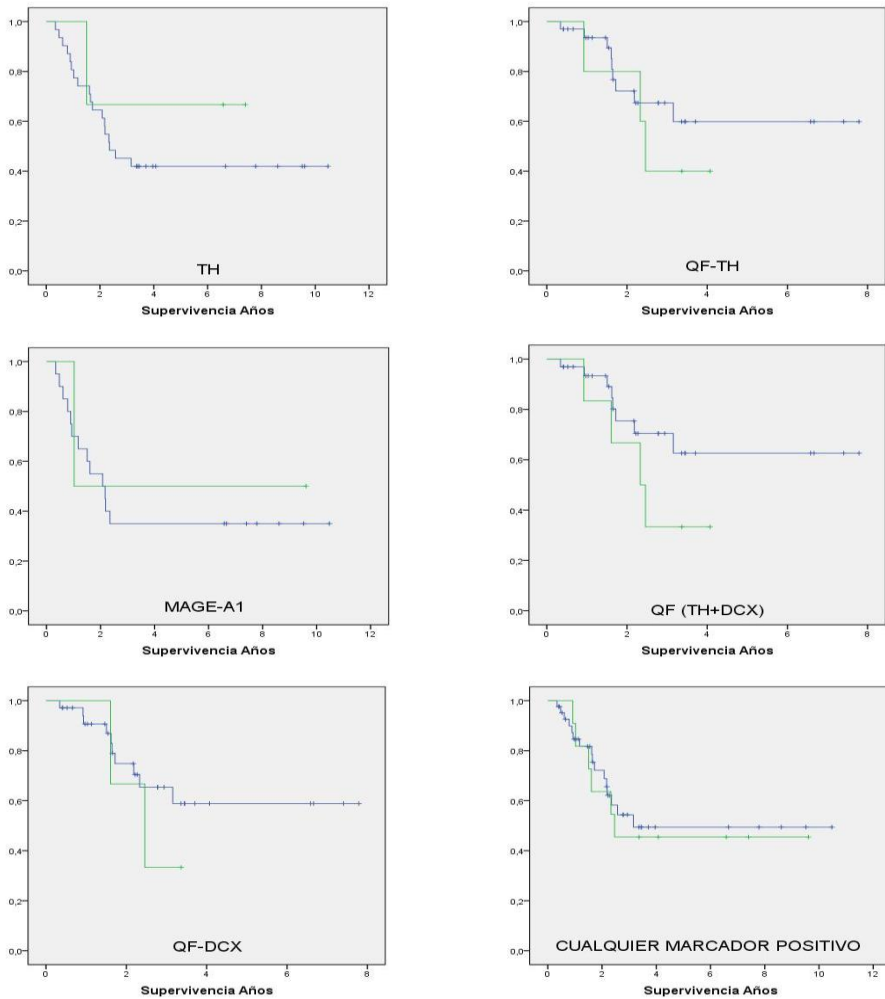


Figura 45-A: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en SP tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo. La curva QF-PCR ($TH+DCX$) representa la combinación de resultados obtenidos por QF-PCR para estos marcadores. La última curva representa la combinación de los resultados de todos los marcadores. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

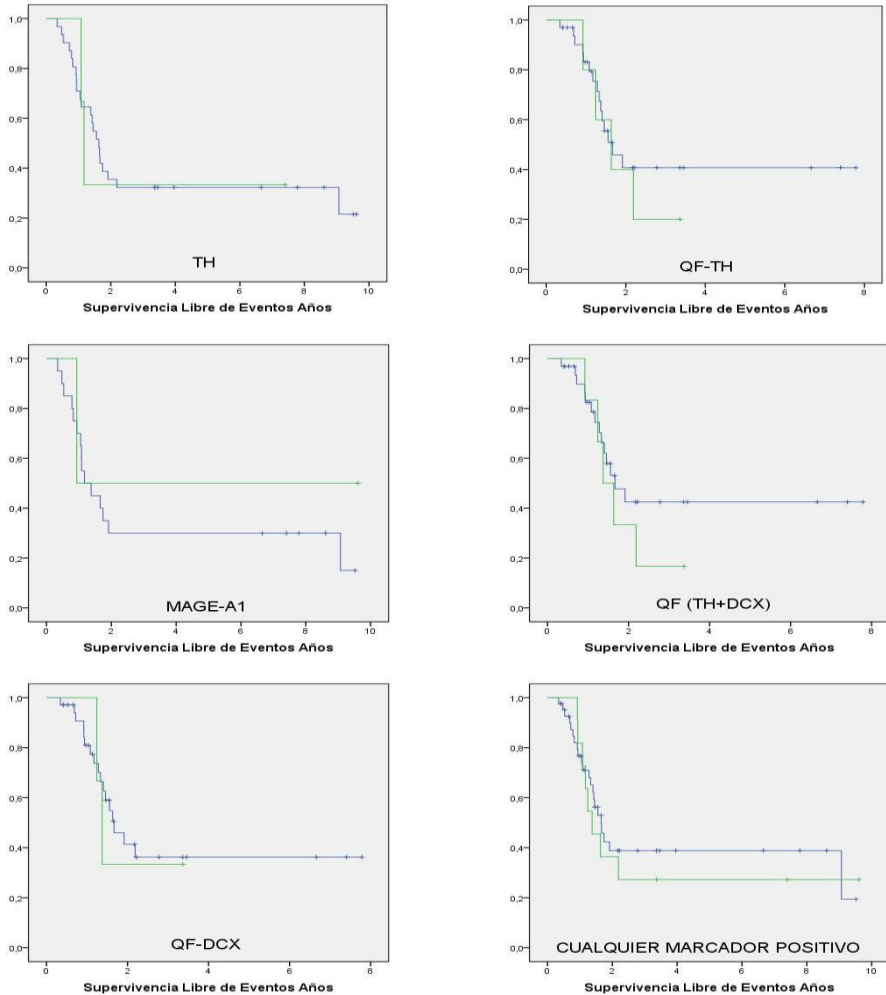


Figura 45-B: Curvas de supervivencia libre de eventos obtenidas para los diferentes marcadores en SP tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo. La curva QF-PCR (*TH+DCX*) representa la combinación de resultados obtenidos por QF-PCR para estos marcadores. La última curva representa la combinación de los resultados de todos los marcadores. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

Tras el análisis de supervivencia en el total de pacientes de alto riesgo, se realizó el mismo análisis por separado en los pacientes estadio 4. En la totalidad de los marcadores, no se observaron diferencias significativas entre la presencia o ausencia de expresión y la supervivencia o la SLE.

11.3.- Estudio de EMR en pacientes de alto riesgo en la recaída.

Para los análisis del presente apartado se seleccionaron las muestras de MO y SP de pacientes de alto riesgo en la recaída. Aunque no se disponía de un alto número de muestras, se decidió analizar los datos obtenidos en las mismas, para poder tener una visión de la EMR en este momento de la enfermedad y las posibles tendencias en el valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores en la supervivencia.

Como se realizó en el grupo de muestras al diagnóstico o tras la quimioterapia de inducción, la primera aproximación en el análisis de datos fue el estudio de las frecuencias de casos positivos de manera global tanto en MO como en SP, los resultados obtenidos los podemos observar en la Tabla 55.

Tabla 55: Datos obtenidos en el total de las muestras de MO y SP en la recaída en pacientes de alto riesgo.

	<i>TH</i>	<i>MAGE-A1</i>	<i>MAGE-A3</i>	<i>QF-DCX</i>	<i>QF-TH</i>	<i>GD2</i>
MO +	80,8	42,9	28,6	79,2	70,8	81,8
n	26	14	14	24	24	11
SP +	57,1	23,1	7,7	86,7	73,3	37,5
n	21	13	13	15	15	8

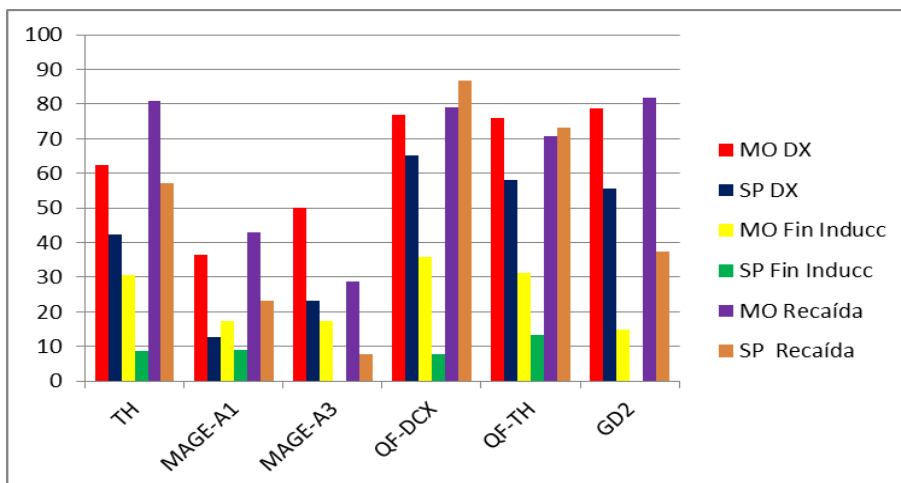
Como se puede derivar del análisis de los datos, se observa una elevada frecuencia de pacientes en los que se detectó positividad de los diferentes marcadores. En la mayoría de los casos pudimos observar un mayor porcentaje de pacientes positivos en el caso de la MO que en la SP a excepción de *DCX* y *TH* estudiados mediante QF-PCR. La mayor sensibilidad, al igual que en la totalidad del estudio, se obtuvo con el estudio de *DCX*, *TH* y *GD2*. Los marcadores que mostraron menor frecuencia de detección fueron *MAGE-A3* seguido por *MAGE-A1*.

La combinación de todos los datos obtenidos nos permitió observar que en un 86,5% de las MO y en un 71,4% de las SP estudiadas, al menos uno de los marcadores demostró la posible existencia de células tumorales circulantes en pacientes de alto riesgo en el momento de la recaída.

Si comparamos los datos obtenidos al diagnóstico, tras quimioterapia de inducción y en la recaída (Figura 46), al diagnóstico existe una alta proporción de pacientes en los que se detecta infiltración de células tumorales en MO y células circulantes en SP. La proporción de células positivas desciende de manera significativa tras la quimioterapia de inducción y aumenta de nuevo a valores similares al diagnóstico en la recaída.

En el caso de la SP, la frecuencia de casos positivos en la recaída para todos los marcadores, es muy superior a la observada al diagnóstico. Mientras que en las muestras de MO, los valores son similares para GD2, MAGE-A3, TH y DCX detectados mediante QF.PCR. En el caso de MAGE-A1 y TH detectado por Southern blot, la frecuencia de casos positivos es mayor en la recaída que en el diagnóstico.

A



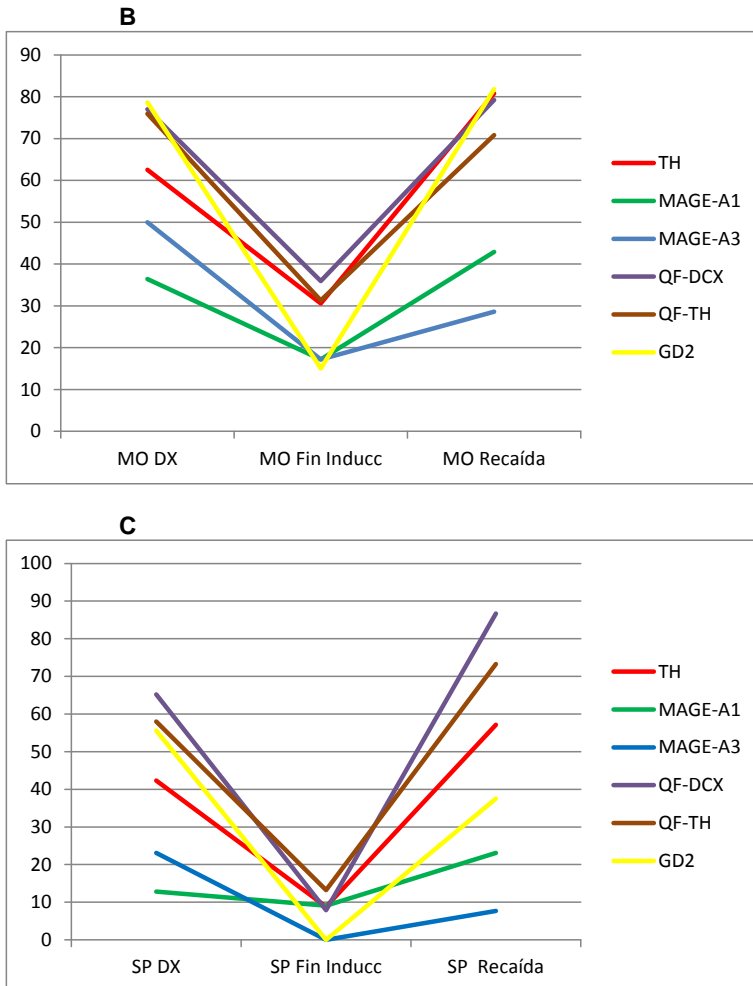


Figura 46: Frecuencias de casos positivos para la totalidad de marcadores en MO y SP al diagnóstico, tras quimioterapia de inducción y en la recaída (A). Evolución de las tendencias de los marcadores en los tres momentos estudiados en MO (B) y en SP (C).

11.3.1- Estudio de EMR en MO en la recaída en pacientes de alto riesgo.

Para el estudio de EMR en la recaída se disponía de muestras de 37 pacientes. Los datos clínicos básicos de los mismos se muestran en la Tabla 56.

Tabla 56: Distribución y principales características de la serie de muestras de MO utilizadas para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR en pacientes de alto riesgo en la recaída.

Características	Estadio INSS		
	3	4	Total
n	4	33	37
Sexo			
Niño	4	22	26
Niña	0	11	11
Amplificación MYCN			
Amplificado	4	12	16
No Amplificado	0	18	18
No disponible	0	3	3
Edad al diagnóstico			
>18 meses	4	30	34
<18 meses	0	3	3

Los resultados obtenidos que sirvieron de base para los análisis de supervivencia se muestran en la Tabla 55. En este caso se decidió hacer el análisis en conjunto y separadamente sólo en el caso de los estadio 4, ya que sólo se disponía de muestra de 3 casos de pacientes estadio 3.

Los p valores y los gráficos de supervivencia obtenidos para el conjunto de pacientes se muestran en la Tabla 57 y la Figura 47.

Tabla 57: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia para cada uno de los marcadores en MO de pacientes de alto riesgo en la recaída.

Marcador	P-valor (Log-Rank)
	Supervivencia
TH	0,088
MAGE-A1	0,420
MAGE-A3	0,489
QF-DCX	0,094
QF-TH	0,042*
QF-PCR (DCX+TH)	0,094
GD2	0,656
Cualquier Marcador	0,038*

En este análisis pudimos observar una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de *TH* detectada mediante QF-PCR o la expresión de cualquiera de los marcadores estudiados y la supervivencia de los pacientes. En el caso de la expresión de *TH* detectada mediante Southern blot y *DCX*, también se observa dicha asociación no llegándose a la significatividad. En ambos casos, dicha asociación se daba con un peor pronóstico de la enfermedad.

Resultados

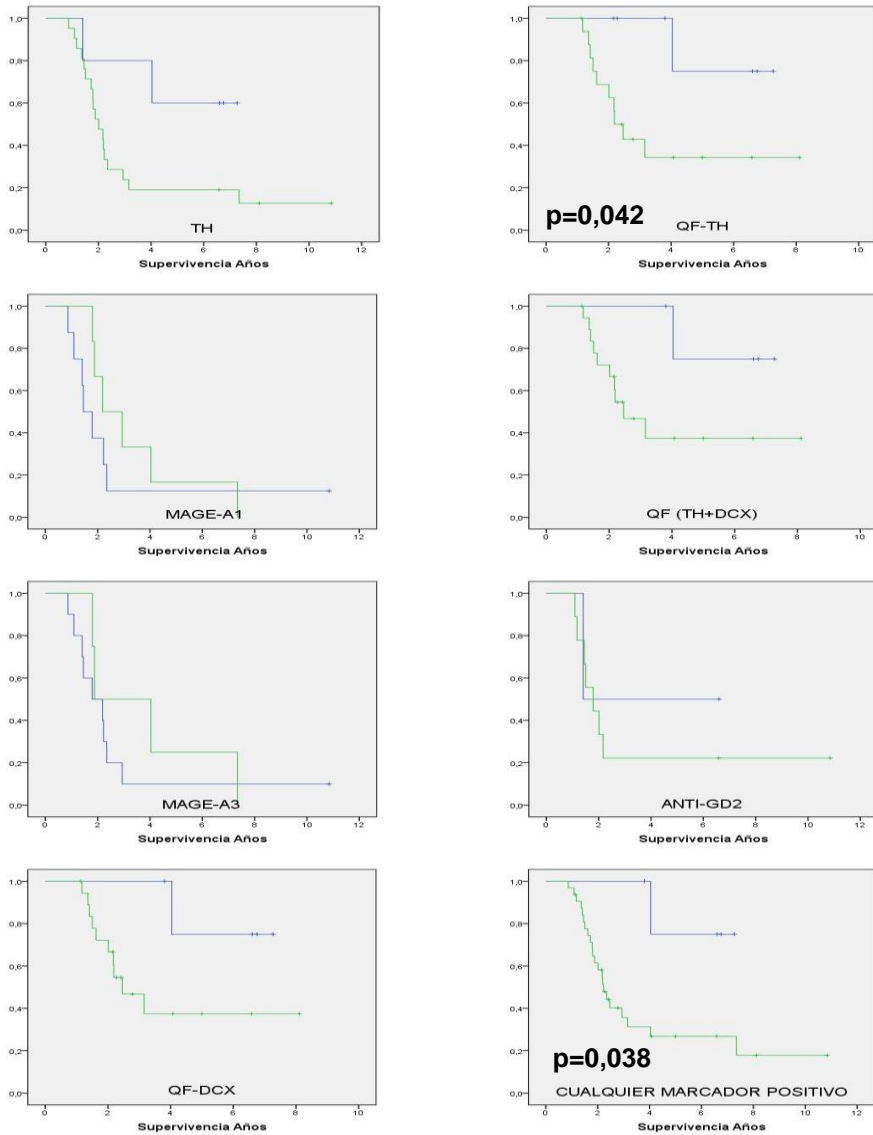


Figura 47: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en MO en la recaída en pacientes de alto riesgo. La curva QF-PCR (*TH+DCX*) representa la combinación de resultados obtenidos por QF-PCR para estos marcadores. La última curva representa la combinación de los resultados de todos los marcadores. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

Seguidamente, se procedió al análisis de supervivencia en los casos estadio 4 por separado. En este caso no pudimos observar ninguna asociación estadísticamente significativa entre la supervivencia y la expresión de ninguno de los marcadores. En el caso de *TH* detectada mediante QF-PCR o de cualquier marcador positivo, que en el análisis de todos los datos mostraron diferencias significativas, mostraron la misma tendencia sin alcanzar la significatividad. Ambas curvas de supervivencia se muestran en la Figura 48.

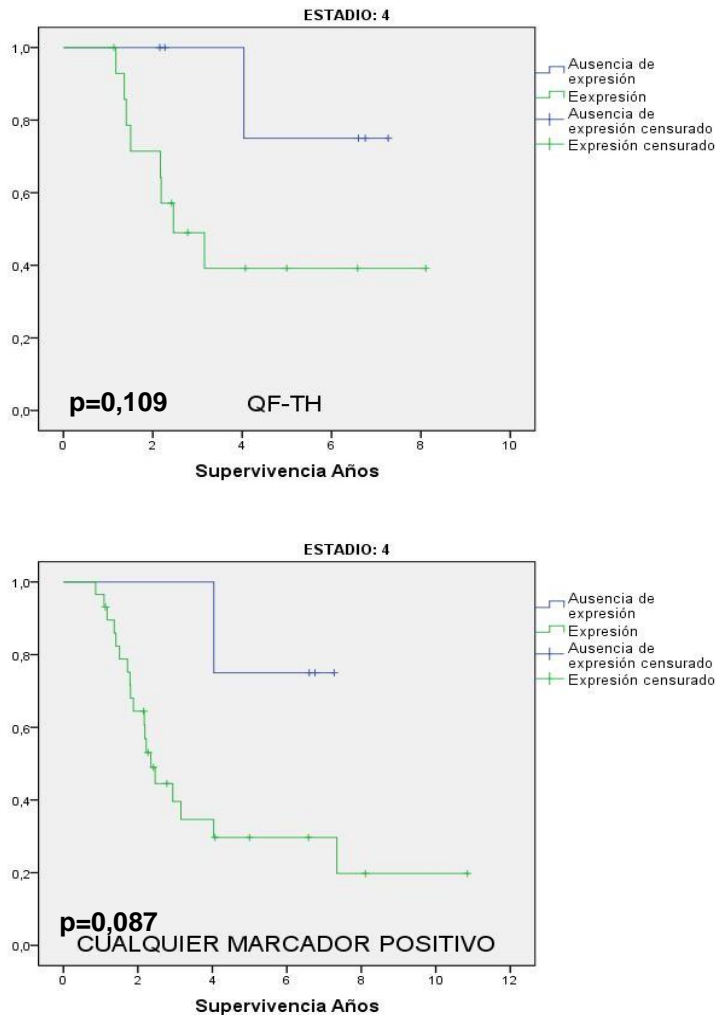


Figura 48: Curvas de supervivencia obtenidas para *TH* detectado por QF-PCR y para la combinación de los resultados de todos los marcadores en MO de pacientes estadio 4 en la recaída.

11.3.2- Estudio de EMR en SP en la recaída en pacientes de alto riesgo.

Para el estudio de EMR en SP en la recaída se disponía de muestras de 28 pacientes. Los datos clínicos básicos de los mismos se muestran en la Tabla 58.

Tabla 58: Distribución y principales características de la serie de muestras de SP utilizadas, para la evaluación del valor pronóstico de la expresión de los diferentes marcadores de EMR en pacientes de alto riesgo en la recaída.

Características	Estadio INSS		
	3	4	Total
n	3	25	28
Sexo			
Niño	3	17	20
Niña	0	8	8
Amplificación MYCN			
Amplificado	3	8	11
No Amplificado	0	14	14
No disponible	0	3	3
Edad al diagnóstico			
>18 meses	3	24	27
<18 meses	0	1	1

Los resultados obtenidos que sirvieron de base para los análisis de supervivencia se muestran en la Tabla 55. Se decidió hacer el análisis en conjunto y separadamente sólo en el caso de los estadio 4, ya que sólo se disponía de muestras de tres pacientes estadio 3.

Los p valores y los gráficos de supervivencia obtenidos para el conjunto de pacientes se muestran en la Tabla 59 y la Figura 49.

Tabla 59: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia para cada uno de los marcadores en SP de pacientes de alto riesgo en la recaída.

Marcador	P-valor (Log-Rank)
	Supervivencia
<i>TH</i>	0,615
<i>MAGE-A1</i>	0,849
<i>MAGE-A3</i>	0,560
<i>QF-DCX</i>	0,728
<i>QF-TH</i>	0,389
<i>QF-PCR (DCX+TH)</i>	0,728
<i>GD2</i>	0,716
Cualquier Marcador	0,113

Como podemos observar en la tabla, no existen diferencias significativas entre la expresión de los diferentes marcadores analizados en SP en la recaída y la supervivencia en los pacientes analizados.

En los análisis de supervivencia realizados separadamente para pacientes estadio 4, tampoco observamos diferencias significativas entre la expresión de los diferentes marcadores y la supervivencia.

Resultados

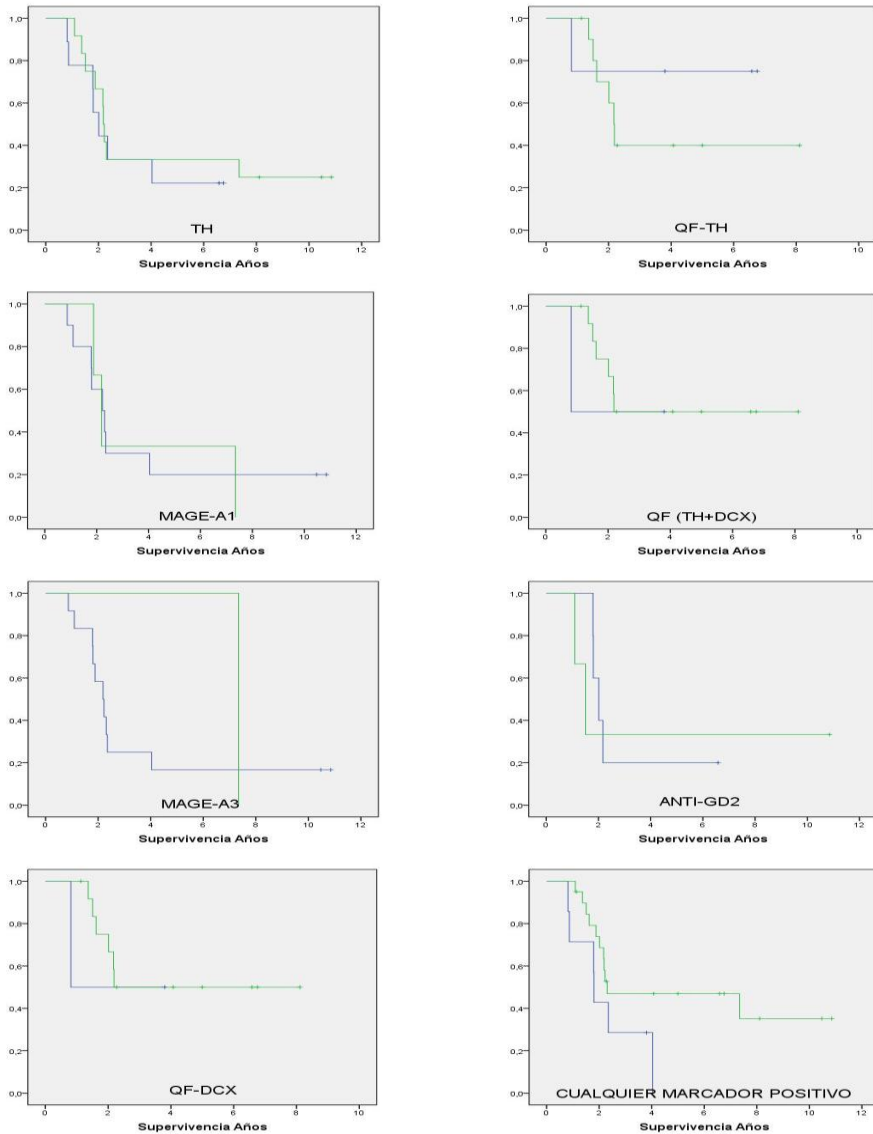


Figura 49: Curvas de supervivencia obtenidas para los diferentes marcadores en SP en la recaída en pacientes de alto riesgo. La curva QF-PCR (*TH+DCX*) representa la combinación de resultados obtenidos por QF-PCR para estos marcadores. La última curva representa la combinación de los resultados de todos los marcadores. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

11.4.- Detección de células tumorales en Aféresis.

Uno de los posibles problemas en el tratamiento de pacientes de alto riesgo es la reinfusión de células tumorales presentes en los productos de leucaféresis en el trasplante autólogo. Para valorar esta posibilidad planteamos incluir en el estudio de EMR este tipo de muestras y analizarlas con la misma metodología aplicada en todo el proyecto.

A lo largo del estudio se procesaron 61 aféresis de 41 pacientes diferentes. Las características de los pacientes se resumen en la Tabla 60.

Tabla 60: Distribución y principales características de la serie de muestras de AF de pacientes de alto riesgo en las que se estudió la presencia de células tumorales.

Características	Estadio INSS			Total
	2	3	4	
n	1	1	39	41
Sexo				
Niño	0	1	22	23
Niña	1	0	17	18
Amplificación MYCN				
Amplificado	0	1	15	16
No Amplificado	1	0	22	23
No disponible	0	0	2	2
Edad al diagnóstico				
>18 meses	1	1	31	33
<18 meses	0	0	8	8

Sólo ocho muestras de siete pacientes diferentes resultaron positivas para al menos uno de los marcadores estudiados. En la Tabla 5.10.4.2 se muestran dichos resultados.

Tabla 61: Resultados obtenidos en las ocho muestras de aféresis que resultaron positivas para al menos uno de los marcadores de EMR analizados.

CODIGO	MUESTRA	ESTADIO	TH	MAGE1	MAGE3	QF-DCX	QF-TH	ANTIGD2
TI-132	AF1	4	0	1	0			
TI-169	AF2	4	0	0	1			
TI-244	AF1	4	0	0	0			1
TI-284	AF1	4	0	0	0			1
TI-284	AF2	4	0	0	0			1
TI-285	AF1	4	0	0	0	0	1	0
TI-391	AF1	4	1	1	1	1	1	
TI-460	AF1	4	0			1	0	

Del total de los 41 pacientes, un 63,4% sufrieron una recaída y un 53,6% fallecieron. En aquellos en los que al menos uno de los marcadores de EMR fue positivo en las aféresis, el porcentaje de recaídas fue de aproximadamente un 60% y el de fallecimientos del 62%. Aunque las diferencias entre los dos grupos (vivos vs fallecidos) son pequeñas, se realizó una comparación entre ellos mediante el test exacto de Fisher no observándose diferencias significativas.

Al observar estos datos, y aunque el número de pacientes estudiados para cada marcador era pequeño decidimos hacer un análisis de supervivencia y de SLE en los 41 pacientes de los que disponíamos muestra. Los p valores obtenidos se muestran en la Tabla 62.

Tabla 62: Valores de significatividad obtenidos en los análisis de supervivencia para cada uno de los marcadores en AF de pacientes de alto riesgo.

Marcador	P-valor (Log-Rank)	
	Supervivencia	Supervivencia Libre de Eventos
TH	0.013*	0.000**
MAGE-A1	0.220	0.116
MAGE-A3	0.010*	0.002*
QF-DCX	0.786	0.951
QF-TH	0.003*	0.000**
QF-PCR (DCX+TH)	0.285	0.501
GD2	0.710	0.837
TH (Southern+QF-PCR)	0.010*	0.002*
Cualquier Marcador	0.258	0.440

En este caso se observaron diferencias significativas tanto en la supervivencia como en la supervivencia libre de eventos en aquellos pacientes que fueron positivos para *TH* y *MAGE-A3*. La presencia de células tumorales detectadas mediante estos marcadores, resultó ser un factor de pronóstico adverso para la enfermedad. En el resto de marcadores, no se observaron diferencias significativas entre la detección de los mismos y la supervivencia y SLE. En el caso de *TH*, se observó este fenómeno tanto en los casos estudiados mediante PCR/Southern como en los estudiados mediante QF-PCR. Además, al disponer de pocos datos, se combinaron todos los datos obtenidos con ambas técnicas para este marcador y se comprobó que el valor predictivo no cambiaba. El pequeño número de muestras nos obligaría a ampliar la serie para poder corroborar los datos obtenidos. Los gráficos de supervivencia y SLE de los marcadores que fueron significativos se muestran en la Figura 50.

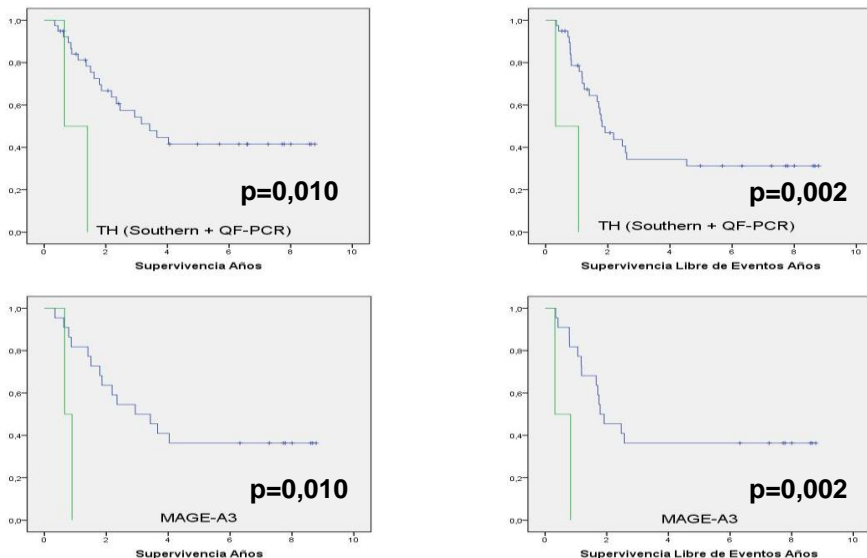
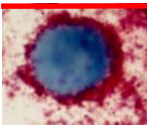


Figura 50: Curvas de supervivencia y supervivencia libre de eventos obtenidas para los TH y MAGE-A3 en aféresis de pacientes de alto riesgo. La línea azul representa la ausencia de expresión del marcador y la línea verde la expresión del mismo. El signo + representa los casos censurados.

Discusión



VI.- Discusión

1.- Validación de los marcadores para el estudio de EMR

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente de la infancia y supone alrededor del 10% de la totalidad de los tumores en niños. El desarrollo del mismo implica tanto factores embrionarios como tumorigénicos, este hecho hace que el tumor sea altamente heterogéneo tanto clínica como biológicamente. El neuroblastoma se origina a partir de las células de la cresta neural cuyo destino normal es el desarrollo del sistema nervioso simpático (*Brodeur, 2003*). A lo largo de los años se han establecido diferentes factores pronósticos de la enfermedad, como la edad al diagnóstico, el estadiaje INSS, la histología del tumor o las características genéticas y genómicas del mismo (*Maris, 2005*). A pesar de la disponibilidad de un gran abanico de marcadores clínicos y biológicos utilizados como factores pronóstico y el uso de terapias multimodales, los resultados en estos pacientes siguen sin ser óptimos. Debido a ello, en las últimas décadas se han dedicado grandes esfuerzos tanto en la búsqueda de nuevos factores pronóstico como en la optimización de terapias individualizadas más efectivas.

Desde el descubrimiento hace 25 años de células circulantes en sangre periférica de neuroblastoma en la mayoría de pacientes con enfermedad diseminada (*Moss et al., 1990-A*), se han dedicado muchos esfuerzos al desarrollo y validación de nuevos métodos y marcadores para la detección de la enfermedad mínima residual en los mismos. Aproximadamente un 40% de los casos considerados de alto riesgo presentan diseminación en médula ósea, nódulos linfáticos, hígado u otros órganos. En pacientes mayores de un año, la presencia de células tumorales en médula ósea es un indicador de pronóstico adverso de la enfermedad, implicando la aplicación de pautas de tratamiento de alto riesgo (*Hartmann et al., 1999; Cotterill et al., 2000*). Cualquier metodología utilizada para la detección de EMR en médula ósea requiere al menos una sensibilidad del 0,1% (*Cheung et al., 1997-A; Mehes et al., 2003*). Alrededor de este punto, se han desarrollado varias técnicas para la monitorización de la enfermedad diseminada entre las que se encuentra la QF-PCR, la inmunocitología o la citometría de flujo.

El marcador ideal para la detección de EMR ha de cumplir una serie de características entre las que están la ausencia de expresión en tejidos normales (en este caso especialmente en MO, SP y AF). El antígeno GD2, detectado mediante inmunocitología, es un marcador altamente específico, pero se ha detectado expresión del mismo en células normales (*Martínez et al., 2007*). En este caso, el análisis citogenético de las células positivas o la morfología de las mismas incrementa significativamente la especificidad (*Mehes et al., 2001-B; Swerts et al., 2005*). Por otra parte, se han propuesto multitud de dianas detectadas mediante QF-PCR, entre ellas están *TH*, *GD2*

sintasa, *GAGE*, *MAGE*, etc., pero en algunos casos se ha descrito expresión residual de los mismos, en células no tumorales de los tejidos de interés (*Cheung et al., 1997-B; Cheung et al., 1998; Hoon et al., 2001; Viprey et al., 2007*). La presencia de expresión residual de los marcadores en MO, SP o AF limita la sensibilidad y especificidad de la detección de EMR mediante estos métodos.

Estos antecedentes nos motivaron al desarrollo de la primera parte del presente trabajo, que consiste en la búsqueda de nuevos marcadores específicos de EMR en neuroblastoma y a la validación de los mismos junto a marcadores previamente descritos que pretendíamos utilizar.

1.1.- Descripción de DCX como marcador de EMR en neuroblastoma.

Como hemos comentado anteriormente, en el caso del neuroblastoma existe una alta heterogeneidad tumoral. La utilización de varios marcadores nos permitiría, en cierta manera, salvar el escollo de la heterogeneidad de las células metastáticas derivadas del tumor primario y así aumentar la probabilidad de detección de las mismas por cualquiera de los marcadores estudiados. Este hecho nos permitiría aumentar la especificidad y la sensibilidad en la detección de enfermedad mínima en sangre periférica, médula ósea o productos de aféresis.

La aproximación que nos propusimos en un primer momento fue la búsqueda de nuevos marcadores mediante estudios de expresión diferencial entre muestras que habían resultado negativas para los estudios de EMR y muestras positivas. La complejidad de la técnica y la poca probabilidad *a priori* de obtener resultados positivos, nos decantaron por cambiar dicha estrategia. La nueva aproximación consistió en la búsqueda *in silico* de nuevos marcadores que cumplieran una serie de condiciones. Las condiciones básicas que debían cumplir eran las planteadas anteriormente y el tener un patrón de expresión específico de células nerviosas en migración.

Las búsquedas en fuentes bibliográficas, junto a la experiencia del Dr. Martínez, codirector del presente trabajo, en el estudio mutacional del gen *DCX*, nos llevó a iniciar el análisis y la validación de la expresión del mismo como posible marcador de EMR en neuroblastoma.

Mutaciones en el gen *DCX* provocan lisencefalia ligada al X en varones y heterotopia laminar cortical en mujeres. La inactivación del cromosoma X implica una compensación de dosis en mujeres con mutaciones en el gen, siendo el resultado un mosaicismo funcional celular. De esta manera existen dos poblaciones de neuronas las que expresan el alelo mutado y las que expresan el alelo normal. Las mujeres que presentan un mosaico debido a

la inactivación, muestran un rango variable de fenotipos en el neurodesarrollo dependiendo del grado de expresión del alelo mutado (Gleeson *et al.*, 1999; Guerrini *et al.*, 2003).

El gen de la doblecortina se localiza en Xq22.3-q23. Codifica para una proteína asociada a microtúbulos que favorece la nucleación, el ensamblaje y la estabilidad de los filamentos de microtúbulos. Muestra una expresión específica en neuronas en migración del sistema nervioso central y periférico. Su expresión es necesaria para la migración neuronal en el córtex, y está probablemente implicada en la regulación dinámica de la morfología de las neuronas en migración (Gleeson *et al.*, 1999; Lo Turco, 2004; Tanaka *et al.*, 2004). Pertenece a una superfamilia de proteínas que se caracterizan por la existencia de uno o dos dominios conservados tipo DCX. DCX interacciona físicamente con LIS1, *in vitro* se ha demostrado que ambas proteínas promueven la polimerización de la tubulina de forma aditiva. Además, DCX está implicado en la regulación del citoesqueleto de actina de forma directa e indirecta. También participa en la regulación de la proliferación de las neuronas en el desarrollo del cerebro junto a LIS1. En modelos animales en los que se han combinado la haploinsuficiencia de LIS1 y la total supresión de DCX existe un defecto muy severo de la migración y la proliferación neuronal, ya observada en los mutantes de ambos genes por separado (Pramparo *et al.*, 2011). Además, DCX juega un papel importante en la migración de neuronas en el ratón adulto al bulbo olfativo (Rakic, 1974).

Por otra parte, Messi y colaboradores en 2008 (Messi *et al.*, 2008), estudiaron la expresión de DCX en células en cultivo de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH. Dicha línea celular posee tres tipos celulares con morfología diferente, distinguibles mediante microscopía de contraste de fases y características funcionales también diferentes. En los experimentos realizados, demostraron que existe una expresión diferencial de DCX en los diferentes subtipos celulares de la línea celular. DCX se expresa de manera exclusiva en las células que presentan una alta motilidad y poder invasivo. Estos datos sugieren que la detección de DCX en células tumorales de pacientes con NB previo a tratamiento o tras diferentes fases del mismo podría señalar un conjunto de tumores con mayor agresividad y también podría predecir la recaída tras el tratamiento.

Esta serie de evidencias, las ya existentes en el momento en el que se propuso el marcador junto con las que se han ido acumulando posteriormente, respaldan la propuesta de la utilización de la expresión de DCX como marcador de EMR en neuroblastoma.

1.2.- Especificidad de los marcadores

Un primer paso antes de la utilización de cualquier marcador para el estudio de EMR es la validación de la especificidad del mismo. Este tipo de validaciones son preceptivas en cualquier estudio similar, tanto si se van a utilizar marcadores nuevos, como marcadores ya descritos.

Stutterheim y colaboradores propusieron a *PHOX2B* como posible marcador de EMR en neuroblastoma. Estudiaron 35 MO, 37 SP y 24 AF de individuos sanos mediante QF-PCR y no detectan la expresión del mismo en ninguna de las muestras. De esta manera concluyeron que cualquier expresión de *PHOX2B* en muestras de pacientes indicaría que la muestra es positiva (Stutterheim et al., 2008).

Estos mismos autores, en una publicación posterior en 2009, realizan una validación de un panel de 33 genes. En este caso descartan los marcadores que muestran tasas elevadas de expresión en las muestras control y eligen aquellos que presentan bajas o nulas tasas de expresión en estas muestras. Al final se quedan con 10 potenciales marcadores (*PHOX2B*, *TH*, *DDC*, *DBH*, *CHRNA3*, *GAP43*, *SNAP91*, *STNM2*, *STNM4*, *CHGB* y *B4GALNT1*) para ser sometidos al resto de validaciones (Stutterheim et al., 2009).

Cheung y colaboradores realizan experimentos similares con los marcadores *B4GALNT1*, *PHOX2B*, *CCND1* y *ISL1* utilizando como criterio de muestra positiva aquella que superara el umbral de expresión de cualquiera los marcadores en muestras normales, definida como la media más dos desviaciones estándar de los niveles detectados en MO o SP de donantes sanos (Cheung et al., 2015).

Los resultados observados en los ejemplos anteriores, como en los de otros muchos estudios publicados, demuestran la utilidad de este tipo de ensayos, tanto para la definición de posibles nuevas dianas como para la determinación de los umbrales de expresión residuales en tejidos normales. La ausencia total de expresión mostrada en alguno de ellos, como la presencia de niveles bajos de expresión, condiciona la interpretación de los resultados obtenidos en muestras de pacientes.

Por otra parte, diversos aspectos técnicos como la falta de homogeneidad en la cantidad de RNA de partida, el proceso de retrotranscripción, los oligonucleótidos utilizados en la amplificación mediante PCR e incluso el equipo utilizado condicionan la especificidad e incluso la sensibilidad de este tipo de experimentos. Todo ello hace imprescindible este tipo de validaciones en cada uno de los laboratorios que realizan estos ensayos. En nuestro caso, se utilizaron muestras de sangre periférica y médula ósea de donantes sanos (sin ninguna patología relacionada con procesos oncológicos) y las sometimos a las técnicas utilizadas en las diferentes

fases del trabajo (RT-PCR/Southern Blot o RT-PCR/QF-PCR). En el caso de *MAGE-A1*, *MAGE-A3* y *TH* estudiados mediante Southern blot no se detectó la expresión de ninguno de ellos en las muestras control. El mismo resultado lo obtuvimos en el estudio de *DCX* y *TH* mediante QF-PCR. Estos resultados nos permiten considerar como muestras positivas, todas aquellas muestras de los pacientes en las que se observe expresión de cualquiera de ellos.

En el caso de la detección de la expresión de los genes de la familia *GAGE*, el resultado mostró la expresión en 20 de las 35 muestras de sangre periférica estudiadas (59%) de controles sanos. Este alto porcentaje de muestras control positivas era totalmente discordante con los datos publicados previamente, lo que nos hizo profundizar en la posible causa del mismo. Dichos resultados los discutiremos en un apartado posterior.

1.3.- Expresión de los marcadores en tejido tumoral

Uno de los requisitos importantes que debe cumplir cualquier marcador utilizado en el rastreo de EMR es tener un nivel y una frecuencia elevada de expresión en tumor primario. Estas características nos garantizan el poder detectar, en una alta proporción de los casos, las células metastáticas procedentes del tumor en tejidos periféricos. Bajas frecuencias de expresión, restringen únicamente la utilización de los marcadores a un limitado número de casos, aquellos en los que el tumor primario expresara dicho marcador. Esta circunstancia hace que la aplicación de un marcador esté condicionada al estudio previo de su tumor primario. En nuestro caso, este estudio no hubiera sido posible en la mayoría de los casos. De la misma manera, un bajo nivel de expresión condiciona la sensibilidad deseada de este tipo de análisis.

En este apartado estudiamos la frecuencia y el nivel de expresión en los tumores de NB disponibles. Los resultados se pueden observar en la Figura 24. *DCX* y *TH* mostraron expresión en la práctica totalidad de los tumores, 98% y 95% respectivamente. En el caso de *MAGE-A3* la frecuencia de detección fue del 55% seguida de *GAGE* del 54% y *MAGE-A1* del 43%.

Los niveles de expresión se midieron de diferentes maneras en función de la técnica utilizada para el estudio de cada marcador. En los casos estudiados mediante Southern Blot (*MAGE-A1*, *MAGE-A3* y *GAGE*), se realizaron diluciones seriadas de los productos de PCR obtenidos a partir de tumor primario, llegando a detectar diluciones 1/10.000. Por otra parte en el caso de la QF-PCR (*TH* y *DCX*) se midieron los niveles de expresión de cada marcador frente a un gen de expresión constitutiva (*GAPD*), dando como resultado niveles de expresión similares o superiores a *GAPD*, demostrando altas tasas de expresión de ambos.

La frecuencia de expresión de los marcadores que presentamos en tumores primarios de neuroblastoma, a excepción de *DCX*, ya había sido descrita previamente. En el caso de *MAGE-A1* los datos obtenidos por otros grupos oscilaban entre el 44-66% (*Cheung et al., 1998; Soling et al., 1999; Brichard and Godechal, 2013*). Para *MAGE-A3* los porcentajes se encontraban entre el 33-76% (*Cheung et al., 1998; Soling et al., 1999; Brichard and Godechal, 2013*). En el caso de *GAGE* la frecuencia descrita era del 82% (*Cheung et al., 1997-B*). Finalmente, en el caso de *TH*, existe una alta coincidencia de los grupos en que la frecuencia de expresión en tumor primario es de alrededor del 98% (*Naito et al., 1991; Burchill et al., 1994*).

Los resultados obtenidos en nuestra serie son totalmente concordantes a los obtenidos previamente por otros grupos a excepción de *GAGE* en el que sí que existe una marcada diferencia del 82% descrito al 54% obtenido en nuestro caso. Dicho resultado se podría explicar por las diferencias metodológicas ya que los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la familia génica fueron diferentes, o por el número limitado de tumores que se utilizó en ambos casos.

Estos datos confirman que *TH* haya sido durante muchos años el marcador mayormente utilizado en la detección de EMR en neuroblastoma mediante RT-PCR. La justificación utilizada por la mayoría de los grupos para la utilización de marcadores como *MAGE-A1* o *MAGE-A3*, que se expresan en una limitada proporción de tumores, es salvar la heterogeneidad tumoral, mismo razonamiento al planteado por nuestro grupo para realizar la búsqueda de nuevos marcadores.

El análisis de todos los datos obtenidos nos lleva a proponer como marcadores óptimos para el estudio de EMR en neuroblastoma *TH* y *DCX* por los siguientes motivos:

- No se ha observado expresión residual de los mismos en muestras de SP y MO de individuos sanos.
- Se ha detectado expresión en la práctica totalidad de los tumores primarios de neuroblastoma estudiados.
- Los niveles de expresión de ambos en tumor primario son elevados.

No obstante, aunque el resto de marcadores no parecían ser óptimos tras los ensayos de validación, seguimos adelante con su estudio. En el caso de *GAGE*, para esclarecer la posible utilidad del mismo en este tipo de estudios, dadas las discordancias entre nuestros resultados y los publicados y en el caso de los genes de la familia *MAGE-A*, por el posible valor pronóstico de la detección de su expresión.

Por otra parte, *DCX* resultó especialmente interesante porque además de ser un marcador nuevo, propuesto por nuestro grupo, podría tener una posible utilidad como factor pronóstico al expresarse en células con alta motilidad y gran poder invasivo en la línea celular de NB SK-N-SH.

2.- Exclusión de la expresión de los genes *GAGE* como marcadores de EMR en neuroblastoma

Al observar la alta tasa de expresión de *GAGE* en las muestras de SP procedentes de individuos sanos y que en las publicaciones previas existentes sólo referían un falso positivo en una muestra de un control de sangre periférica (*Cheung et al., 1998*), se decidió profundizar alrededor de este hallazgo con el fin de cuestionar la posible utilidad del estudio de la expresión de los genes de esta familia como marcadores de EMR.

Van der Eyden estudió la expresión de los genes familia *GAGE* (*GAGE-1* a *GAGE-6*) en diferentes tejidos normales y tejidos tumorales (*Van der Eyden et al., 1995*). Sus resultados demostraron la ausencia de expresión en tejidos normales excepto en testículo, sin embargo, pudo observar que en una gran variedad de tumores de diferentes tipos histológicos (melanoma, sarcomas, carcinoma de pulmón de células grandes, tumores de cabeza y cuello, etc.) se expresaba al menos en uno de ellos.

Asumiendo que la expresión de estos genes parecía ser específica de tumores, Cheung y colaboradores propusieron el uso del estudio de la expresión de los antígenos de la familia *GAGE* como potenciales marcadores en el estudio de la EMR en neuroblastoma (*Cheung and Cheung, 1997-B*). En este trabajo estudiaron 9 muestras de MO de voluntarios sanos y no observaron expresión en ninguna de ellas. Sin embargo, en un trabajo posterior, el mismo grupo estudió 17 MO y 17 SP de donantes sanos, detectando expresión de *GAGE* en una de las sangres periféricas (*Cheung et al., 1998*). En este caso midieron la expresión únicamente de los miembros de la familia *GAGE-1*, *GAGE-2* y *GAGE-8*. En el momento de la descripción de estos hallazgos, no existían más series de muestras de donantes sanos estudiadas para la expresión de estos genes.

En vista de los datos publicados altamente discordantes con los resultados preliminares obtenidos con nuestra serie de muestras de SP de donantes sanos (20 muestras positivas de un total de 35 sangres estudiadas, estudiando de forma simultánea la expresión de todos los miembros de la familia), decidimos profundizar en estos hallazgos, con el fin de defender o rechazar la posible utilidad del estudio de la expresión de estos genes en muestras de SP o MO de pacientes con NB con el fin de detectar enfermedad residual.

Las discrepancias observadas con las publicaciones previas podrían explicarse en parte por las diferencias en el diseño experimental. En el caso del grupo de Cheung, el estudio se restringía a 3 miembros de la familia (*GAGE-1*, *-2* y *-8*), mientras que el diseño realizado por nuestro grupo permitía estudiar la expresión de todos los genes de la familia *GAGE* simultáneamente. Ante estos hallazgos, diseñamos oligonucleótidos para el estudio por separado de estos tres miembros de la familia y así poder comparar nuestros resultados con los publicados previamente. Si observamos la Tabla 5.3 de los resultados, en este caso pudimos observar que 10 de las 35 muestras (29%) de SP de voluntarios sanos estudiados resultaron ser positivas.

Por otra parte, las diferencias en la metodología de detección aplicada, también podrían explicar las diferencias observadas, ya que conseguimos una mayor sensibilidad que la descrita por el grupo de Cheung. En nuestro caso utilizamos oligonucleótidos más largos, un mayor número de ciclos de PCR y transferimos los productos de PCR a una membrana de nilón mediante Southern blot y los hibridamos posteriormente con una sonda marcada con digoxigenina detectando la señal mediante inmunofluorescencia. La sensibilidad conseguida por el grupo de Cheung era inferior que en nuestro caso que conseguimos detectar hasta diluciones 1/10.000 de productos de PCR a partir de células de una línea celular o de tumor primario. En este sentido, en nuestro caso, en 2 de los 35 controles estudiados ya conseguimos observar la expresión de *GAGE* directamente en el gel de agarosa, esta proporción sería concordante con la publicada previamente.

También se han descrito bajas tasas de expresión de otros antígenos específicos de cáncer y de testículo (*CT15*, *CT16* y *NY-ESO-1*) en células normales no gametogénicas. Este hecho demuestra que la expresión de los mismos no está siempre restringida a tejido normal testicular. Por lo tanto, el aumento de la sensibilidad de las técnicas compromete su posible utilización como marcador de EMR en neuroblastoma u otros tumores sólidos.

La expresión observada en una proporción importante de muestras de donantes sanos estudiados, junto con los resultados obtenidos en las diferentes muestras y grupos de pacientes con NB estudiados nos hace concluir que los genes de la familia *GAGE* no son útiles para el estudio de EMR en neuroblastoma.

3.- Validación de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real de *GAPD*, *TH* y *DCX*.

Tras la adquisición de un equipo de PCR cuantitativa en tiempo real, nos replanteamos la metodología de detección de EMR. El análisis preliminar de

los datos obtenidos, algunos ya discutidos anteriormente, nos hizo decidir continuar y centrar el estudio a partir de ese momento en dos de las dianas: *TH* que había demostrado ser el marcador más eficiente hasta el momento (Burchill et al., 1994; Miyajima et al., 1995; Miyajima et al., 1996; Kuroda et al., 1997; Trager et al., 2003; Burchill., 2004; Stutterheim et al., 2008; Stutterheim et al., 2009) y *DCX*, nuevo marcador propuesto por nuestro grupo que cumplía los requisitos para ser un buen marcador de células tumorales circulantes en neuroblastoma.

La QF-PCR presenta una serie de ventajas ante otros métodos. Una mayor sensibilidad frente a las citologías (sensibilidad de detección de 1 célula tumoral entre 10.000 células normales) (Cheung et al., 1997-A; Mehes et al., 2003), o la inmunocitología con GD2 en MO (sensibilidad 1 célula tumoral en 100.000 células normales) (Swerts et al., 2005). La sensibilidad descrita alcanzada en el caso de la QF-PCR es la posibilidad de detectar una célula tumoral entre un millón de células normales (Viprey et al., 2007). Por otra parte, se trataba de una técnica menos laboriosa y más barata. No necesita de técnicas de post procesado de la muestra tras la PCR para la detección de los productos de la misma, evitando la utilización de productos contaminantes como el bromuro de etidio o la formamida y disminuyendo de forma importante el tiempo de obtención de los resultados. Además disminuye de forma significativa el riesgo de contaminación debido a que la amplificación y el proceso de detección concurren de forma simultánea y cerrada en el termociclador.

Al tratarse de un método cuantitativo, realizamos un análisis de validación. Se realizó una amplificación de los dos marcadores (*TH*, *DCX*) y un gen de expresión constitutiva (*GAPD*) utilizando diluciones seriadas (1 a 1/100000) de un cDNA tumoral. Los resultados obtenidos nos permitieron calcular el coeficiente de correlación de la curva patrón, que en los tres casos fue cercano a 1. Este dato nos indica que el diseño de la PCR es cuantitativa en todo el rango estudiado y que por lo tanto el comportamiento es independiente a la cantidad de cDNA molde de partida. Por otra parte se calculó la pendiente, este dato está relacionado con la eficiencia, en los tres casos la misma mostró estar próxima al 100%. Por último se calculó la intersección con el eje de la Y, mostrando los tres la misma sensibilidad. Los parámetros obtenidos fueron óptimos según los estándares de calidad sugeridos por la casa comercial proveedora del termociclador, las sondas, oligonucleótidos y el resto de reactivos utilizados (*Applied Biosystems*).

Finalmente, se analizó la variabilidad observada entre las réplicas con el fin de evaluar la amplificación independiente entre los tubos en los tres marcadores, además de evaluar los posibles errores de pipeteo. La variabilidad entre los valores de ΔCT fue de 0,1, lo que confirmó que la técnica diseñada muestra una alta precisión y reproducibilidad.

Además de estos experimentos, se aprovechó la participación de nuestro grupo de investigación en el Grupo de Trabajo SIOPEX para la estandarización de procedimientos en el estudio de enfermedad mínima residual en neuroblastoma para el análisis de la sensibilidad de la metodología utilizada (*Viprey et al., 2007*). Resumidamente, se analizaron muestras de sangre periférica de donantes sanos a las que se añadió diferentes números de células tumorales de la línea celular de neuroblastoma IMR-32 o las mismas muestras a las que se les añadió cantidades crecientes de RNA procedente de la misma línea celular. Los resultados obtenidos en dichos experimentos (no mostrados en la presente tesis) permitieron demostrar que la metodología diseñada permite la detección de 1-10 células tumorales en un pool de 10^6 células normales.

Los resultados obtenidos nos garantizan la fiabilidad de la cuantificación de los transcritos, la reproducibilidad y la sensibilidad de la técnica. Por otra parte, el comportamiento similar entre los marcadores nos permite la comparación de los valores obtenidos en la cuantificación de forma altamente fiable. En resumen, se trata de una metodología adecuada para la obtención de datos robustos en las muestras biológicas de los pacientes con neuroblastoma.

4.- Comparación de los estudios de expresión realizados para TH, mediante Southern Blot y QF-PCR.

El desarrollo de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real aumenta el alcance y el potencial para la monitorización de la enfermedad mínima residual, dotándonos de la posibilidad de disponer de análisis cuantitativos, una sensibilidad superior y una interpretación más objetiva. Además dada su mayor sencillez a nivel técnico, nos permite disponer de una herramienta de alto rendimiento debido a la eliminación de todos los pasos post PCR y la posibilidad de realizar una la cuantificación precisa de uno o varios marcadores en multitud de muestras clínicas. Una de las desventajas es que no permite la cuantificación exacta del número células tumorales en la muestra estudiada debido a que el nivel de expresión del mRNA de cada marcador varía en las diferentes muestras e incluso células (*Beiske et al., 2009*).

En la bibliografía consultada al inicio del estudio, existían diferentes aproximaciones técnicas para el estudio de la EMR, algunas de ellas se basaban en una única ronda de PCR y detección de la señal en geles de agarosa (*Burchill et al., 1994; Corrias et al., 2004*), la detección de los productos de PCR amplificados en geles de agarosa tras dos rondas de amplificación (PCR anidada) (*Shono et al., 2000; Fukuda et al., 2001*) o la amplificación mediante una ronda de PCR y la posterior detección mediante la técnica de Southern blot (*Cheung et al., 1997-B; Scarcella et al., 1999*).

Por otra parte, todos los grupos en publicaciones posteriores adoptaban la técnica de QF-PCR (Cheung *et al.*, 2006; Cheung *et al.*, 2007; Viprey *et al.*, 2007), justificada por todas las ventajas que hemos mencionado anteriormente, sin embargo, en ninguno de los casos se describían las diferencias en cuanto a los resultados obtenidos con ambas aproximaciones.

Esta circunstancia y la de disponer de un número elevado de casos apareados estudiados mediante RT-PCR/Southern blot y QF-PCR nos permitió realizar un análisis comparativo de los datos existentes.

Tanto el análisis simultáneo de la totalidad de las muestras, como el análisis por separado según el tipo de muestra analizada, permitieron concluir que existe una alta correlación en la detección de TH mediante ambas técnicas. La coincidencia global fue del 87% (Tabla 13), siendo del 83% en MO, del 88% en SP, del 96% en AF y del 100% en T (Tabla 14).

Pudimos observar 96 muestras en las que la QF-PCR fue positiva y la RT-PCR/Southern negativa y el caso contrario sólo se dio en 23. La proporción de discrepancia fue muy similar en SP y en MO. Esta aparente contradicción en 23 muestras que habían sido positivas en el estudio por RT-PCR/Southern resultaron negativas en el estudio posterior por QF-PCR se puede explicar porque en todos los casos se trataba de muestras históricas que no se habían estudiado de manera simultánea. El estudio de QF-PCR se realizó de manera retrospectiva por lo que el resultado se pudo ver influido por la fragilidad de las muestras de cDNA. En el caso de las muestras históricas, habían pasado varias veces por ciclos de congelación descongelación para el análisis de los diferentes marcadores y de todas las pruebas realizadas a lo largo de la tesis. Por lo tanto, en este tipo de trabajos, la fiabilidad de los estudios de EMR va a depender mucho de la integridad de las muestras y de su correcta utilización y conservación.

Por otra parte, se analizaron los valores de ΔCT observados en las muestras positivas mediante QF-PCR y negativas mediante Southern blot. Los resultados de dicho análisis demostraron que se trataba de muestras en las que se habían detectado valores muy bajos de expresión de TH, demostrando una mayor sensibilidad de la QF-PCR.

Finalmente los resultados positivos de PCR cuantitativa se clasificaron en tres grupos en función del resultado de la RT-PCR/Southern. Un primer grupo si la expresión de los marcadores era evidente en la electroforesis en el gel de agarosa, asignándole un nivel de expresión 2, un segundo grupo en aquellos casos donde sólo se observaba tras el Southern se le asignó un valor 1 y un tercer grupo para aquellos en los que no se observó expresión se les asignó el valor 0 (Figura 26). Los resultados permitieron observar diferencias en las medianas de los tres grupos aunque los rangos de valores fueron solapantes. La mayoría de las muestras que habían sido

negativas por Southern Blot, tenían valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ que indican unos niveles de expresión muy bajos, mientras que la mayoría de las muestras a las que se había asignado un nivel 2 de expresión en la RT-PCR/Southern, mostraron niveles de $2^{-\Delta\Delta CT}$ típicos de una expresión elevada.

En conclusión, la QF-PCR ha demostrado una mayor sensibilidad en la detección de la expresión de TH a la obtenida mediante RT-PCR/Southern, siendo la primera aproximación la técnica óptima para la detección de EMR en neuroblastoma.

5.- Comparación de los estudios de expresión realizados mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real para la expresión de TH y DCX.

Numerosos investigadores han utilizado la QF-PCR como herramienta de estudio de EMR en diferentes tipos de tumores. La mayor especificidad en este tipo de análisis se consigue cuando la diana de estudio es específica del tumor, un ejemplo lo encontramos en la detección del reordenamiento EWS-ETS mediante la detección del transcrito quimera específico en los tumores de la familia del Sarcoma de Ewing. Sin embargo, en muchos tumores, incluyendo el neuroblastoma, no se han descrito marcadores específicos del tumor, lo que ha supuesto la utilización de marcadores específicos de tejido. Esta aproximación supone la identificación de dianas específicas del tumor que no se encuentren en los tejidos estudiados para la detección de la enfermedad residual (*Beiske et al., 2005*).

Las células de los tumores de neuroblastoma son secretoras de catecolaminas, en consecuencia, el primer enzima de la ruta de la síntesis de las mismas, la Tirosina Hidroxilasa (*TH*), ha sido ampliamente estudiada para la detección de células tumorales mediante RT-PCR (*Burchill, 2004*). Multitud de marcadores han sido descritos con el mismo objetivo. Un ejemplo es GD2 sintasa, que es un antígeno que se expresa de forma ubicua y de forma permanente y abundante en neuroblastoma (*Cheung et al., 2001-A*).

La detección de *TH* mediante QF-PCR ha permitido la detección de enfermedad residual con significado clínico y con una alta sensibilidad y especificidad comparada con los métodos microscópicos convencionales. Sin embargo, no en todos los casos permite la detección de células tumorales en MO o SP en niños con enfermedad avanzada. Este hecho se ha interpretado como un falso negativo. La aparente ausencia de células tumorales en estas muestras puede ser debida a la propia heterogeneidad del tumor, la dilución de las células tumorales en el conjunto de células normales del tejido o a posibles problemas técnicos. Además en muchos tumores se ha demostrado que existen diferencias en los niveles de expresión de los diferentes marcadores analizados, lo que sugiere que la detección de células tumorales mediante RT-PCR se debe realizar mediante

la utilización de múltiples marcadores (*Stutterheim et al., 2008*). Esta aproximación permite señalar como resultado positivo la detección de la expresión de cualquiera de ellos, interpretándose finalmente como infiltración de células tumorales.

En este sentido, nuestro grupo propuso el estudio simultáneo de TH y DCX como marcadores específicos de EMR en neuroblastoma mediante QF-PCR.

Para valorar la posible utilidad de DCX en muestras de pacientes, se compararon los resultados con TH, del que ya existen multitud de estudios publicados. La coincidencia entre ambos marcadores fue del 87%, encontrándose discrepancias en 91 muestras en las que se encontró expresión de TH y no de DCX y 88 muestras en la que observamos el resultado contrario (Tabla 15). En este caso, aunque el nivel de expresión de cualquiera de ellos en las muestras discrepantes fue muy bajo, las diferencias no se pueden deber a la posible degradación de la muestra ya que en estos casos, todos los estudios se realizaron de manera simultánea. Los resultados en las muestras por separado de MO y SP fueron similares a los observados en el conjunto total (Tabla 16). La posible explicación, como hemos mencionado anteriormente, puede ser por diferencias en los niveles de expresión de las diferentes dianas en tumores distintos.

Por otra parte se realizó una correlación de Pearson entre los niveles de expresión de ambos marcadores (Tabla 17, Tabla 18 y Figura 27) utilizando la totalidad de los datos y seleccionando únicamente los casos doblemente positivos. En ambos supuestos se observó una correlación altamente significativa entre los niveles de expresión de ambos marcadores ($p < 0,001$). Este dato nos demuestra un comportamiento muy similar entre ambos genes, lo que demuestra la utilidad de DCX en el estudio de EMR en neuroblastoma.

Bozzi y colaboradores hacen un estudio similar al nuestro estudiando DDC y TH en pacientes diagnosticados de neuroblastoma con enfermedad diseminada. Ellos también observan una buena correlación entre la expresión de estos marcadores en las muestras estudiadas. Al igual que en nuestro caso, proponen el estudio de más de un marcador de manera simultánea como estrategia para el estudio de EMR en este tumor (*Bozzi et al., 2004*).

A la vista de los resultados, proponemos la detección de la expresión de TH y DCX como herramienta para la detección y monitorización de la EMR en neuroblastoma.

6.- Estudio mediante inmunocitología con anticuerpos Anti-GD2.

Actualmente, el anticuerpo Anti-GD2 es una molécula aceptada para el tratamiento de los neuroblastomas de alto riesgo (*Yu et al., 2010, Cheung et al 2012*). Las estrategias ensayadas para la implantación de dicho tratamiento son variadas, desde anticuerpos conjugados con radioisótopos, drogas, nano partículas y receptores antigénicos quiméricos. El gangliósido GD2 se expresa en algunos tipos de células madre y en diversos tipos de tumores sólidos pediátricos y de adultos entre los que se encuentran: el neuroblastoma, astrocitomas, retinoblastoma, el sarcoma de Ewin, rabdomiosarcomas, osteosarcomas, leiomiomas, liposarcomas, fibrosarcomas, cáncer de pulmón de células pequeñas, melanoma y cáncer de mama. Este anticuerpo tiene multitud de ventajas en el tratamiento dirigido del neuroblastoma, una de las más importantes es su alta densidad de expresión en células tumorales y una restricción importante de expresión en tejidos normales (*Suzuki and Cheung, 2015*).

Las mismas características que sirvieron de base para proponer un uso terapéutico del anticuerpo Anti-GD2 sirvieron para proponerlo como marcador de detección de EMR.

En este sentido, varios han sido los estudios que han intentado correlacionar el número de células detectadas mediante las técnicas inmunocitológicas o inmunocitológicas/FISH con la evolución de los pacientes. Los resultados obtenidos en todos ellos son difícilmente comparables, ya que tanto la metodología utilizada como el tratamiento de los resultados han sido diferentes.

En el presente apartado nos centraremos en la parte más descriptiva de los datos obtenidos dejando el análisis del valor pronóstico de la detección inmunocitológica para apartados posteriores.

Los datos obtenidos en el presente apartado demuestran un mayor número de casos positivos en las muestras analizadas tanto de MO como de SP en los casos con enfermedad diseminada. Dicha diferencia sólo resultó ser significativa en el caso de la MO (Tabla 19).

En los pacientes con enfermedad localizada (11 estadio 1, 13 estadio 2 y 24 estadio 3), en un 23% de las muestras de MO y en un 8% de las de SP se observaron células tumorales positivas para GD2.

Pocos son los estudios realizados en este grupo de pacientes por lo que la valoración de los mismos es difícil, sin embargo, los datos obtenidos son similares con los previamente publicados. Corrias y colaboradores, describen un 14% de muestras positivas en un estudio realizado en un grupo de 126 pacientes con enfermedad localizada (59 estadio 1, 35 estadio

2 y 32 estadio 3) (Corrias *et al.*, 2008). Por otra parte, Mehes y colaboradores, describen un 38,5% de positividad en MO para casos localizados (3 estadio 1, 3 estadio 2 y 7 estadio 3) (Mehes *et al.*, 2001-B). Las diferencias observadas podrían ser perfectamente explicables por el bajo número de pacientes estudiados en nuestro caso o en el caso de Mehes y colaboradores, y por las diferencias en los porcentajes de pacientes de cada estadio incluidos. De hecho, el mayor porcentaje de casos positivos lo observamos los datos publicados por Mehes y colaboradores, donde los pacientes estadio 3 representan el 54% del total frente al 25% en el caso de la serie publicada por Corrias y colaboradores, o al 50% de nuestra serie. En los tres casos, el porcentaje de positividad en muestras de MO de los pacientes en estadio 3 es marcadamente superior a los observados en los estadios 1 y 2.

En el caso de pacientes con enfermedad diseminada, el número de estudios realizados es mayor, aunque la mayoría se centran en pacientes estadio 4. Además, algunos de ellos muestran los datos en el diagnóstico y en diferentes momentos del tratamiento, lo que nos permite el poder valorar la respuesta al mismo.

Nuestros datos muestran un 87% de los pacientes estadio 4 positivos al diagnóstico en MO y un 62% en SP. Los datos obtenidos son concordantes con los obtenidos por el grupo de Seeger, en el que se describe un 81% de casos positivos al diagnóstico en MO y un 58% en SP (Seeger *et al.*, 2000). Los datos publicados por Cheung y colaboradores, muestran un 100% de casos positivos, aunque sólo se estudian 13 casos al diagnóstico (Cheung *et al.*, 1998). En el caso del grupo de Mehes, este porcentaje es del 95%, aunque ellos utilizan inmunofluorescencia en vez de inmunocitología (Mehes *et al.*, 2001-B). Como conclusión, podemos decir que en la práctica totalidad de los casos con neuroblastoma estadio 4, la inmunocitología ha permitido la detección de la presencia de células tumorales en la MO de los pacientes al diagnóstico.

En nuestro estudio, no disponemos de número suficiente de muestras a lo largo del tratamiento para poder valorar la eficiencia del mismo, sólo disponemos de 29 muestras de sangre periférica (de pacientes estadio 3 y 4) en el momento de la cirugía que resultaron ser negativas y 21 muestras de MO, de las que 7 fueron positivas (seis MO positivas de cuatro pacientes estadio 4 y una MO positiva de un paciente estadio 3 de alto riesgo). Si nos centramos en los pacientes estadio 4, en un 30% de los pacientes en el momento de la cirugía (tras la quimioterapia de inducción) se detectaron células tumorales de neuroblastoma en la médula ósea, aunque el número de células en todos los casos fue muy bajo.

Seeger y colaboradores, como ya hemos comentado antes, describen un porcentaje del 81% de los pacientes positivos en MO al diagnóstico. Dicho porcentaje disminuye al 55% tras 4 semanas de tratamiento, al 25% a las 12

semanas, al 19% en el momento de la recogida de la AF y a un 14% tras quimioterapia de inducción. En sangre periférica, el porcentaje disminuye del 58% al diagnóstico al 5% tras quimioterapia de inducción (Seeger *et al.*, 2000).

En el estudio publicado por Cheung y colaboradores, ya mencionado, la evolución observada es del 100% al diagnóstico al 36% tras la quimioterapia de inducción en los estudios en MO (Cheung *et al.*, 1998).

En todos los estudios podemos observar una disminución notable de las células tumorales detectadas en MO o SP tras los tratamientos, sin embargo, los porcentajes observados no son fácilmente comparables, ya que los momentos de la toma de las muestras y los tratamientos recibidos por los pacientes son diferentes. En resumen, tras la quimioterapia de inducción la disminución oscila del 87% al 30% en nuestro caso, del 81% al 14% en el estudio de Seeger y colaboradores y del 100% al 36% en el caso de Cheung y colaboradores.

Otro dato que se valoró en nuestra serie de pacientes, fue la presencia de células tumorales positivas para GD2 en la recaída. En este caso, sólo se disponía de muestras suficientes de pacientes estadio 4, un 40% de las SP analizadas resultaron positivas para este marcador, aumentado este porcentaje al 80% en el caso de la MO. Este dato también es analizado por el grupo de Cheung, observando un 64% de MO positivas también en pacientes estadio 4 en la recaída (Cheung *et al.*, 1998).

Como hemos podido observar, la valoración de los datos obtenidos en nuestro estudio es ciertamente complicada. Por una parte, existen diferencias en las técnicas utilizadas, en la valoración de la positividad de las muestras, el criterio de célula positiva en cada uno de los casos y muchas veces depende de la interpretación del observador. En este punto, es necesario tanto la utilización de técnicas y protocolos estándar, como criterios uniformes de valoración de los resultados. En nuestro caso se utilizaron las recomendaciones del grupo europeo de neuroblastoma publicados por Swerts y colaboradores (Swerts *et al.*, en 2005), en los que colaboramos directamente en su elaboración y control de calidad. Además, en todos los casos, la revisión de las muestras tuvo lugar simultáneamente por dos observadores y los casos dudosos fueron revisados por el grupo europeo de EMR de la ESIOP.

Por otra parte, y no menos importante, los protocolos y esquemas de tratamiento utilizados en los pacientes incluidos en las diferentes publicaciones fueron distintos, este hecho es otro escollo en la posible comparación de los resultados obtenidos.

Por lo tanto, pensamos que es imprescindible, para poder llegar a conclusiones robustas, que este tipo de estudios se realicen utilizando metodologías estandarizadas con controles de calidad y en el seno de protocolos internacionales. Esto garantiza por una parte la solidez de los datos obtenidos y por otra parte un gran número de pacientes en los que se utilice los mismos esquemas de tratamiento.

Finalmente, debido a la complejidad de la técnica y la gran dedicación de tiempo que requiere, se decidió comparar los resultados obtenidos con los disponibles para las mismas muestras por QF-PCR con *TH* y *DCX*. Dicha comparación se realizó en 252 muestras (Tabla 22) observando sólo cuatro muestras en las que la inmunocitología mostró la presencia de células tumorales y no fueron positivos los marcadores utilizados en la QF-PCR. Las discrepancias se dieron en tres muestras de MO y en una muestra de SP. En dos MO sólo se observó una célula tumoral, en la otra MO 10 y en la muestra de SP dos células positivas. Por el contrario, un 52% de las muestras negativas por inmunocitología, fueron positivas para la expresión de *TH* o *DCX* por RT-PCR.

Con todo ello, aunque es la única técnica que permite el conteo celular, no consideramos la inmunocitología como la primera aproximación al estudio de EMR en neuroblastoma, siendo más eficaz y sensible el estudio mediante QF-PCR de los marcadores *TH* y *DCX*.

7.- Evaluación del valor pronóstico de la expresión de los marcadores de EMR en tumor primario.

El neuroblastoma es reconocido por su gran heterogeneidad tumoral caracterizada por la gran diversidad de comportamientos clínicos, encontrando desde una regresión espontánea a la rápida progresión tumoral que puede llevar a la muerte del paciente (*Westermann, 2002*). Se trata de un tumor sólido en el que los factores biológicos permiten obtener datos de importancia en el pronóstico y que condicionan las diferentes estrategias terapéuticas a usar en cada paciente. El tratamiento de los pacientes se estratifica según los grupos de riesgo del INRG, que se basan, no sólo en el estadio del INSS, la edad al diagnóstico y la histología, sino también en los factores genéticos y genómicos del mismo. Algunas de estas alteraciones genéticas son factores pronósticos muy potentes y por lo tanto esenciales en la caracterización del tumor. Aunque los grupos de riesgo son relativamente predictivos del comportamiento clínico del tumor, no son capaces de predecir pequeños subtipos de pacientes en los que el comportamiento clínico se aparta del esperado (*Brodeur, 2003*). La descripción de marcadores pronósticos adicionales para mejorar la subdivisión de los tumores, y en consecuencia el tratamiento de los pacientes es un objetivo importante en la oncología pediátrica.

Consecuencia de ello, muchos son los marcadores moleculares que se han descrito para el estudio de EMR en los últimos años. Entre ellos se encuentran desde antígenos específicos de cáncer/testículo, enzimas implicados en la síntesis de catecolaminas, genes relacionados en el desarrollo y migración neuronal, etc. La mayoría de los estudios se han restringido a la validación de su uso en la detección de células tumorales en MO o SP y su posible repercusión en el pronóstico de los pacientes, sin hacer hincapié en el estudio de los mismos en el tejido tumoral y su posible utilidad pronóstica. Como hemos comentado en apartados anteriores, la obtención de los datos de expresión en tumor es esencial en la validación del posible uso para la detección de EMR en los diferentes tejidos de estudio. El disponer de estos datos, nos ha permitido realizar un estudio de supervivencia testando su posible valor pronóstico.

Por otra parte, muchos de estos marcadores y en especial los antígenos asociados a melanoma (*MAGE*), han sido ampliamente estudiados en otras series de tumores como melanomas, carcinomas renales, tumores hematológicos, carcinoma de ovario, etc., por su elevado potencial como diana terapéutica para el tratamiento inmunoterápico. Estos también podrían ser una diana interesante en el tratamiento del neuroblastoma.

Los estudios se realizaron en 59 tumores primarios en los que se estudió la expresión de *TH*, *MAGE-A1*, *MAGE-A3*, *GAGE* y *DCX*.

Aproximadamente un 95-98% de los tumores de neuroblastoma expresan catecolaminas, en consecuencia el primer enzima de la síntesis de las mismas, la Tirosina Hidroxilasa (*TH*), ha sido una de las dianas más explotadas en el estudio de EMR en este tumor.

Diversos miembros de la familia *MAGE* han sido utilizados como marcadores de EMR, sin embargo los más utilizados han sido el *MAGE-A1* y el *MAGE-A3*. Estos antígenos se expresan específicamente en células germinales masculinas durante la espermatogénesis, pero también han mostrado expresión ectópica en varios tipos de tumores.

El gen *MAGE-A1* codifica un antígeno humano, que es reconocido por los linfocitos T citolíticos (células T natural killer) (*Rogner et al 1995*). La expresión de *MAGE-A1* en tumores de neuroblastoma ha sido estudiada por diversos grupos llegando a la conclusión que se expresa en un 44-66% de las muestras tumorales. Esta expresión se correlaciona con la ausencia de amplificación de *MYCN* y con niveles normales de ferritina sérica (*Soling et al., 1999; Wolff et al., 2005*). Aunque *MAGE-A1* se ha propuesto como marcador para la detección de EMR en neuroblastoma, el que no exista una relación entre su expresión con el estadio del tumor y que no se exprese de manera estable a lo largo de la progresión tumoral hace que su utilidad sea realmente limitada (*Cheung et al., 2001-B*).

La familia génica *GAGE* tiene grandes similitudes con los miembros de la familia *MAGE*. Los genes de la familia *GAGE* se sitúan en el cromosoma X, específicamente en Xp11.2-p11.4 y consta de un total de 8 miembros (*GAGE-1* a *GAGE-8*) (De Backer et al., 1999). Al igual que los genes *MAGE*, los genes de la familia *GAGE* se expresan de forma específica en tejido testicular normal y en varios tipos de tumores con orígenes histológicos diversos (Cheung et al., 1998). También codifica un antígeno humano que es reconocido por los linfocitos T citotóxicos (células T natural killer). Su expresión en tumores de neuroblastoma es ligeramente superior que el de la familia *MAGE* llegando a ser de un 80%. Sin embargo, como hemos demostrado en este trabajo, su detección no es útil para el estudio de EMR en neuroblastoma.

El gen de la doblecortina (*DCX*) se localiza en Xq22.3-q23. Codifica para una proteína asociada a microtúbulos que favorece la nucleación, el ensamblaje y la estabilidad de los filamentos de microtúbulos. Muestra una expresión específica en neuronas en migración del sistema nervioso central y periférico. Su expresión es necesaria para la migración neuronal en el cortex, y está probablemente implicado en la regulación dinámica de la morfología de las neuronas en migración (Gleeson et al., 1999; Lo Turco, 2004; Tanaka et al., 2004).

Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas entre la expresión de *TH*, *DCX*, *MAGE-A3* o *GAGE* y la supervivencia o la SLE en el estudio sobre el total de tumores. Al realizar el mismo estudio en los cuatro marcadores en función del estadio del tumor (localizados y diseminados), sexo, edad al diagnóstico o amplificación de *MYCN*, sólo se observaron diferencias significativas entre la expresión de *GAGE* y la SLE en el subgrupo de niñas ($p=0,013$). Este resultado se basa solamente en el estudio de 15 tumores en los que se observó expresión de *GAGE* en 9 de ellos y en los que sólo se observó un evento (éxito). En el resto de los 6 tumores en los que no se observó la expresión del gen, se observaron un total de cuatro eventos (dos recaídas y dos éxitos). El bajo número de tumores estudiados en este subgrupo, haría necesario el estudio de una serie más grande para poder confirmar el valor pronóstico de *GAGE* en tumor primario en niñas.

Los análisis de supervivencia y SLE en función de la expresión del gen *MAGE-A1* mostraron diferencias significativas, siendo los tumores que presentaban expresión de *MAGE-A1* los que tuvieron mayor supervivencia.

También pudimos observar una correlación significativa entre la expresión de *MAGE-A1* y el estadio tumoral ($p=0,0024$), con una expresión predominante en tumores localizados. Este fenómeno sin duda contribuye a la asociación observada entre la expresión del gen y la supervivencia, sin

olvidar que los resultados de la regresión de Cox nos indican que la expresión de este marcador es mejor predictor de buena supervivencia que el estadiaje.

Como ya hemos comentado antes, estos resultados fueron totalmente diferentes a los obtenidos con la expresión del gen *MAGE-A3*, aunque se trata de dos miembros de una misma familia génica, su expresión no es coincidente. *MAGE-A1* se expresa en 23/53 tumores y *MAGE-A3* en 29/53 tumores, coexpresándose en sólo 19 de ellos. Sin embargo en el caso de *MAGE-A3* no se observa una correlación de la expresión del mismo y el estadio tumoral.

Al analizar la expresión de *MAGE-A1* y *MAGE-A3* con otras características biológicas del tumor como la amplificación de *MYCN* o parámetros clínicos como la edad al diagnóstico (separada en mayores o menores de 18 meses) o el sexo, no observamos ninguna correlación significativa.

Con el fin de evaluar el carácter independiente de *MYCN* y la expresión de *MAGE-A1*, se realizó una regresión de Cox. Los resultados obtenidos demuestran que *MYCN* y *MAGE-A1* tienen un valor predictivo independiente tanto en la supervivencia como en la SLE, con valores de significatividad elevada de ambos en los dos casos. Por lo tanto, la expresión de *MAGE-A1* es útil como factor de buen pronóstico complementario e independiente de la ausencia de amplificación de *MYCN*.

El comportamiento diferente entre los genes de la familia *MAGE* ha sido descrito en varios tipos de tumores. Daudi y colaboradores estudian la expresión de varios miembros de la familia *MAGE* en carcinomas epiteliales de ovario y observan que la expresión de *MAGE-A1* y *MAGE-A10* se asocia con mal pronóstico (Daudi *et al.*, 2014). Este comportamiento, no se observa en el caso de *MAGE-A3*. En general concluyen que los genes de la familia *MAGE* se expresan de manera más frecuente en pacientes con enfermedad avanzada y mal pronóstico, indicando que su expresión está asociada a la tumorigénesis. Además, varios estudios han demostrado que las proteínas *MAGE* son críticas para la supervivencia celular, aumentando las propiedades tumorigénicas de las células en las que se expresan (Monte *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008).

De la misma manera, Yin y colaboradores estudian la expresión de los genes *MAGE-A1*, *-A3* y *-A12* en carcinomas de células claras (Yin *et al.*, 2014). En este caso sólo detectan una correlación significativa entre la expresión de *MAGE-A3* y estadios avanzados del tumor.

Guo y colaboradores obtienen resultados similares en gliomas. En este caso, estudian la expresión de *MAGE-A1*, *-A3* y *-A11*, observando una asociación de la expresión de *MAGE-A1* y *-A11* con tumores de alto grado

y pronóstico adverso de la enfermedad. Dicho fenómeno no se observa sin embargo en el caso de la expresión de *MAGE-A3* (Guo *et al.*, 2013).

Estos ejemplos demuestran el diferente comportamiento mostrado por los miembros de la familia génica *MAGE* en distintos tipos de tumores, al igual que en nuestra serie de neuroblastoma. De hecho, el comportamiento de *MAGE-A1* y *MAGE-A3* se ha mostrado en todos los casos diferente, estando asociado bien uno o el otro al pronóstico adverso de la enfermedad. Sin embargo, el dato que más llama la atención es que en los distintos estudios publicados, la expresión de los diferentes miembros de la familia se suele asociar a estadios avanzados de los tumores y correlaciona con un pronóstico adverso de la enfermedad. Este hecho se explica por la expresión de los mismos en células madre tumorales (Yin *et al.*, 2014). Este dato es totalmente contrario al mostrado por *MAGE-A1* en neuroblastoma, que se asocia a tumores localizados correlacionándose su expresión a un aumento de la supervivencia y la SLE de los pacientes. Este fenómeno nos puede estar indicando que en neuroblastoma existen mecanismos diferentes de la regulación de la expresión de estos genes lo que podría estar relacionado con el propio carácter primitivo del neuroblastoma, a diferencia de los tumores del adulto.

Con el fin de explorar el posible mecanismo de regulación de la expresión del gen *MAGE-A1*, nuestro grupo analizó el patrón de metilación del gen en los tumores primarios disponibles. El gen *MAGE-A1* presenta una isla CpG en su región promotora, estudios previos han demostrado que este gen se encuentra hipermetilado en células normales adultas, reprimiendo de este modo su expresión. Esta regulación epigenética, es la que nos condujo al estudio de metilación para averiguar si pudiera estar relacionada con la expresión de *MAGE-A1* en los tumores de neuroblastoma (De Smet *et al.*, 2004).

Los resultados mostraron una asociación parcial, aunque significativa, entre el patrón de metilación de *MAGE-A1* y su expresión en células tumorales, confirmándose así el silenciamiento génico debido a hipermetilación de la secuencia promotora. Sin embargo, no se encontró asociación significativa entre la metilación del gen y la supervivencia, de forma que la regulación epigenética mediante hipermetilación del gen no resultó útil como factor pronóstico de la enfermedad. A pesar de esta asociación, se observaron casos donde los tumores primarios no presentaban expresión y la región promotora se mostraba desmetilada y el fenómeno contrario en el que observábamos expresión del gen en tumores en los que el promotor estaba hipermetilado (Grau *et al.*, 2009).

Estos casos en los que se observaba hipermetilación y expresión del gen, pueden explicarse por modificaciones estructurales de la cromatina, donde quedaría accesible la región que contiene el gen para los factores de

transcripción, a pesar de estar hipermetilada la secuencia promotora. De hecho, las muestras tumorales en las que se observaba este fenómeno eran de tumores localizados y diseminados casi en la misma proporción, representando una pequeña proporción de los mismos.

Por otra parte, todos los casos con ausencia de expresión génica y secuencia promotora desmetilada correspondían a tumores de neuroblastoma avanzados (estadios 3 y 4), los cuales podían compartir un mecanismo adicional que se relacionara con el silenciamiento de la expresión del gen. Este posible mecanismo, podría relacionarse con la falta de expresión de *MAGE-A1* en tumores primarios avanzados, de forma que el silenciamiento génico anómalo podría jugar un posible papel en la progresión tumoral de la enfermedad. De esta forma, se estaría apoyando al hecho de que la expresión de *MAGE-A1* pueda asociarse a buen pronóstico en tumores de neuroblastoma, ya que en tumores avanzados, el gen *MAGE-A1* sería silenciado por mecanismos alternativos a la metilación inicial de la secuencia reguladora del gen. Estos mecanismos podrían adquirirse durante la progresión tumoral, quizá como una forma alternativa de compensar la hipometilación generalizada del genoma que sufren algunas células neoplásicas. Ello nos sugiere la presencia de mecanismos reguladores de la expresión de *MAGE-A1* diferentes del estado de metilación de su promotor, que nos indica que la capacidad de expresión de un gen no depende exclusivamente de su patrón de metilación.

Los resultados nos permiten concluir que la expresión del gen *MAGE-A1* en tumores primarios de neuroblastoma se asocia de forma significativa a una mayor supervivencia y SLE de los pacientes con neuroblastoma. Los resultados contrarios descritos en otros tipos de tumores, junto con el número reducido de tumores estudiados y el posible potencial como diana de inmunoterapia de los genes *MAGE*, justificaría el estudio de una serie más amplia para poder corroborar dicho comportamiento y dilucidar los posibles mecanismos subyacentes que regulan la expresión de dicho gen en este tumor.

8.- Estudio de EMR en pacientes con enfermedad no metastática.

Alrededor de un 40% de los pacientes con neuroblastoma debutan con lo que se denomina enfermedad localizada. Dentro de este grupo se agrupan los tumores estadio 1, 2 y 3 según la clasificación INSS. La mayoría de los mismos se incluyen en grupos de riesgo bajo e intermedio, siendo sólo un pequeño porcentaje los que, por las características del tumor, se clasifican en el grupo de alto riesgo.

Uno de los factores que compromete el pronóstico de este grupo de pacientes es la amplificación del oncogén *MYCN*, aunque también la delección de 1p y recientemente la de 11q se han documentado como

importantes factores de riesgo biológicos. El estudio multicéntrico europeo (Navarro *et al.*, 2006), junto con otros estudios locales (Christiansen *et al.*, 1995; Ladenstein *et al.*, 2001; Simon *et al.*, 2003; Sano *et al.*, 2006; Spitz *et al.*, 2006) han demostrado que el estadio, junto al estado de *MYCN* son dos de los factores de riesgo independientes más importantes en el caso de los niños con enfermedad localizada. Sin embargo, la amplificación de *MYCN* es un evento relativamente raro, que ocurre únicamente en aproximadamente un 10% de los tumores localizados (Pérez *et al.*, 2000; Maris, 2005) y por lo tanto es insuficiente para identificar a todos los pacientes en los que ocurrirá una recaída.

Los tumores localizados donde no existe amplificación de *MYCN*, se suelen tratar únicamente con cirugía (estadios 1 y 2) o con dosis estándar de quimioterapia seguidas de cirugía (estadio 3) mostrando una buena supervivencia. En estos pacientes, se han observado supervivencias y supervivencias libres de eventos a los 5 años del 99% y 90% respectivamente (Coterill *et al.*, 2000). Si separamos los pacientes por estadios, la supervivencia es del 95% en pacientes estadio 1 y del 86% en pacientes estadio 2 (Rubie *et al.*, 2011). En el caso de los pacientes estadio 3 también se alcanzan excelentes resultados terapéuticos con cirugía y quimioterapia de intensidad moderada con una tasa de curación del 70-90% (Mattay *et al.*, 1998).

Por otra parte, los casos con tumores localizados con amplificación de *MYCN* (estadios 2 y 3) se incluyen en los protocolos de tratamiento de alto riesgo y reciben tratamientos intensivos que incluyen quimioterapia de inducción, cirugía, quimioterapia mieloablativa seguida de trasplante autólogo de médula ósea, radioterapia y terapia de la EMR basada en el ácido retinoico y anticuerpos monoclonales. Pese a la intensidad del tratamiento, un alto porcentaje de pacientes fallece.

Los tumores sólidos frecuentemente difunden células a la circulación sanguínea. En el caso del neuroblastoma, la detección de estas células en MO y SP se ha visto que puede ser un importante factor pronóstico en los tumores metastáticos. En el caso de los tumores localizados, son muy pocos los estudios que se han realizado en este sentido, ya que en principio se trata de tumores en los que los estudios morfológicos rutinarios de MO son negativos.

En principio, en pacientes con enfermedad localizada, no se esperaría encontrar positividad de los marcadores de EMR en los tejidos periféricos (MO y SP) en el momento del diagnóstico. Sin embargo, nuestros resultados muestran que en un 27% de muestras de MO y en un 23% de muestras de SP se detecta la expresión de alguno de los marcadores analizados, lo que sugiere la presencia de células tumorales. Si consideramos los datos obtenidos mediante el estudio inmunocitológico, esta cifra aumenta al 30% en MO y se mantiene en el 23% en SP.

Al analizar los datos separadamente por estadios, observamos que un 23% de los pacientes estadio 1 fueron positivos para cualquiera de los marcadores en MO al diagnóstico, un 15,8% de los estadios 2 y un 33,3% de los estadios 3. En el caso de la SP los porcentajes fueron del 21% en los tumores estadio 1, un 6,3% de los estadio 2 y un 28% de los estadio 3. Los pacientes estadio 3 fueron los que mayor tasa de muestras positivas mostraron seguidos por los estadio 1, la baja tasa de positivos en los casos estadio 2, se podría explicar por el bajo número de muestras analizadas.

Shono y colaboradores describen que en pacientes de bajo riesgo, observaron un 37% de los casos positivos en MO combinando los resultados obtenidos con los marcadores *TH* y *PGP9.5*. Analizando pormenorizadamente los datos de la publicación, el porcentaje en MO fue del 29% para *PGP9.5* y del 14% en el caso de *TH*. En el caso de la SP fue del 14% para *PGP9.5* y para *TH* no se observó ninguna muestra positiva (*Shono et al., 2000*). Cabe destacar, que sólo se estudiaron muestras pertenecientes a 14 pacientes.

De manera similar, Stutterheim y colaboradores estudian un pequeño número de muestras de MO de pacientes con tumores localizados con los marcadores *TH* y *PHOX2B*. Por estadios, observaron 3/6 (50%) muestras de pacientes estadio 1 y 2 al diagnóstico positivas para *TH*, y 4/6 (66%) para *PHOX2B*. En los pacientes estadio 3, el número de pacientes positivos fueron 1/9 (11%) para *TH* y 2/9 (22%) en el caso de *PHOX2B*. Como en el caso anterior, el bajo número de muestras no permite la comparación con nuestros resultados (*Stutterheim et al., 2008*).

Por otra parte, el grupo de Corrias y colaboradores estudian un grupo de pacientes similar al nuestro con enfermedad localizada. Mediante inmunocitología con el anticuerpo GD2, detectaron que un 15% (19/126) de ellos mostraban células tumorales en MO al diagnóstico (*Corrias et al., 2008*).

En cualquier caso, nuestros resultados junto con el resto de estudios publicados, permiten demostrar la existencia de células tumorales en MO y SP en pacientes con enfermedad localizada. En el caso de la MO al diagnóstico, el porcentaje de pacientes en los que se detecta EMR oscila entre el 15% y el 30%. Sin embargo, las diferencias entre los marcadores utilizados y las técnicas para su detección dificultan la comparación de los resultados. Salvando estas dificultades, si consideramos los datos de las series más grandes, incluyendo nuestro estudio, se obtienen resultados similares.

Otro de los objetivos en el estudio de este grupo de pacientes fue el análisis del valor pronóstico de la detección de EMR en MO o SP. Como ya hemos comentado anteriormente, la supervivencia de los mismos es elevada

(sobre todo en los estadios 1 y 2), pero se trataría de discriminar el pequeño subgrupo con un peor pronóstico de la enfermedad.

Las bajas tasas de recaída observadas en nuestra serie se adaptan bien a las esperadas en los pacientes con enfermedad localizada (*De Bernardi et al., 2008*). De acuerdo con nuestros resultados, la detección de la expresión de *MAGE-A1* y *MAGE-A3* en MO y *MAGE-A1* en SP en pacientes con enfermedad localizada al diagnóstico predice una mayor probabilidad de recaída. Al realizar el análisis por estadios, esta tendencia sólo alcanza la significatividad en los pacientes en estadio 3 para la expresión de *MAGE-A3* en MO. Esta situación nos permite apuntar que la detección de la expresión de *MAGE-A1* en MO y SP al diagnóstico en estos pacientes podría ser útil para predecir su evolución. Esta conclusión sería contradictoria con el valor pronóstico observado en tumor para la expresión de *MAGE-A1*, ya que en ese caso, la expresión del miso distinguía a un grupo de tumores con un mejor pronóstico, independiente de otros marcadores genéticos como la amplificación de *MYCN*. Esta situación nos podría hacer pensar, que en el caso del tumor primario, la expresión del antígeno *MAGE-A1* distinguiría a un grupo de pacientes cuyo sistema inmunológico sería capaz de reconocer a las células tumorales circulantes y actuar sobre ellas atacándolas. Por otra parte, en el caso de la recaída, en los casos donde podemos observar expresión del gen en MO y SP, distinguiría a un grupo de pacientes en los que el sistema inmunológico no es capaz de reconocer y atacar a este tipo de células, por lo que sería más probable que pudieran invadir tejidos periféricos como la MO y proliferar en la misma.

En cuanto a los pacientes estadio 1 y 2, como ya hemos explicado en los resultados, no se pudo realizar el estudio de supervivencia o SLE en base a la detección de EMR, ya que ninguno de los pacientes falleció y en las pocas recaídas existentes se censuraban todos los casos en el análisis. Otros grupos, en seguimientos a largo plazo, en este grupo de pacientes (estadio 1 y 2) también han observado altas tasas de supervivencia y con pequeñas proporciones de los mismos en los que se observaron recaídas locales (*Pérez et al., 2000. De Bernardi et al., 2008*).

Varios son los trabajos que han documentado la existencia de células tumorales en MO y SP detectadas mediante inmunocitología y RT-PCR en pacientes con enfermedad localizada de neuroblastoma (*Moss et al, 1991; Cheung et al, 1998; Shono et al., 2000; Corrias et al, 2004; Iffersen et al, 2005; Swerts et al, 2006*). Sin embargo el limitado número de pacientes analizados y el corto seguimiento de la mayoría de los estudios no permiten extraer en ellos conclusiones definitivas sobre el impacto en el pronóstico de dicha detección. En los trabajos donde el número de pacientes fue elevado y se pudo disponer de tiempos de seguimiento largos, se obtuvieron resultados similares. Al igual que en nuestro caso, estos estudios indican que la detección de EMR mediante inmunocitología o con diferentes marcadores

mediante RT-PCR indican un peor pronóstico de los pacientes con tumores localizados (estadios 1, 2 y 3) (Shono et al., 2000; Corrias et al., 2004; Corrias et al., 2008; Corrias et al., 2012). La existencia de enfermedad residual en este grupo de pacientes junto con factores pronósticos biológicos desfavorables, se puede asociar en algunos casos a la recaída metastática tras la cirugía del tumor. Así, la detección de la EMR en MO o SP en el diagnóstico inicial de los pacientes con neuroblastoma, asociado al resto de características biológicas del tumor, podría jugar un papel valioso en la predicción de recaídas de estos pacientes.

Como conclusión, la poca uniformidad de los estudios publicados hace necesario un mayor número de estudios con series largas de pacientes tratados bajo los mismos esquemas de tratamiento, para dilucidar la posible utilidad de la detección de la EMR en pacientes con enfermedad localizada al diagnóstico de la enfermedad. Además, es necesario estandarizar las dianas de detección así como la metodología utilizada para poder comparar los diferentes datos que se obtengan de estos estudios.

Para finalizar, analizamos la presencia de EMR en MO y SP en la recaída de los pacientes con enfermedad localizada. Los resultados mostraron que en un alto porcentaje de muestras de MO (75%) y de SP (33%) se pudieron detectar células tumorales mediante inmunocitología o RT-PCR. Este porcentaje aumenta respecto al observado en el diagnóstico casi en un 50% en las MO y en un 10% en el caso de la SP. Este dato nos indica que en un porcentaje elevado de los casos, las recaídas que se producen en los pacientes con enfermedad localizada son recaídas metastáticas.

Aunque el número de muestras disponibles en cada caso era bajo, se decidió estudiar el posible impacto de la detección de EMR en ambos tipos de muestras en la supervivencia global de los pacientes. Los análisis de supervivencia mostraron que la detección de la expresión de *DCX* tanto en MO como en SP es un factor pronóstico adverso de la enfermedad que predice el fallecimiento de los pacientes. Por otra parte, el dato combinado de *TH* y *DCX* detectado mediante QF-PCR en MO mostró el mismo comportamiento, así como la detección de *TH* mediante Southern blot en SP. El resto de marcadores en los que fue posible el análisis, mostraron la misma tendencia sin alcanzarse la significatividad.

Como ya hemos comentado, el grupo de Messi y colaboradores (Messi et al., 2008), estudiaron la expresión de *DCX* en células en cultivo de la línea celular de NB SK-N-SH. Ellos demostraron que *DCX* se expresa de manera exclusiva en las células que presentan una alta motilidad y poder invasivo. Estos datos sugieren que la detección de *DCX* en células tumorales de pacientes con NB previo a tratamiento o tras diferentes fases del mismo podría tener un valor pronóstico de los tumores con mayor agresividad y también poder predecir la recaída tras el tratamiento. Los datos obtenidos

sugieren que la detección de *DCX* en el momento de la recaída se correlaciona con una menor supervivencia de los pacientes, esto podría estar relacionado con una mayor agresividad de las células tumorales que expresan este gen, por lo que su valoración en MO y SP en la recaída podría indicar un subgrupo de pacientes con peor pronóstico que se podrían beneficiar de terapias más intensivas en el tratamiento de dicha recaída.

Por otra parte, hemos observado que el porcentaje de detección mediante QF-PCR de EMR es de aproximadamente el 50% en MO (tanto para *DCX* como para *TH*) y del 30% en el caso de *DCX* y del 40% en el caso de *TH* en SP. Las altas tasas de detección en SP y el posible valor pronóstico de la misma, sugieren que sería posible hacer un seguimiento de la EMR en SP y así poder predecir la recaída previa a la sospecha de recaída clínica de los mismos. La utilización de SP en vez de MO facilitaría la evaluación de los pacientes con métodos no invasivos, que en estos casos es importante, dada la alta supervivencia y el bajo riesgo de recaídas o éxitus.

El análisis de un mayor número de casos, mediante evaluaciones seriadas del seguimiento, nos permitiría confirmar los hallazgos observados y demostrar el posible valor pronóstico de la detección de *DCX* en SP y MO, delimitando aquellos pacientes con un mayor riesgo de fallecimiento tras la recaída.

9.- Estudio de EMR en pacientes estadio 4S

Los pacientes diagnosticados con neuroblastoma en estadio 4S representan aproximadamente del 7 al 10% de todos los casos de NB (*Schleiermacher et al., 2003*). Según el INSS, el estadio 4S se define como tumor primitivo (estadio 1 o 2) con metástasis restringida a hígado, piel y médula ósea (con una infiltración menor del 10%) en niños menores de 1 año al diagnóstico de la enfermedad. Actualmente, según el INRG, la edad se amplía a 18 meses y ha pasado a llamarse estadio MS. En estos casos la gammagrafía con MIBG debe ser negativa en el hueso y médula ósea. (*Monclair et al., 2009*). Se trata de pacientes con enfermedad metastásica asociada a una buena supervivencia, a pesar de tener una carga tumoral elevada, en la que se produce frecuentemente una regresión espontánea. La supervivencia global de este grupo a los 5 años es del 90%, mientras que en los niños mayores de 18 meses con enfermedad en estadio 4 disminuye al 30-50%.

En nuestro estudio, el pequeño número de muestras estudiadas, sólo nos permitió hacer un análisis descriptivo de los casos. El análisis de supervivencia y supervivencia libre de eventos en SP y MO no fue posible por ausencia de eventos, ya que en algunos casos existía un solo valor para cada estado, y en los casos que sí que existían dos valores por estado, se censuraron todos los casos.

Del total de los 35 pacientes de los que se disponía muestras, sólo en cuatro se produjo una recaída y finalmente el fallecimiento de los mismos. De tres de ellos se disponía de muestras de MO y de dos de ellos de SP que resultaron ser positivas para alguno de los marcadores de EMR. Si observamos los resultados obtenidos con los pacientes que no mostraron ningún tipo de evento, sólo en un 66% de las muestras de MO y en un 37% de las muestras de SP se detectó EMR con alguno de los marcadores analizados.

Pocas son las publicaciones que refieren el estudio de EMR en muestras de MO o SP de pacientes estadio 4S, y en ningún caso, se han realizado estudios de supervivencia de los mismos en función de la presencia de células tumorales detectadas mediante QF-PCR. El grupo de Burchill y el de Stutterheim estudian tres muestras de MO al diagnóstico de estos pacientes. En el primer estudio una de ellas resultó ser positiva para la expresión de *TH*, y en el segundo, las tres fueron positivas para *TH* y *PHOX2B* (Burchill et al., 2001-A; Stutterheim et al., 2008).

Esta circunstancia hace que nuestra serie, aunque pequeña, sea la mayor de las que se disponen datos. Estos indican que los pacientes en los que se detecta EMR al diagnóstico podrían tener un peor pronóstico de la enfermedad. La baja incidencia de este estadio, junto con la alta tasa de supervivencia de los mismos, obligaría en cualquier caso a plantear un estudio más amplio, para poder llegar a confirmar estos resultados.

10.- Estudio de EMR en pacientes del grupo de Alto Riesgo.

A pesar de los numerosos avances en el diagnóstico y tratamiento de los niños con neuroblastoma, el grupo considerado de Alto Riesgo sigue siendo el mayor reto. La incorporación de tres fases distintas en la terapia (tratamiento intensivo de inducción, quimioterapia mieloablativa con posterior trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas y el tratamiento de la EMR) ha mejorado los resultados en este grupo de pacientes. El objetivo de la quimioterapia de inducción es lograr la máxima reducción de la carga tumoral, incluyendo la reducción de las metástasis en médula ósea y hueso, y de esta manera minimizar el riesgo del desarrollo de clones tumorales resistentes a la terapia y por lo tanto la progresión de la enfermedad. Posteriormente, los posibles restos de tumor se tratan con altas dosis de fármacos mieloablativos seguidos por el trasplante autólogo de células madre progenitoras hematopoyéticas. Este proceso ha demostrado que mejora significativamente la SLE. La alta tasa de recaídas, de más de un 40%, incluso después de este tipo de terapias ha llevado al tratamiento post trasplante utilizando agentes diferenciadores y anticuerpos monoclonales anti-GD2 (Parikh et al., 2015).

Aproximadamente, un 80% de estos pacientes presentan metástasis en MO al diagnóstico de la enfermedad, y aunque tras el tratamiento se observe una remisión completa, un alto porcentaje acaban siendo diagnosticados con recaídas metastáticas con la presencia de tumor en MO. Aunque existe consenso en la estratificación del riesgo previa al tratamiento, basado en criterios clínicos y características genómicas del tumor, estos parámetros no son capaces de predecir con precisión el pronóstico de un gran grupo de casos de alto riesgo con enfermedad diseminada (*Viprey et al., 2014*).

Esta situación ha provocado que en los últimos 20 años multitud de grupos de investigación, al igual que el nuestro, hayan dedicado un gran esfuerzo al estudio de la EMR y su posible implicación en el pronóstico de la enfermedad. Durante todo este tiempo, y en especial en los últimos años, se han hecho grandes esfuerzos en la descripción de las dianas óptimas de estudio y la estandarización de la metodología de la detección de las células residuales, pero en estos momentos sigue sin haber un consenso internacional en este punto. Esta falta de estandarización provoca que en los diferentes trabajos observemos conclusiones diferentes y en ocasiones incluso contradictorias. Además, al tratarse de series y metodologías diferentes son incluso imposibles de replicar. Estas peculiaridades hacen que en ocasiones sea difícil la discusión de los datos obtenidos, y por lo tanto el llegar a conclusiones que vayan más allá del propio grupo de pacientes analizados.

10.1.- Estudio de EMR en pacientes de alto riesgo al diagnóstico.

La utilización de métodos muy sensibles para la detección de EMR en niños con neuroblastoma ha demostrado que la existencia de metástasis es frecuente (*Ross, 1998; Burchill and Selby, 1999; Moss, 1999*). Aunque la existencia de células tumorales en MO y SP no es suficiente para el desarrollo de lesiones metastáticas periféricas, la presencia de las mismas sí que es necesaria para la diseminación de la enfermedad. El reto más importante es determinar si la detección de la EMR utilizando métodos altamente sensibles, será capaz de proporcionar una herramienta más útil que los métodos de rutina, para la identificación de un subgrupo de niños con un alto riesgo (*Burchill, 2004*).

Se ha afirmado que la presencia de células tumorales de neuroblastoma detectadas mediante inmunocitología o RT-PCR al diagnóstico de la enfermedad es capaz de identificar a un grupo de pacientes con un pronóstico desfavorable en asociación con el estadio tumoral (*Faulkner et al., 1998; Trager et al., 2008; Viprey et al 2014; Cheung et al., 2015*). Sin embargo, la identificación de micrometástasis en los niños diagnosticados de alto riesgo actualmente es poco útil, y es poco probable que tenga un efecto sobre el desenlace de la enfermedad, puesto que de entrada ya son pacientes considerados de alto riesgo y son tratados acorde al riesgo inicial.

En el presente trabajo, hemos analizado un grupo de pacientes de alto riesgo de los que se disponía de muestras de MO de 104 de ellos y de SP de 88 en el momento del diagnóstico. Se analizaron una serie de marcadores mediante RT-PCR e inmunocitología. Los resultados mostraron que un 80% de las muestras de MO y un 68% de las muestras de sangre periférica fueron positivas para alguno de estos marcadores. Los marcadores que mostraron una mayor tasa de positividad fueron *TH* y *DCX*, estudiados mediante QF-PCR. Los estudios realizados mediante inmunocitología mostraron resultados similares.

Según los datos publicados previamente, la detección de EMR en MO mediante RT-PCR en pacientes estadio 4 al diagnóstico, se sitúa entorno al 95-100% (*Shono et al., 2000; Horibe et al., 2001*), frente al 90% obtenido por citología convencional (*Reid and Pearson, 1991*). En el caso de la inmunocitología, los porcentajes de detección son similares a los obtenidos utilizando la RT-PCR en el momento del diagnóstico. En las muestras de SP, la detección de EMR por RT-PCR es menor que en MO siendo aproximadamente del 50% (*Burchill, 2004*). La ausencia de células tumorales en SP en pacientes de alto riesgo ha sido considerada por algunos autores como falsos negativos, sin embargo, esta situación podría reflejar características biológicas del tumor como la extravasación intermitente de células tumorales, la dilución de las mismas en el torrente sanguíneo, o factores técnicos como el volumen de la muestra analizada.

Si analizamos pormenorizadamente diferentes publicaciones, Seeger y colaboradores, utilizando como técnica la inmunocitología, en pacientes estadio 4 al diagnóstico, detectaron células tumorales en un 80% de las muestras de MO y en un 58% de las muestras de SP (*Seeger et al., 2000*). De la misma manera, Faulkner y colaboradores utilizando la misma técnica y también en pacientes estadio 4 al diagnóstico observaron que un 100% de las muestras de MO y un 79% de las muestras de SP resultaron positivas (*Faulkner et al., 1998*).

En estudios por RT-PCR, Burchill y colaboradores estudian la expresión de *TH* en muestras de SP al diagnóstico en pacientes diagnosticados de neuroblastoma estadio 4 mayores de 1 año. En su serie, observan un 67% de las muestras positivas (*Burchill et al., 2001-B*). Por otra parte, Trager y colaboradores estudian la expresión de *TH*, *DDC* y *GD2-sintasa* en pacientes diagnosticados de neuroblastoma. En los casos de pacientes estadio 4, un 90% de las muestras de MO mostraron expresión de *TH* y un 71% del gen *DDC*. En el caso de la SP los porcentajes fueron del 88% para *TH* y del 55% para *DDC*. De manera similar, Bozzi y colaboradores también estudian *DDC* y *TH* en pacientes diagnosticados de neuroblastoma diseminados. Ellos observan la expresión de *DDC* en un 94% de las muestras de MO al diagnóstico y de *TH* en un 83%. En el caso de las

muestras de sangre periférica, también al diagnóstico de la enfermedad, los porcentajes fueron del 66% en el caso de *DDC* y del 61% en el caso de *TH* (Bozzi *et al.*, 2004; Trager *et al.*, 2008).

Como podemos observar, los datos obtenidos por nuestro grupo son similares a los obtenidos con series equivalentes de pacientes. Las pequeñas diferencias observadas se pueden deber a las diferencias en la selección de pacientes (estadio 4, neuroblastoma metastáticos o pacientes de alto riesgo), además de los diferentes marcadores y técnicas utilizadas. Existe un consenso de que tanto la inmunocitología como la RT-PCR son los métodos más sensibles para la detección de EMR en neuroblastoma. Sin embargo, se sigue discutiendo sobre las dianas óptimas para la detección y el valor pronóstico de cada una de ellas.

La no concordancia entre la detección de EMR en MO y SP indica que la presencia de metástasis en MO no tiene por qué detectarse necesariamente en SP. Esta situación nos demuestra que es necesario determinar la EMR en ambos tejidos con el fin de aclarar su posible valor clínico y así intentar comprender la enfermedad metastática en este tumor.

Para determinar el valor clínico de la detección de micrometástasis al diagnóstico en los pacientes de alto riesgo, se analizó la posible asociación de la detección de los diferentes marcadores utilizados con la supervivencia. Por una parte observamos que la expresión de *MAGE-A3* en SP en el total de casos de alto riesgo se asociaba con una menor supervivencia global de los pacientes. Dicha asociación también parecía observarse en los pacientes estadio 4 sin alcanzarse la significatividad.

Al realizar los análisis por estadios, se evidenció que la detección de células tumorales mediante inmunocitología con Anti-GD2 se asociaba con una menor supervivencia y SLE en pacientes estadio 4. Resultados similares se han descrito por el grupo de Seeger y colaboradores, que concluyen que la cuantificación de células tumorales al diagnóstico, proporciona información para identificar pacientes con muy alto riesgo (Seeger *et al.*, 2000).

En los estudios realizados mediante RT-PCR, Burchill y colaboradores estudian la expresión de *TH* en muestras de SP al diagnóstico en pacientes diagnosticados estadio 4 mayores de 1 año. Los resultados les permiten concluir que la detección de la expresión de *TH* en SP en este grupo de pacientes es un indicador de mal pronóstico, aumentando su riesgo de recaída y muerte (Burchill *et al.*, 2001-B). En estudios más recientes, Viprey y colaboradores y Trager y colaboradores analizan cuantitativamente los niveles de expresión de los genes (Trager *et al.*, 2008; Viprey *et al.*, 2014). El primer grupo estudia el posible factor pronóstico de la expresión *TH*, *DCX* y *PHOX2B* y observan que elevados niveles de expresión los mismos en SP y MO al diagnóstico, han demostrado ser factores de mal pronóstico tanto al

valorar la supervivencia global como la supervivencia libre de enfermedad. También concluyen que la expresión de *TH* y *PHOX2B* al diagnóstico predicen un grupo de ultra alto riesgo. El segundo grupo observa que elevados niveles de expresión de *TH* y *DDC* tanto en SP como en MO al diagnóstico, son capaces de predecir el pronóstico de pacientes de neuroblastoma de alto riesgo.

Como conclusión, podemos afirmar que en general la presencia de marcadores tumorales en MO al diagnóstico no permite predecir las recaídas en los pacientes de alto riesgo. No obstante, la detección de células tumorales mediante inmunocitología con Anti-GD2 parece asociarse con una menor supervivencia y SLE en los pacientes estadio 4. Por otra parte, la expresión de *MAGE-A3* en SP en el total de casos de alto riesgo podría asociarse con una menor supervivencia global de los pacientes. Estos resultados ponen de manifiesto que la utilización de varios marcadores aumenta el poder de predicción.

10.2.- Estudio de EMR en pacientes de alto riesgo tras quimioterapia de inducción.

Actualmente, la detección de micrometástasis en pacientes con neuroblastoma incluidos en el grupo de alto riesgo, tiene un importante impacto como herramienta para monitorizar el curso de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. Los estudios más relevantes orientados a evaluar el poder de la detección de la enfermedad metastásica, se han hecho utilizando la técnica de la RT-PCR sobre muestras de MO y SP (*Miyajima et al., 1996; Burchill et al., 2001-A; Trager et al., 2008; Viprey et al., 2014; Cheung et al., 2015*). La detección de células mediante RT-PCR puede ser una medida muy informativa del estado de la enfermedad, ya que identifica la difusión de células tumorales que tienen potencial de formar metástasis aparentes (*Burchill and Selby, 1999; Burchill and Selby, 2000*).

Aunque la capacidad de detectar de forma precisa micrometástasis no se traduce necesariamente en un mejor resultado para los niños con NB, dicha capacidad sí que podría permitir la evaluación de la respuesta al tratamiento en las diferentes fases del mismo y permitir la intensificación en aquellos en los que se detecta enfermedad residual pudiendo así mejorar el pronóstico de los mismos.

La totalidad de estudios publicados describen que en las muestras estudiadas de MO y SP tras el fin de la quimioterapia de inducción existe una disminución importante tanto del porcentaje de muestras positivas, como del número de células detectadas y del nivel de expresión de los marcadores. Seeger y colaboradores, así como Faulkner y colaboradores evaluaron la presencia de células tumorales utilizando la inmunocitología,

tras quimioterapia de inducción en pacientes estadio 4. En el primer caso detectaron células tumorales en un 27% de las muestras de MO y en un 5% de las muestras de SP (Seeger *et al.*, 2000). En el segundo caso, se detectaron células tumorales en un 57% de las MO y no se observaron muestras positivas de SP (Faulkner *et al.*, 1998). Datos similares se han obtenido en los estudios realizados con RT-PCR. Tchirkov y colaboradores estudian la expresión de *TH* en pacientes diagnosticados de neuroblastoma metastático. Tras quimioterapia de inducción los porcentajes de positivos fueron un 77% de las muestras de MO y un 41% de las muestras de SP (Tchirkov *et al.*, 2003).

Este fenómeno también se observa en la presente serie. En nuestro caso, un 44% de las MO y un 21% de las SP fueron positivas para alguno de los genes analizados. Si nos centramos en los marcadores que mostraron una mayor sensibilidad, se pudo detectar expresión de *DCX* en un 36% de las muestras de MO y en un 8% de las de SP y en el caso de *TH* en un 31% de las de MO y en un 13% de las de SP. Si observamos la Figura 42, se produce un fuerte descenso de casos positivos frente a los datos obtenidos al diagnóstico de la enfermedad. Dicho descenso se produce tanto en MO como en SP, siendo en sangre periférica mucho más acusado. Estos datos nos demuestran la efectividad de la quimioterapia de inducción que consigue disminuir de manera considerable la enfermedad metastática.

Con el fin de valorar si además del porcentaje de muestras positivas también disminuía el nivel de expresión de los marcadores, realizamos un estudio de comparación de medias mediante el estadístico t para muestras relacionadas, que demostró que, incluso en aquellos casos que no se negativizan, existen diferencias significativas entre las medias calculadas para las muestras de SP y MO al diagnóstico y tras la quimioterapia de inducción para *DCX* y *TH* (Tabla 48) y que por tanto existe una disminución importante de la expresión de ambos tras la quimioterapia de inducción. Este mismo fenómeno es observado por el grupo de Viprey y colaboradores para los marcadores *TH*, *DCX* y *PHOX2B* en pacientes de alto riesgo (Viprey *et al.*, 2014). Este dato nos indica que además de la disminución del número de muestras en las que detectamos micrometástasis, si se detectan células tumorales, el número de ellas es presumiblemente mucho menor que al diagnóstico.

Los datos de los que disponemos apoyan la idea de que la detección de EMR mediante QF-PCR permite la evaluación y monitorización del tratamiento en los pacientes con enfermedad diseminada. Sobre este tema, el grupo de Cheung y colaboradores han estudiado pacientes de alto riesgo mediante RT-PCR con los marcadores *B4GALNT1*, *PHOX2B*, *CCND1*, *ISL1*. La valoración de micrometástasis en MO se realiza antes del tratamiento con el anticuerpo 3F8 y dos semanas después de finalizar el mismo. Los resultados obtenidos por ellos, muestran que la detección de la

expresión de los marcadores permite la predicción temprana de la respuesta al tratamiento.

Así, marcadores de la respuesta temprana permiten una rápida valoración de la respuesta al tratamiento. Ello podría permitir la modificación del tratamiento, disminuyendo los efectos adversos producidos por el mismo o iniciar tratamientos adicionales o terapias alternativas.

En este caso también analizamos la posible asociación de la detección de los diferentes marcadores utilizados con la supervivencia. Nuestros resultados muestran que la expresión de *DCX* en MO tras la quimioterapia de inducción predice un peor pronóstico de los pacientes de alto riesgo en cuanto a la supervivencia global. El análisis por estadios también demostró que la expresión de *DCX* en pacientes estadio 4, se correlaciona de forma estadísticamente significativa con una peor supervivencia y SLE. Por otra parte, para el resto de marcadores tanto en SP como en MO no se observó una clara asociación entre la detección de los mismos y el pronóstico de la enfermedad.

Resultados similares han sido descritos previamente tanto para estudios de EMR mediante inmunocitología como por RT-PCR (*Faulkner et al., 1998; Seeger et al., 2000; Viprey et al 2014*). Seeger y colaboradores concluyen que la cuantificación de células tumorales por inmunocitología tras quimioterapia de inducción proporciona información para identificar pacientes con muy alto riesgo. Los pacientes en los que se detectaron más de 100 células tumorales por 10^5 células normales en MO tras quimioterapia de inducción, mostraron un peor pronóstico, que aquellos en los que se detectaron menos de 100 células tumorales. En el caso de la RT-PCR, Viprey y colaboradores observan que elevados niveles de expresión de *TH*, *DCX* y *PHOX2B* en SP y MO al diagnóstico, han demostrado ser factores de mal pronóstico tanto al valorar la supervivencia global de los pacientes como la supervivencia libre de enfermedad. Sin embargo, tras quimioterapia de inducción, la expresión de los diferentes marcadores sólo se correlaciona con un peor pronóstico en el estudio de las muestras de médula ósea.

En nuestra serie, hemos observado que los pacientes de alto riesgo, y el subgrupo de los estadio 4, en los que se observó expresión de *DCX* tras quimioterapia de inducción tienen un peor pronóstico que el grupo de pacientes en los que no se observó expresión de este marcador. La expresión de *DCX* podría estar señalando un subgrupo de casos en los que el clon o clones celulares metastáticos podrían estar formados por células con una alta agresividad, por tener gran motilidad y una elevada capacidad invasiva, lo que explicaría el peor pronóstico observado.

Nuestros resultados, junto con el resto de datos publicados, nos permiten concluir además que la combinación de varios marcadores aumenta el

poder de predicción en los estudios de EMR. También, tanto la inmunocitología como la RT-PCR son los métodos más sensibles para la detección de EMR. Sin embargo, sigue sin estar claro cuáles son las dianas óptimas para la detección y el valor pronóstico de cada una de ellas.

10.3.- Estudio de EMR en pacientes de alto riesgo en la recaída.

A pesar de los recientes avances en el tratamiento de los pacientes con neuroblastoma de alto riesgo, aunque la mayoría muestra una buena respuesta inicial al tratamiento, al menos un 50% de los mismos recaen falleciendo posteriormente (*Eleveld et al., 2015*). Aunque no existen terapias curativas probadas, algunos pacientes logran una supervivencia prolongada incluso después de múltiples recaídas. Según las estadísticas registradas en las bases de datos del INRG, los pacientes pertenecientes a los grupos de riesgo bajo e intermedio que recayeron mostraron una supervivencia global del 65% a los 5 años tras la recaída. Sin embargo, en el caso de los pacientes con enfermedad metastática, la supervivencia global fue sólo el 8% en el mismo periodo de tiempo (*Caron et al., 1996*).

Pensamos que la detección de EMR, al final del tratamiento o en el seguimiento posterior de niños libres de enfermedad puede ser una herramienta potencialmente útil para identificar micrometástasis antes de la recaída clínica, proporcionando una oportunidad para una intervención más temprana mejorando el resultado para algunos de ellos.

En el estudio de las muestras de los pacientes de alto riesgo en recaída, observamos que un alto porcentaje de muestras de MO y SP fueron positivas para los marcadores de EMR. El porcentaje fue del 86% en el caso de la MO y del 71% en el caso de la SP. Al igual que en la mayoría de los análisis del trabajo, los marcadores que mostraron una mayor sensibilidad fueron TH y DCX estudiados por QF-PCR. El porcentaje de muestras positivas fue similar y en muchos casos superior a las observadas al diagnóstico de la enfermedad, especialmente en SP (Figura 46). Tchirkov y colaboradores también observan en su serie valores similares con un 100% de muestras positivas en MO y un 60% de SP (*Tchirkov et al., 2003*). Este dato confirma que la práctica totalidad de las recaídas en los pacientes de alto riesgo son metastáticas con afectación de MO.

Con el fin de valorar el posible valor predictivo de la detección de los marcadores de EMR analizados, se procedió a realizar un análisis de supervivencia global. Los resultados mostraron que la expresión de TH y del conjunto de marcadores en MO, tanto en el grupo de pacientes de alto riesgo como en los pacientes estadio 4, era capaz de predecir el fallecimiento de los pacientes. En el caso de la SP, se observaron resultados similares sin alcanzarse la significatividad.

No obstante, sería muy importante confirmar estos resultados en una serie mayor de muestras, ya que este tipo de estudios podría permitir el diagnóstico de la recaída antes de la recaída clínica. Esta situación proporcionaría una oportunidad para una intervención más temprana mejorando el resultado para algunos pacientes. Además, de confirmarse que dicho factor predictivo también se puede observar en el estudio de las muestras de SP, las cuales, es importante recalcar, presentan un porcentaje de muestras positivas muy similar al observado en MO, permitiría diseñar un algoritmo de seguimiento de la EMR tras del final del tratamiento sin la utilización de técnicas invasivas.

10.4.- Detección de células tumorales en Aféresis.

Como hemos comentado durante el presente trabajo, la enfermedad diseminada es un factor de mal pronóstico en el neuroblastoma (*Moss et al., 1991*). Aproximadamente el 50% de pacientes presentan enfermedad metastática en el momento del diagnóstico, siendo las metástasis en médula ósea y hueso unas de las localizaciones más frecuentes. Aunque la quimioterapia a altas dosis y posterior rescate con células madre hematopoyéticas se utilizan de forma rutinaria en pacientes de alto riesgo, el valor de la purga de células tumorales en las muestras de médula ósea o aféresis antes de la reinfusión sigue siendo un tema controvertido. La importancia de la reinfusión de células tumorales durante el trasplante ha sido un tema ampliamente discutido. Existen estudios que demuestran las propiedades clonogénicas de células tumorales aisladas de la sangre periférica (*Moss et al., 1994*) y la identificación de las células tumorales reinyectadas en el sitio de metástasis (*Brenner et al., 1993; Riill et al., 1994*). Estos estudios sugieren que las células reinfundidas desempeñan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad secundaria y la recaída. El uso de células madre hematopoyéticas rescatadas de sangre periférica (aféresis) para el trasplante tras la quimioterapia de alta dosis en pacientes con neuroblastoma es atractivo por varias razones. El proceso para el rescate celular es menos invasivo que el utilizado para la realización del aspirado de la médula ósea directamente, el tratamiento de la muestra es mucho más rápido y sencillo y finalmente, puede haber una disminución del riesgo de contaminación de la muestra con células tumorales (*Kessinger et al., 1989; Moss et al., 1990-B*). Sin embargo, la frecuencia y la importancia clínica de la contaminación de células tumorales en las aféresis siguen sin estar totalmente claros ya que, los resultados publicados no son totalmente concluyentes y en algunos casos son incluso contradictorios.

En nuestra serie hemos observado que un 17% de los pacientes de los que se pudo disponer de aféresis presentaban positividad para células tumorales que contaminaban la muestra. En conjunto, un 63,4% de

pacientes de esta serie sufrieron una recaída y un 53,6% fallecieron. En aquellos en los que al menos uno de los marcadores de EMR fue positivo en las aféresis, el porcentaje de recaídas fue de aproximadamente un 60% y el de fallecimientos del 62%. Aunque las diferencias entre los dos grupos (vivos vs fallecidos) son pequeñas, se realizó una comparación entre ellos mediante el test exacto de Fisher, no observándose diferencias significativas.

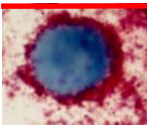
Al hacer una análisis de supervivencia en función de la detección de los diferentes marcadores analizados, pudimos observar que la expresión de *TH* y de *MAGE-A3*, señalaron a un pequeño grupo de pacientes tanto con peor supervivencia global como con peor SLE. No obstante, el pequeño número de muestras analizadas, muy escaso para las muestras positivas, sugiere que éste puede ser simplemente un efecto aleatorio de muestreo, sin base biológica, y sin duda sería necesario ampliar la serie.

Como ya hemos comentado, los resultados obtenidos por otros autores son contradictorios. El grupo de Burchill y el grupo de Corrias no observan diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes en función de la detección de células tumorales en las muestras de aféresis. Sin embargo, los primeros, sí que observan un peor pronóstico de los pacientes en los que se detecta expresión de *TH* en las aféresis sin alcanzarse la significatividad (Burchill *et al.*, 2001-B; Corrias *et al.*, 2006). Chambon y colaboradores en su trabajo del 2013, completan las dos series publicadas por ellos anteriormente, concluyendo que la detección de células tumorales por QF-PCR (*TH*, *DCX* y *PHOX2B*) en muestras de aféresis se correlaciona de forma estadísticamente significativa con una menor supervivencia global de los pacientes (Chambon *et al.*, 2013). Por otra parte, Tchirkov y colaboradores llegan a resultados similares a los del grupo anterior, observando también una menor supervivencia en los pacientes en los que se observaron células tumorales en las muestras de aféresis (Tchirkov *et al.*, 2003).

Es lógico pensar que la detección de células tumorales en las muestras de aféresis para el autotrasplante se asocie con una peor supervivencia, pero no necesariamente de una forma causal. Dicho fenómeno se puede deber por una parte a una mala respuesta del paciente a la quimioterapia previa, y por lo tanto estar en un escenario en el que el paciente sigue teniendo micrometástasis o también a la reinfusión de células tumorales que puedan provocar una recaída. Ambos escenarios se han barajado e investigado en los últimos años. Algunos grupos han comparado la supervivencia frente a la detección de marcadores de EMR, en pacientes en los que se realizó una purga de células tumorales de la aféresis, frente a los pacientes en los que no se realizó el proceso sin encontrar diferencias significativas.

Como en otros muchos puntos del presente trabajo, sería necesario un esfuerzo coordinado de grupos internacionales, para poder establecer conclusiones robustas sobre el posible valor del estudio de micrometástasis o la detección de células tumorales en MO, SP o aféresis en pacientes de neuroblastoma y de su aplicación en la práctica clínica. De los resultados obtenidos, se podrían beneficiar directamente los pacientes, ya que se podrían establecer grupos de mayor riesgo en función los resultados obtenidos al diagnóstico de la enfermedad, monitorizar y cuantificar la respuesta al tratamiento sobre la enfermedad metastática, detectar aféresis contaminadas con células tumorales o predecir una posible recaída antes de la recaída clínica. En todos los casos, se podrían diseñar protocolos alternativos de tratamiento para intentar aumentar la supervivencia en estos casos.

Conclusiones



VII.- Conclusiones

1.- El patrón de expresión específico de *DCX* en neuronas en migración del sistema nervioso central y periférico, junto con su elevada expresión en la práctica totalidad de los tumores estudiados y la ausencia de la misma en muestras de sangre periférica y médula ósea de donantes sanos, nos permiten concluir que se trata de un marcador óptimo para la detección de enfermedad mínima residual en neuroblastoma.

2.- La expresión observada en una proporción importante de muestras de donantes sanos, junto con los resultados obtenidos en las diferentes muestras y grupos de pacientes con neuroblastoma, nos permite afirmar que los genes de la familia *GAGE* no son útiles para la detección de micrometástasis en este tumor.

3.- Es importante utilizar más de un marcador en la detección de células tumorales metastásicas, por la posible heterogeneidad tumoral. En este sentido, tras analizar los resultados de la batería de marcadores evaluados en este trabajo, proponemos la detección de la expresión de *TH* y *DCX* como una combinación adecuada para este tipo de estudios.

4.- Aunque la inmunocitología es la única técnica que nos permite el conteo de células tumorales, los resultados obtenidos en los estudios de validación de la técnica de la PCR cuantitativa en tiempo real, junto con la mayor sensibilidad demostrada frente al resto de técnicas utilizadas y el coste efectividad de la misma, nos permiten proponer a la QF-PCR como técnica óptima para la detección de enfermedad mínima residual en neuroblastoma.

5.- La expresión del gen *MAGE-A1* en tumores primarios de neuroblastoma se asocia de forma significativa a una mayor supervivencia y supervivencia libre de eventos de los pacientes, siendo un predictor independiente de otros, como la amplificación del gen *NMYC*, pero no del estadio tumoral, dada su mayor frecuencia en tumores localizados.

6.- El estudio realizado en pacientes con enfermedad localizada ha permitido demostrar la existencia de células tumorales en médula ósea y en sangre periférica. En estos casos, la detección de enfermedad mínima residual, especialmente la expresión de *MAGE-A1* en pacientes estadio 3, podría tener un valor pronóstico adverso. Sin embargo, es necesario ampliar este tipo de estudios, muy escasos hasta el momento, para poder llegar a una conclusión definitiva.

7.- La detección de la expresión de *DCX* en el momento de la recaída en pacientes con enfermedad localizada se correlaciona con una menor supervivencia de los mismos. Este fenómeno podría estar relacionado con una mayor agresividad de las células tumorales que expresan este gen, por lo que su valoración en muestras de médula ósea y de sangre periférica podría indicar un subgrupo de pacientes con peor pronóstico que se podrían beneficiar de terapias más intensivas en el tratamiento de dicha recaída.

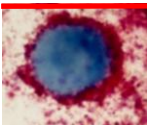
8.- La detección de células tumorales mediante inmunocitología con Anti-GD2 en sangre periférica al diagnóstico de pacientes estadio 4 se asocia con una menor supervivencia y supervivencia libre de eventos.

9.- La expresión de *DCX* en MO tras quimioterapia de inducción en pacientes de alto riesgo se asocia significativamente con una peor supervivencia. En el caso de pacientes estadio 4, dicha asociación se observa tanto en la supervivencia global como en la supervivencia libre de eventos.

10.- La detección de la expresión de *TH* y del conjunto de marcadores en médula ósea en la recaída, tanto en el grupo de alto riesgo como en los pacientes estadio 4, se asocia de forma significativa con el fallecimiento de los pacientes. En sangre periférica se observan resultados similares, sin alcanzarse la significatividad, por lo que sería importante confirmar este resultado para un posible protocolo de seguimiento más exhaustivo de la enfermedad mínima residual tras del final del tratamiento, evitando la utilización de técnicas invasivas.

11.- A pesar del escaso número de muestras analizadas, la detección de células tumorales en muestras de aféresis no parece estar relacionada con una mayor tasa de recaída.

Bibliografía



VIII-Bibliografía

A

Altura RA, Maris JM, Li H, Boyett JM, Brodeur GM, Look AT. Novel regions of chromosomal loss in familial neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. **1997** Jul;19(3):176-84.

American Joint Committee on Cancer. Manual for staging of cancer., pp. 237 (JB Lippincott, Philadelphia, **1983**).

Ara T, DeClerck YA. Mechanisms of invasion and metastasis in human neuroblastoma. *Cancer Metastasis Rev*. **2006** Dec;25(4):645-57. Review.

Attiyeh EF, London WB, Mosse YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, McGrady PW, Seeger RC, Look AT, Shimada H, Brodeur GM, Cohn SL, Matthay KK, Maris JM; Children's Oncology Group. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med*. **2005** Nov 24;353(21):2243-53.

B

Beck D, Maritaz O, Gross N, Favrot M, Vultier N, Bailly C, Villa I, Gentilhomme O, Philip T. Immunocytochemical detection of neuroblastoma cells infiltrating clinical bone marrow samples. *Eur J Pediatr*. **1988** Aug;147(6):609-12.

Beiske K, Ambros PF, Burchill SA, Cheung IY, Swerts K. Detecting minimal residual disease in neuroblastoma patients-the present state of the art. *Cancer Lett*. **2005** Oct 18;228(1-2):229-40. Review.

Beiske K, Burchill SA, Cheung IY, Hiyama E, Seeger RC, Cohn SL, Pearson AD, Matthay KK; International neuroblastoma Risk Group Task Force. Consensus criteria for sensitive detection of minimal neuroblastoma cells in bone marrow, blood and stem cell preparations by immunocytology and QRT-PCR: recommendations by the International Neuroblastoma Risk Group Task Force. *Br J Cancer*. **2009** May 19;100(10):1627-37.

Bell E, Chen L, Liu T, Marshall GM, Lunec J, Tweddle DA. MYCN oncoprotein targets and their therapeutic potential. *Cancer Lett*. **2010** Jul 28;293(2):144-57.

Bernstein ML, Leclerc JM, Bunin G, Brisson L, Robison L, Shuster J, Byrne T, Gregory D, Hill G, Dougherty G, et al. A population-based study of neuroblastoma incidence, survival, and mortality in North America. *J Clin Oncol*. **1992** Feb;10(2):323-9.

Berois N, Blanc E, Ripoche H, Mergui X, Trajtenberg F, Cantais S, Barrois M, Dessen P, Kågedal B, Bénard J, Osinaga E, Raguénez G. ppGalNAc-T13: a new molecular marker of bone marrow involvement in neuroblastoma. *Clin Chem*. **2006** Sep;52(9):1701-12.

Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*. **1973** Nov;33(11):2643-52.

Biegel JA, White PS, Marshall HN, Fujimori M, Zackai EH, Scher CD, Brodeur GM, Emanuel BS. Constitutional 1p36 deletion in a child with neuroblastoma. *Am J Hum Genet*. **1993** Jan;52(1):176-82.

Björklund E, Mazur J, Söderhäll S, Porwit-MacDonald A. Flow cytometric follow-up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. **2003** Jan;17(1):138-48.

Bostrom B, Nesbit ME Jr, Brunning RD. The value of bone marrow trephine biopsy in the diagnosis of metastatic neuroblastoma. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. **1985** Fall;7(3):303-5.

- Bown N**, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, Meddeb M, Danglot G, Brinkschmidt C, Christiansen H, Laureys G, Speleman F, Nicholson J, Bernheim A, Betts DR, Vandesompele J, Van Roy N. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med.* **1999** Jun 24;340(25):1954-61.
- Bown N**. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol.* **2001** Dec;54(12):897-910. Review.
- Bozzi F**, Luksch R, Collini P, Gambirasio F, Barzanò E, Polastri D, Podda M, Brando B, Fossati-Bellani F. Molecular detection of dopamine decarboxylase expression by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction in bone marrow and peripheral blood: utility as a tumor marker for neuroblastoma. *Diagn Mol Pathol.* **2004** Sep;13(3):135-43.
- Brenner MK**, Rill DR, Holladay MS, Heslop HE, Moen RC, Buschle M, Krance RA, Santana VM, Anderson WF, Ihle JN. Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haemopoiesis in cancer patients. *Lancet.* **1993** Nov 6;342(8880):1134-7.
- Brichard VG**, Godechal Q. MAGE-A3-specific anticancer immunotherapy in the clinical practice. *Oncoimmunology.* **2013** Oct 1;2(10)
- Brinkschmidt C**, Christiansen H, Terpe HJ, Simon R, Boecker W, Lampert F, Stoerkel S. Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of neuroblastomas--an important methodological approach in paediatric tumour pathology. *J Pathol.* **1997** Apr;181(4):394-400.
- Brisigotti M**, Medicina D, Bercich L, Bonetti MF, Fabbretti G, Gambini C, Lo Piccolo MS, Milanaccio C, Rosanda C, Garaventa A, De Bernardi B, Callea F. The morphological assessment of bone marrow infiltration in neuroblastoma. *Pediatr Med Chir.* **1998** May-Jun;20(3):169-74.
- Brodeur GM**, Fong CT. Molecular biology and genetics of human neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.* **1989** Sep;41(2):153-74. Review.
- Brodeur GM**, Green AA, Hayes FA, Williams KJ, Williams DL, Tsiatis AA. Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines. *Cancer Res.* **1981** Nov;41(11 Pt 1):4678-86.
- Brodeur GM**, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PS. Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol.* **1997** Mar-Apr;19(2):93-101. Review.
- Brodeur GM**, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol.* **1993** Aug;11(8):1466-77. Review.
- Brodeur GM**, Seeger RC, Barrett A, Berthold F, Castleberry RP, D'Angio G, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Freeman AI, et al. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol.* **1988** Dec;6(12):1874-81.
- Brodeur GM**, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science.* **1984** Jun 8;224(4653):1121-4.
- Brodeur GM**, Sekhon G, Goldstein MN. Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer.* **1977** Nov;40(5):2256-63.
- Brodeur GM**. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer.* **2003** Mar;3(3):203-16.
- Brodeur, G.M.** and Maris, J.M. Neuroblastoma. In: Pizzo, P.A. and Poplack, D.G. eds. Principles and practice of pediatric oncology, 5th edn. Philadelphia: J B Lippincott Company, **2006**: 933-970.

- Bunin GR**, Ward E, Kramer S, Rhee CA, Meadows AT. Neuroblastoma and parental occupation. *Am J Epidemiol*. **1990** May;131(5):776-80.
- Burchill SA**, Bradbury FM, Selby P, Lewis IJ. Early clinical evaluation of neuroblastoma cell detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for tyrosine hydroxylase mRNA. *Eur J Cancer*. **1995** ;31A(4):553-6.
- Burchill SA**, Bradbury FM, Smith B, Lewis IJ, Selby P. Neuroblastoma cell detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for tyrosine hydroxylase mRNA. *Int J Cancer*. **1994** Jun 1;57(5):671-5.
- Burchill SA**, Kinsey SE, Picton S, Roberts P, Pinkerton CR, Selby P, Lewis IJ. Minimal residual disease at the time of peripheral blood stem cell harvest in patients with advanced neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. **2001-B** Jan;36(1):213-9.
- Burchill SA**, Lewis IJ, Abrams KR, Riley R, Imeson J, Pearson AD, Pinkerton R, Selby P. Circulating neuroblastoma cells detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA are an independent poor prognostic indicator in stage 4 neuroblastoma in children over 1 year. *J Clin Oncol*. **2001-A** Mar 15;19(6):1795-801.
- Burchill SA**, Selby P. Early detection of small volume disease using molecular technology. *Cancer Topics* **1999**;10:1-4.
- Burchill SA**, Selby PJ. Molecular detection of low-level disease in patients with cancer. *J Pathol*. **2000** Jan;190(1):6-14. Review.
- Burchill SA**. Micrometastases in neuroblastoma: are they clinically important? *J Clin Pathol*. **2004** Jan;57(1):14-20. Review.

C

- Caron H**, van Sluis P, de Kraker J, Bokkerink J, Egeler M, Laureys G, Slater R, Westerveld A, Voute PA, Versteeg R. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. **1996** Jan 25;334(4):225-30.
- Caron H**, van Sluis P, van Hove M, de Kraker J, Bras J, Slater R, Mannens M, Voute PA, Westerveld A, Versteeg R. Allelic loss of chromosome 1p36 in neuroblastoma is of preferential maternal origin and correlates with N-myc amplification. *Nat Genet*. **1993** Jun;4(2):187-90.
- Caron H**. Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. **1995** Apr;24(4):215-21.
- Castel V**, Badal MD, Bezanilla JL, Llombart A, Ruiz-Jiménez JI, Sánchez de Toledo J, Melero C, Mulet J. Treatment of stage III neuroblastoma with emphasis on intensive induction chemotherapy: a report from the Neuroblastoma Group of the Spanish Society of Pediatric Oncology. *Med Pediatr Oncol*. **1995** Jan;24(1):29-35.
- Castel V**, Cañete A, Navarro S, García-Miguel P, Melero C, Acha T, Navajas A, Badal MD. Outcome of high-risk neuroblastoma using a dose intensity approach: improvement in initial but not in long-term results. *Med Pediatr Oncol*. **2001** Dec;37(6):537-42.
- Castel V**, Cañete A, Noguera R, Navarro S, Oltra S; Grupo Español de Neuroblastoma (SEOP). Neuroblastoma. *Clin Transl Oncol*. **2005** Apr;7(3):133-45. Review.
- Castel V**, García-Miguel P, Cañete A, Melero C, Navajas A, Ruíz-Jiménez JI, Navarro S, Badal MD. Prospective evaluation of the International Neuroblastoma Staging System (INSS) and the International Neuroblastoma Response Criteria (INRC) in a multicentre setting. *Eur J Cancer*. **1999** Apr;35(4):606-11.

- Chambon F**, Tchirkov A, Pereira B, Rochette E, Deméocq F, Kanold J. Molecular assessment of minimal residual disease in PBSC harvests provides prognostic information in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. **2013** Sep;60(9):E109-12.
- Chang HR**, Cordon-Cardo C, Houghton AN, Cheung NK, Brennan MF. Expression of disialogangliosides GD2 and GD3 on human soft tissue sarcomas. *Cancer*. **1992** Aug 1;70(3):633-8.
- Chen RL**, Hong CM, Peters J, Matthay KK, Seeger RC. Frequent expression of MAGE and BAGE genes by neuroblastoma. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res*. **1996** 37: 463-464.
- Chen Y**, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H, Ogawa S. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*. **2008** Oct 16;455(7215):971-4.
- Cheng NC**, Van Roy N, Chan A, Beitsma M, Westerveld A, Speleman F, Versteeg R. Deletion mapping in neuroblastoma cell lines suggests two distinct tumor suppressor genes in the 1p35-36 region, only one of which is associated with N-myc amplification. *Oncogene*. **1995** Jan 19;10(2):291-7.
- Cheresh DA**, Honsik CJ, Staffileno LK, Jung G, Reisfeld RA. Disialoganglioside GD3 on human melanoma serves as a relevant target antigen for monoclonal antibody-mediated tumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1985** Aug;82(15):5155-9.
- Cheung IY**, Barber D, Cheung NK. Detection of microscopic neuroblastoma in marrow by histology, immunocytology, and reverse transcription-PCR of multiple molecular markers. *Clin Cancer Res*. **1998** Nov;4(11):2801-5.
- Cheung IY**, Cheung NK. Detection of microscopic disease: comparing histology, immunocytology, and RT-PCR of tyrosine hydroxylase, GAGE, and MAGE. *Med Pediatr Oncol*. **2001-B** Jan;36(1):210-2.
- Cheung IY**, Cheung NK. Molecular detection of GAGE expression in peripheral blood and bone marrow: utility as a tumor marker for neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. **1997-B** May;3(5):821-6.
- Cheung IY**, Cheung NK. Quantitation of marrow disease in neuroblastoma by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Cancer Res*. **2001-A** Jun;7(6):1698-705.
- Cheung IY**, Chi SN, Cheung NK. Prognostic significance of GAGE detection in bone marrows on survival of patients with metastatic neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. **2000** Dec;35(6):632-4.
- Cheung IY**, Feng Y, Vickers A, Gerald W, Cheung NK. Cyclin D1, a novel molecular marker of minimal residual disease, in metastatic neuroblastoma. *J Mol Diagn*. **2007** Apr;9(2):237-41.
- Cheung IY**, Sahota A, Cheung NK. Measuring circulating neuroblastoma cells by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Cancer*. **2004** Nov 15;101(10):2303-8.
- Cheung IY**, Vickers A, Cheung NK. Sialyltransferase STX (ST8Siall): a novel molecular marker of metastatic neuroblastoma. *Int J Cancer*. **2006** Jul 1;119(1):152-6.
- Cheung NK**, Cheung IY, Kushner BH, Ostrovskaya I, Chamberlain E, Kramer K, Modak S. Murine anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 13-cis-retinoic acid in high-risk patients with stage 4 neuroblastoma in first remission. *J Clin Oncol*. **2012** Sep 10;30(26):3264-70.
- Cheung NK**, Heller G, Kushner BH, Liu C, Cheung IY. Detection of metastatic neuroblastoma in bone marrow: when is routine marrow histology insensitive? *J Clin Oncol*. **1997-A** Aug;15(8):2807-17.

- Cheung NK**, Heller G. Chemotherapy dose intensity correlates strongly with response, median survival, and median progression-free survival in metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol*. **1991** Jun;9(6):1050-8. Review.
- Cheung NK**, Ostrovskaya I, Kuk D, Cheung IY. Bone Marrow Minimal Residual Disease Was an Early Response Marker and a Consistent Independent Predictor of Survival After Anti-GD2 Immunotherapy. *J Clin Oncol*. **2015** Mar 1;33(7):755-63.
- Cheung NK**, Saarinen UM, Neely JE, Landmeier B, Donovan D, Coccia PF. Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res*. **1985** Jun;45(6):2642-9.
- Christiansen H**, Lampert F. Tumour karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma. *Br J Cancer*. **1988** Jan;57(1):121-6.
- Christiansen H**, Sahin K, Berthold F, Hero B, Terpe HJ, Lampert F. Comparison of DNA aneuploidy, chromosome 1 abnormalities, MYCN amplification and CD44 expression as prognostic factors in neuroblastoma. *Eur J Cancer*. **1995**;31A(4):541-4.
- Cohn SL**, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldut A, Hero B, Ichihara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK; INRG Task Force. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. **2009** Jan 10;27(2):289-97.
- Coldman AJ**, Fryer CJ, Elwood JM, Sonley MJ. Neuroblastoma: influence of age at diagnosis, stage, tumor site, and sex on prognosis. *Cancer*. **1980** Oct 15;46(8):1896-1901.
- Combaret V**, Favrot MC, Kremens B, Philip I, Bailly C, Fontaniere B, Gentilhomme O, Chauvin F, Zucker JM, Bernard JL, et al. Immunological detection of neuroblastoma cells in bone marrow harvested for autologous transplantation. *Br J Cancer*. **1989** Jun;59(6):844-7.
- Corrias MV**, Faulkner LB, Pistorio A, Rosanda C, Callea F, Piccolo MS, Scaruffi P, Marchi C, Lacitignola L, Occhino M, Gambini C, Tonini GP, Haupt R, De Bernardi B, Pistoia V, Garaventa A. Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood by different techniques: accuracy and relationship with clinical features of patients. *Clin Cancer Res*. **2004** Dec 1;10(23):7978-85.
- Corrias MV**, Haupt R, Carlini B, Cappelli E, Giardino S, Tripodi G, Tonini GP, Garaventa A, Pistoia V, Pistorio A. Multiple target molecular monitoring of bone marrow and peripheral blood samples from patients with localized neuroblastoma and healthy donors. *Pediatr Blood Cancer*. **2012** Jan;58(1):43-9.
- Corrias MV**, Parodi S, Haupt R, Lacitignola L, Negri F, Sementa AR, Dau D, Scuderi F, Carlini B, Bianchi M, Casale F, Faulkner L, Garaventa A. Detection of GD2-positive cells in bone marrow samples and survival of patients with localized neuroblastoma. *Br J Cancer*. **2008** Jan 29;98(2):263-9.
- Corrias MV**, Scaruffi P, Occhino M, De Bernardi B, Tonini GP, Pistoia V. Expression of MAGE-1, MAGE-3 and MART-1 genes in neuroblastoma. *Int J Cancer*. **1996** Oct 21;69(5):403-7.
- Cotterill SJ**, Pearson AD, Pritchard J, Foot AB, Roald B, Kohler JA, Imeson J. Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: results of The European Neuroblastoma Study Group 'Survey' 1982-1992. *Eur J Cancer*. **2000** May;36(7):901-8.
- Coustan-Smith E**, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, Rubnitz JE, Sandlund JT, Pui CH, Campana D. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. **2002** Jul 1;100(1):52-8.

Crary GS, Singleton TP, Neglia JP, Swanson PE, Strickler JG. Detection of metastatic neuroblastoma in bone marrow biopsy specimens with an antibody to neuron-specific enolase. *Mod Pathol.* **1992** May;5(3):308-11.

D

Daherba P, Ricci A, Russo V, Rigatti D, Mottolese NMR, Bordignon C, Natali PG, Traversari C. Melan-A/Mart-1, tyrosinase, Mage, Bage and Gage genes are homogeneously expressed clusters of multiple simultaneous metastases of human melanoma. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **1998** 39: 369.

Daudi S, Eng KH, Mhawech-Fauceglia P, Morrison C, Miliotto A, Beck A, Matsuzaki J, Tsuji T, Groman A, Gnjatic S, Spagnoli G, Lele S, Odunsi K. Expression and immune responses to MAGE antigens predict survival in epithelial ovarian cancer. *PLoS One.* **2014** Aug 7;9(8):e104099.

Davis S, Rogers MA, Pendergrass TW. The incidence and epidemiologic characteristics of neuroblastoma in the United States. *Am J Epidemiol.* **1987** Dec;126(6):1063-74.

De Backer O, Arden KC, Boretti M, Vantomme V, De Smet C, Czekay S, Viars CS, De Plaen E, Brasseur F, Chomez P, Van den Eynde B, Boon T, van der Bruggen P. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res.* **1999** Jul 1;59(13):3157-65.

De Bernardi B, Mosseri V, Rubie H, Castel V, Foot A, Ladenstein R, Laureys G, Beck-Popovic M, de Lacerda AF, Pearson AD, De Kraker J, Ambros PF, de Rycke Y, Conte M, Bruzzi P, Michon J; SIOP Europe Neuroblastoma Group. Treatment of localised resectable neuroblastoma. Results of the LNESG1 study by the SIOP Europe Neuroblastoma Group. *Br J Cancer.* **2008** Oct 7;99(7):1027-33.

De Plaen E, Brasseur F, Chomez P, Van den Eynde B, Boon T, van der Bruggen P. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res.* **1999** Jul 1;59(13):3157-65.

De Roos AJ, Teschke K, Savitz DA, Poole C, Grufferman S, Pollock BH, Olshan AF. Parental occupational exposures to electromagnetic fields and radiation and the incidence of neuroblastoma in offspring. *Epidemiology.* **2001** Sep;12(5):508-17.

De Smet C, Loriot A, Boon T. Promoter-dependent mechanism leading to selective hypomethylation within the 5' region of gene MAGE-A1 in tumor cells. *Mol Cell Biol.* **2004** Jun;24(11):4781-90.

Deisseroth AB, Zu Z, Claxton D, Hanania EG, Fu S, Ellerson D, Goldberg L, Thomas M, Janicek K, Anderson WF, et al. Genetic marking shows that Ph⁺ cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood.* **1994** May 15;83(10):3068-76.

Deyell RJ, Attiyeh EF. Advances in the understanding of constitutional and somatic genomic alterations in neuroblastoma. *Cancer Genet.* **2011** Mar;204(3):113-21.

Dhillon AP, Rode J, Leatham A. Neurone specific enolase: an aid to the diagnosis of melanoma and neuroblastoma. *Histopathology.* **1982** Jan;6(1):81-92.

DuBois SG, Kalika Y, Lukens JN, Brodeur GM, Seeger RC, Atkinson JB, Haase GM, Black CT, Perez C, Shimada H, Gerbing R, Stram DO, Matthay KK. Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *J Pediatr Hematol Oncol.* **1999** May-Jun;21(3):181-9.

Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Pötschger U, Mühlegger N, Fritsch G, Gadner H; Austrian Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* **2002** Mar 15;99(6):1952-8.

E

Ejeskar K, Aburatani H, Abrahamsson J, Kogner P, Martinsson T. Loss of heterozygosity of 3p markers in neuroblastoma tumours implicate a tumour-suppressor locus distal to the FHIT gene. *Br J Cancer*. **1998** Jun;77(11):1787-91.

Eleveld TF, Oldridge DA, Bernard V, Koster J, Daage LC, Diskin SJ, Schild L, Bentahar NB, Bellini A, Chicard M, Lapouble E, Combaret V, Legoix-Né P, Michon J, Pugh TJ, Hart LS, Rader J, Attiyeh EF, Wei JS, Zhang S, Naranjo A, Gastier-Foster JM, Hogarty MD, Asgharzadeh S, Smith MA, Guidry Auvil JM, Watkins TB, Wijnenburg DA, Ebus ME, van Sluis P, Hakkert A, van Wezel E, van der Schoot CE, Westerhout EM, Schulte JH, Tytgat GA, Dolman ME, Janoueix-Lerosey I, Gerhard DS, Caron HN, Delattre O, Khan J, Versteeg R, Schleiermacher G, Molenaar JJ, Maris JM. Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations. *Nat Genet*. **2015** Aug;47(8):864-71.

Eura M, Ogi K, Chikamatsu K, Lee KD, Nakano K, Masuyama K, Itoh K, Ishikawa T. Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas. *Int J Cancer*. **1995** Oct 20;64(5):304-8.

Evans AE, D'Angio GJ, Randolph J. A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer study group A. *Cancer*. **1971** Feb;27(2):374-8.

Evans AE, Griffin GC, Tartaglione M, Kennett RH. A method of detecting neuroblastoma in human bone marrow by means of two monoclonal antibodies PI 153/3 and KE2. *Hybridoma*. **1985** Winter;4(4):289-96.

F

Faulkner LB, Tintori V, Tamburini A, Paoli A, Garaventa A, Viscardi E, Tucci F, Lippi AA, De Bernardi B, Bernini G. High-sensitivity immunocytologic analysis of neuroblastoma cells in paired blood and marrow samples. *J Hematother*. **1998** Aug;7(4):361-6.

Favrot MC, Frappaz D, Maritaz O, Philip I, Fontaniere B, Gentilhomme O, Bailly C, Zucker JM, Gentet JC, Kemshead J, et al. Histological, cytological and immunological analyses are complementary for the detection of neuroblastoma cells in bone marrow. *Br J Cancer*. **1986** Oct;54(4):637-41.

Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. **2003** Jun;3(6):453-8.

Fong CT, White PS, Peterson K, Sapienza C, Cavenee WK, Kern SE, Vogelstein B, Cantor AB, Look AT, Brodeur GM. Loss of heterozygosity for chromosomes 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastomas. *Cancer Res*. **1992** Apr 1;52(7):1780-5.

Fukuda M, Miyajima Y, Miyashita Y, Horibe K. Disease outcome may be predicted by molecular detection of minimal residual disease in bone marrow in advanced neuroblastoma: a pilot study. *J Pediatr Hematol Oncol*. **2001** Jan;23(1):10-3.

Furukawa K, Soejima H, Niikawa N, Shiku H. Genomic organization and chromosomal assignment of the human beta1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase gene. Identification of multiple transcription units. *J Biol Chem*. **1996** Aug 23;271(34):20836-44.

G

Gao Y, Li G, Zhang X, Xu Q, Zheng B. Detection of neuroblastoma cells in blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Chin Med J (Engl)*. **1997** May;110(5):341-5.

George RE, Kenyon RM, McGuckin AG, Malcolm AJ, Pearson AD, Lunec J. Investigation of co-amplification of the candidate genes ornithine decarboxylase, ribonucleotide reductase, syndecan-1 and a DEAD box gene, DDX1, with N-myc in

neuroblastoma. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Oncogene*. **1996** Apr 4;12(7):1583-7.

George RE, Sanda T, Hanna M, Fröhling S, Luther W 2nd, Zhang J, Ahn Y, Zhou W, London WB, McGrady P, Xue L, Zozulya S, Gregor VE, Webb TR, Gray NS, Gilliland DG, Diller L, Greulich H, Morris SW, Meyerson M, Look AT. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature*. **2008** Oct 16;455(7215):975-8.

Gilbert F, Feder M, Balaban G, Brangman D, Lurie DK, Podolsky R, Rinaldt V, Vinikoor N, Weisband J. Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. *Cancer Res*. **1984** Nov;44(11):5444-9.

Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*. **1999** Jun;23(2):257-71.

Goldman A, Vivian G, Gordon I, Pritchard J, Kemshead J. Immunolocalization of neuroblastoma using radiolabeled monoclonal antibody UJ13A. *J Pediatr*. **1984** Aug;105(2):252-6.

Goodman T, Gurney G, Smith M, Olshan A. Sympathetic nervous system tumor. National Cancer Institute, Pediatric Monograph.

Gould VE, Wiedenmann B, Lee I, Schweddeheimer K, Dockhorn-Dworniczak B, Radosevich JA, Moll R, Franke WW. Synaptophysin expression in neuroendocrine neoplasms as determined by immunocytochemistry. *Am J Pathol*. **1987** Feb;126(2):243-57.

Granchi D, Amato I, Battistelli L, Avnet S, Capaccioli S, Papucci L, Donnini M, Pellacani A, Brandi ML, Giunti A, Baldini N. In vitro blockade of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand prevents osteoclastogenesis induced by neuroblastoma cells. *Int J Cancer*. **2004** Oct 10;111(6):829-38.

Grant SC, Kostakoglu L, Kris MG, Yeh SD, Larson SM, Finn RD, Oettgen HF, Cheung NV. Targeting of small-cell lung cancer using the anti-GD2 ganglioside monoclonal antibody 3F8: a pilot trial. *Eur J Nucl Med*. **1996** Feb;23(2):145-9.

Grau E, Oltra S, Martínez F, Orellana C, Cañete A, Fernández JM, Hernández-Martí M, Castel V. MAGE-A1 expression is associated with good prognosis in neuroblastoma tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*. **2009** Apr;135(4):523-31.

Guerrini R, Moro F, Andermann E, Hughes E, D'Agostino D, Carozzo R, Bernasconi A, Flinter F, Parmeggiani L, Volzone A, Parrini E, Mei D, Jarosz JM, Morris RG, Pratt P, Tortorella G, Dubeau F, Andermann F, Dobyns WB, Das S. Nonsyndromic mental retardation and cryptogenic epilepsy in women with doublecortin gene mutations. *Ann Neurol*. **2003** Jul;54(1):30-7.

Guo C, White PS, Weiss MJ, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, Gerbing R, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Maris JM. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene*. **1999** Sep 2;18(35):4948-57.

Guo L, Sang M, Liu Q, Fan X, Zhang X, Shan B. The expression and clinical significance of melanoma-associated antigen-A1, -A3 and -A11 in glioma. *Oncol Lett*. **2013** Jul;6(1):55-62.

Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2004** Oct;5(10):816-26. Review.

H

Hartmann O, Valteau-Couanet D, Vassal G, Lapierre V, Brugières L, Delgado R, Couanet D, Lumbroso J, Benhamou E. Prognostic factors in metastatic neuroblastoma in patients over 1 year of age treated with high-dose chemotherapy and stem cell transplantation: a multivariate analysis in 218 patients treated in a single institution. *Bone Marrow Transplant*. **1999** Apr;23(8):789-95.

- Hartomo TB**, Kozaki A, Hasegawa D, Van Huyen Pham T, Yamamoto N, Saitoh A, Ishida T, Kawasaki K, Kosaka Y, Ohashi H, Yamamoto T, Morikawa S, Hirase S, Kubokawa I, Mori T, Yanai T, Hayakawa A, Takeshima Y, Iijima K, Matsuo M, Nishio H, Nishimura N. Minimal residual disease monitoring in neuroblastoma patients based on the expression of a set of real-time RT-PCR markers in tumor-initiating cells. *Oncol Rep.* **2013** Apr;29(4):1629-36.
- Hayashi Y**, Inaba T, Hanada R, Yamada M, Nakagome Y, Yamamoto K. Similar chromosomal patterns and lack of N-myc gene amplification in localized and IV-S stage neuroblastomas in infants. *Med Pediatr Oncol.* **1989**;17(2):111-5.
- Hayes FA**, Green A, Hustu HO, Kumar M. Surgicopathologic staging of neuroblastoma: prognostic significance of regional lymph node metastases. *J Pediatr.* **1983** Jan;102(1):59-62.
- Hayes FA**, Smith EI. Neuroblastoma. En: Principles and practice of pediatric oncology. Pizzo PA, Poplack DG, editors. Philadelphia: JBLippincott; **1989**. p.607-22.
- Head DR**, Kennedy PS, Goyette RE. Metastatic neuroblastoma in bone marrow aspirate smears. *Am J Clin Pathol.* **1979** Dec;72(6):1008-11.
- Hecht M**, Schulte JH, Eggert A, Wilting J, Schweigerer L. The neurotrophin receptor TrkB cooperates with c-Met in enhancing neuroblastoma invasiveness. *Carcinogenesis.* **2005** Dec;26(12):2105-15.
- Heiner JP**, Miraldi F, Kallick S, Makley J, Neely J, Smith-Mensah WH, Cheung NK. Localization of GD2-specific monoclonal antibody 3F8 in human osteosarcoma. *Cancer Res.* **1987** Oct 15;47(20):5377-81.
- Helman LJ**, Gazdar AF, Park JG, Cohen PS, Cotelingam JD, Israel MA. Chromogranin A expression in normal and malignant human tissues. *J Clin Invest.* **1988** Aug;82(2):686-90.
- Hiyama E**, Hiyama K, Yamaoka H, Sueda T, Reynolds CP, Yokoyama T. Expression profiling of favorable and unfavorable neuroblastomas. *Pediatr Surg Int.* **2004** Jan;20(1):33-8.
- Hoon DS**, Kuo CT, Wen S, Wang H, Metelitsa L, Reynolds CP, Seeger RC. Ganglioside GM2/GD2 synthetase mRNA is a marker for detection of infrequent neuroblastoma cells in bone marrow. *Am J Pathol.* **2001** Aug;159(2):493-500.
- Horibe K**, Fukuda M, Miyajima Y, Matsumoto K, Kondo M, Inaba J, Miyashita Y. Outcome prediction by molecular detection of minimal residual disease in bone marrow for advanced neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* **2001** Jan;36(1):203-4.
- Huang M**, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2013** Oct 1;3(10):a014415.
- I**
- Iversen MR**, Kågedal B, Christensen LD, Rechnitzer C, Petersen BL, Heilmann C. Comparison of immunocytochemistry, real-time quantitative RT-PCR and flow cytometry for detection of minimal residual disease in neuroblastoma. *Int J Oncol.* **2005** Jul;27(1):121-9.
- Iolascon A**, Giordani L, Moretti A, Tonini GP, Lo Cunsolo C, Mastropietro S, Borriello A, Ragione FD. Structural and functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitor genes (CDKN2A, CDKN2B, and CDKN2C) in neuroblastoma. *Pediatr Res.* **1998** Jan;43(1):139-44.
- Ishida H**, Matsumura T, Salgaller ML, Ohmizono Y, Kadono Y, Sawada T. MAGE-1 and MAGE-3 or -6 expression in neuroblastoma-related pediatric solid tumors. *Int J Cancer.* **1996** Oct 21;69(5):375-80.

J

Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugières L, Ribeiro A, de Pontual L, Combaret V, Raynal V, Puisieux A, Schleiermacher G, Pierron G, Valteau-Couanet D, Frebourg T, Michon J, Lyonnet S, Amiel J, Delattre O. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*. **2008** Oct 16;455(7215):967-70.

Jurk M, Kremmer E, Schwarz U, Förster R, Winnacker EL. MAGE-11 protein is highly conserved in higher organisms and located predominantly in the nucleus. *Int J Cancer*. **1998** Mar 2;75(5):762-6.

K

Kaneko M, Tsuchida Y, Mugishima H, Ohnuma N, Yamamoto K, Kawa K, Iwafuchi M, Sawada T, Suita S. Intensified chemotherapy increases the survival rates in patients with stage 4 neuroblastoma with MYCN amplification. *J Pediatr Hematol Oncol*. **2002** Nov;24(8):613-21.

Kaneko S, Ohira M, Nakamura Y, Isogai E, Nakagawara A, Kaneko M. Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with MYCN-amplified neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. **2007** Mar;133(3):185-92.

Katzenstein HM, Bowman LC, Brodeur GM, Thorner PS, Joshi VV, Smith EI, Look AT, Rowe ST, Nash MB, Holbrook T, Alvarado C, Rao PV, Castleberry RP, Cohn SL. Prognostic significance of age, MYCN oncogene amplification, tumor cell ploidy, and histology in 110 infants with stage D(S) neuroblastoma: the pediatric oncology group experience--a pediatric oncology group study. *J Clin Oncol*. **1998** Jun;16(6):2007-17.

Kemshead JT, Goldman A, Fritschy J, Malpas JS, Pritchard J. Use of panels of monoclonal antibodies in the differential diagnosis of neuroblastoma and lymphoblastic disorders. *Lancet*. **1983** Jan 1;1(8314-5):12-5.

Kennett RH, Gilbert F. Hybrid myelomas producing antibodies against a human neuroblastoma antigen present on fetal brain. *Science*. **1979** Mar 16;203(4385):1120-1

Kessinger A, Armitage JO, Smith DM, Landmark JD, Bierman PJ, Weisenburger DD. High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for patients with lymphoma. *Blood*. **1989** Sep;74(4):1260-5.

Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, Bruns G, Latt SA, Gilbert F, Alt FW. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell*. **1983** Dec;35(2 Pt 1):359-67.

Kohler JA, Imeson J, Ellershaw C, Lie SO. A randomized trial of 13-Cis retinoic acid in children with advanced neuroblastoma after high-dose therapy. *Br J Cancer*. **2000** Nov;83(9):1124-7.

Komada Y, Azuma E, Kamiya H, Sakurai M. Phenotypic profile of human neuroblastoma cell lines: association with morphological characteristics. *Br J Cancer*. **1986** Oct;54(4):711-5.

Komada Y, Zhang XL, Zhou YW, Inaba H, Deguchi T, Azuma E, Sakurai M. Flow cytometric analysis of peripheral blood and bone marrow for tumor cells in patients with neuroblastoma. *Cancer*. **1998** Feb 1;82(3):591-9.

Kondo T, Zhu X, Asa SL, Ezzat S. The cancer/testis antigen melanoma-associated antigen-A3/A6 is a novel target of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb through histone H3 modifications in thyroid cancer. *Clin Cancer Res*. **2007** Aug 15;13(16):4713-20.

Kozlow W, Guise TA. Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. **2005** Apr;10(2):169-80. Review.

Kramer K, Gerald WL, Kushner BH, Larson SM, Hameed M, Cheung NK. Disialoganglioside G(D2) loss following monoclonal antibody therapy is rare in neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* **1998** Sep;4(9):2135-9.

Krasnoselsky AL, Whiteford CC, Wei JS, Bilke S, Westermann F, Chen QR, Khan J. Altered expression of cell cycle genes distinguishes aggressive neuroblastoma. *Oncogene.* **2005** Feb 24;24(9):1533-41.

Kuroda T, Saeki M, Nakano M, Mizutani S. Clinical application of minimal residual neuroblastoma cell detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Pediatr Surg.* **1997** Jan;32(1):69-72.

L

Ladenstein R, Ambros IM, Pötschger U, Amann G, Urban C, Fink FM, Schmitt K, Jones R, Slociak M, Schilling F, Ritter J, Berthold F, Gadner H, Ambros PF. Prognostic significance of DNA di-tetraploidy in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* **2001** Jan;36(1):83-92.

Ladenstein R, Philip T, Lasset C, Hartmann O, Garaventa A, Pinkerton R, Michon J, Pritchard J, Klingebiel T, Kremens B, Pearson A, Coze C, Paolucci P, Frappaz D, Gadner H, Chauvin F. Multivariate analysis of risk factors in stage 4 neuroblastoma patients over the age of one year treated with megatherapy and stem-cell transplantation: a report from the European Bone Marrow Transplantation Solid Tumor Registry. *J Clin Oncol.* **1998** Mar;16(3):953-65.

Ladisch S, Wu ZL, Feig S, Ulsh L, Schwartz E, Floutsis G, Wiley F, Lenarsky C, Seeger R. Shedding of GD2 ganglioside by human neuroblastoma. *Int J Cancer.* **1987** Jan 15;39(1):73-6.

Lastowska M, Cotterill S, Pearson AD, Roberts P, McGuckin A, Lewis I, Bown N. Gain of chromosome arm 17q predicts unfavourable outcome in neuroblastoma patients. U.K. Children's Cancer Study Group and the U.K. Cancer Cytogenetics Group. *Eur J Cancer.* **1997-B** Sep;33(10):1627-33.

Lastowska M, Roberts P, Pearson AD, Lewis I, Wolstenholme J, Bown N. Promiscuous translocations of chromosome arm 17q in human neuroblastomas. *Genes Chromosomes Cancer.* **1997-A** Jul;19(3):143-9.

Li J, Yang Y, Fujie T, Baba K, Ueo H, Mori M, Akiyoshi T. Expression of BAGE, GAGE, and MAGE genes in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res.* **1996** Sep;2(9):1619-25.

Liu W, Cheng S, Asa SL, Ezzat S. The melanoma-associated antigen A3 mediates fibronectin-controlled cancer progression and metastasis. *Cancer Res.* **2008** Oct 1;68(19):8104-12.

Lode HN, Bruchelt G, Seitz G, Gebhardt S, Gekeler V, Niethammer D, Beck J. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of monoamine transporters in neuroblastoma cell lines: correlations to meta-iodobenzylguanidine (MIBG) uptake and tyrosine hydroxylase gene expression. *Eur J Cancer.* **1995** ;31A(4):586-90.

London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, Thorner P, Brodeur G, Maris JM, Reynolds CP, Cohn SL. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* **2005** Sep 20;23(27):6459-65.

Longee DC, Wikstrand CJ, Månsson JE, He X, Fuller GN, Bigner SH, Fredman P, Svennerholm L, Bigner DD. Disialoganglioside GD2 in human neuroectodermal tumor cell lines and gliomas. *Acta Neuropathol.* **1991**;82(1):45-54.

Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA. Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med.* **1984** Jul 26;311(4):231-5.

Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, Smith EI, Brodeur GM. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *Clin Oncol.* **1991** Apr;9(4):581-91.

LoTurco J. Doublecortin and a tale of two serines. *Neuron.* **2004** Jan 22;41(2):175-7.

Luttikhuis ME, Powell JE, Rees SA, Genus T, Chughtai S, Ramani P, Mann JR, McConville CM. Neuroblastomas with chromosome 11q loss and single copy MYCN comprise a biologically distinct group of tumours with adverse prognosis. *Br J Cancer.* **2001** Aug 17;85(4):531-7.

M

Macaluso M, Paggi MG, Giordano A. Genetic and epigenetic alterations as hallmarks of the intricate road to cancer. *Oncogene.* **2003** Sep 29;22(42):6472-8. Review.

Maris JM, Guo C, White PS, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, Gerbing R, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM. Allelic deletion at chromosome bands 11q14-23 is common in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* **2001** Jan;36(1):24-7.

Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet.* **2007** Jun 23;369(9579):2106-20. Review.

Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol.* **1999** Jul;17(7):2264-79. Review.

Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med.* **2010** Jun 10;362(23):2202-11

Maris JM. The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Curr Opin Pediatr.* **2005** Feb;17(1):7-13.

Martinez C, Hofmann TJ, Marino R, Dominici M, Horwitz EM. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood.* **2007** May 15;109(10):4245-8.

Martinsson T, Sjoberg RM, Hedborg F, Kogner P. Deletion of chromosome 1p loci and microsatellite instability in neuroblastomas analyzed with short-tandem repeat polymorphisms. *Cancer Res.* **1995** Dec 1;55(23):5681-6.

Matsumura T, Ishida H, Kadono Y, Ohmizono Y, Hosoi H, Sawada, Salgaller ML. Gene expression of the MAGE-I encoding human melanoma antigen in pediatric tumors. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **1994** 35: 497.

Matthay KK, Perez C, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Atkinson JB, Black CT, Gerbing R, Haase GM, Stram DO, Swift P, Lukens JN. Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol.* **1998** Apr;16(4):1256-64.

Matthay KK, Seeger RC, Reynolds CP, Stram DO, O'Leary MC, Harris RE, Selch M, Atkinson JB, Haase GM, Ramsay NK. Allogeneic versus autologous purged bone marrow transplantation for neuroblastoma: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol.* **1994** Nov;12(11):2382-9.

Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med.* **1999** Oct 14;341(16):1165-73.

McArdle L, McDermott M, Purcell R, Grehan D, O'Meara A, Breatnach F, Catchpole D, Culhane AC, Jeffery I, Gallagher WM, Stallings RL. Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in neuroblastoma displaying loss of chromosome 11q. *Carcinogenesis.* **2004** Sep;25(9):1599-609. Review.

- McConville CM**, Forsyth J. Neuroblastoma - a developmental perspective. *Cancer Lett.* **2003** Jul 18;197(1-2):3-9. Review.
- Meddeb M**, Danglot G, Chudoba I, Venuat AM, Benard J, Avet-Loiseau H, Vasseur B, Le Paslier D, Terrier-Lacombe MJ, Hartmann O, Bernheim A. Additional copies of a 25 Mb chromosomal region originating from 17q23.1-17qter are present in 90% of high-grade neuroblastomas. *Genes Chromosomes Cancer.* **1996** Nov;17(3):156-65.
- Méhes G**, Luegmayer A, Ambros IM, Ladenstein R, Ambros PF. Combined automatic immunological and molecular cytogenetic analysis allows exact identification and quantification of tumor cells in the bone marrow. *Clin Cancer Res.* **2001-B** Jul;7(7):1969-75.
- Méhes G**, Luegmayer A, Hattinger CM, Lörch T, Ambros IM, Gadner H, Ambros PF. Automatic detection and genetic profiling of disseminated neuroblastoma cells. *Med Pediatr Oncol.* **2001-A** Jan;36(1):205-9.
- Mehes G**, Luegmayer A, Kornmuller R, Ambros IM, Ladenstein R, Gadner H, Ambros PF. Detection of disseminated tumor cells in neuroblastoma: 3 log improvement in sensitivity by automatic immunofluorescence plus FISH (AIPF) analysis compared with classical bone marrow cytology. *Am J Pathol.* **2003** Aug;163(2):393-9.
- Messi E**, Florian MC, Caccia C, Zanisi M, Maggi R. Retinoic acid reduces human neuroblastoma cell migration and invasiveness: effects on DCX, LIS1, neurofilaments-68 and vimentin expression. *BMC Cancer.* **2008** Jan 29;8:30.
- Meyer N**, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer.* **2008** Dec;8(12):976-90.
- Mills AE**, Bird AR. Bone marrow changes in neuroblastoma. *Pediatr Pathol.* **1986**;5(2):225-34.
- Minard V**, Hartmann O, Peyroulet MC, Michon J, Coze C, Defachelle AS, Lejars O, Perel Y, Bergeron C, Boutard P, Leverger G, Stephan JL, Thyss A, Chastagner P, Couillaud G, Devalck C, Lutz P, Mechinaud F, Millot F, Plantaz D, Rialland X, Rubie H. Adverse outcome of infants with metastatic neuroblastoma, MYCN amplification and/or bone lesions: results of the French society of pediatric oncology. *Br J Cancer.* **2000** Oct;83(8):973-9.
- Miyajima Y**, Horibe K, Fukuda M, Matsumoto K, Numata S, Mori H, Kato K. Sequential detection of tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with stage IV neuroblastoma by the reverse transcription-polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA. *Cancer.* **1996** Mar 15;77(6):1214-9.
- Miyajima Y**, Kato K, Numata S, Kudo K, Horibe K. Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood at diagnosis by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA. *Cancer.* **1995** Jun 1;75(11):2757-61.
- Modritz D**, Ladenstein R, Ambros I, Luegmayer A, Gadner H, Ambros PF. Tumour cell clearance in the bone marrow-invasive neuroblastoma cells, marrow of stage 4 neuroblastoma—Can it predict outcome?, *Advances in Neuroblastoma Research*, 11th Conference, June 16–19, **2004**, Genova.
- Monclair T**, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, von Schweinitz D, Simon T, Cohn SL, Pearson AD; INRG Task Force. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* **2009** Jan 10;27(2):298-303.
- Monte M**, Simonatto M, Peche LY, Bublik DR, Gobessi S, Pierotti MA, Rodolfo M, Schneider C. MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2006** Jul 25;103(30):11160-5.

Morowitz M, Shusterman S, Mosse Y, Hii G, Winter CL, Khazi D, Wang Q, King R, Maris JM. Detection of single-copy chromosome 17q gain in human neuroblastomas using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Mod Pathol.* **2003** Dec;16(12):1248-56.

Moroz V, Machin D, Faldum A, Hero B, Iehara T, Mosseri V, Ladenstein R, De Bernardi B, Rubie H, Berthold F, Matthay KK, Monclair T, Ambros PF, Pearson AD, Cohn SL, London WB. Changes over three decades in outcome and the prognostic influence of age-at-diagnosis in young patients with neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. *Eur J Cancer.* **2011** Mar;47(4):561-71.

Moss TJ, Cairo M, Santana VM, Weinthal J, Hurvitz C, Bostrom B. Clonogenicity of circulating neuroblastoma cells: implications regarding peripheral blood stem cell transplantation. *Blood.* **1994** May 15;83(10):3085-9.

Moss TJ, Reynolds CP, Sather HN, Romansky SG, Hammond GD, Seeger RC. Prognostic value of immunocytologic detection of bone marrow metastases in neuroblastoma. *N Engl J Med.* **1991** Jan 24;324(4):219-26.

Moss TJ, Sanders DG, Lasky LC, Bostrom B. Contamination of peripheral blood stem cell harvests by circulating neuroblastoma cells. *Blood.* **1990-B** Nov 1;76(9):1879-83.

Moss TJ, Sanders DG. Detection of neuroblastoma cells in blood. *J Clin Oncol.* **1990-A** Apr;8(4):736-40..

Moss TJ. Clinical relevance of minimal residual cancer in patients with solid malignancies. *Cancer Metastasis Rev.* **1999**;18(1):91-100. Review.

Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D, Carlisle AJ, Winter CL, Rappaport E, Maris JM. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet.* **2004** Oct;75(4):727-30.

Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, Laquaglia MJ, Sennett R, Lynch JE, Perri P, Laureys G, Speleman F, Kim C, Hou C, Hakonarson H, Torkamani A, Schork NJ, Brodeur GM, Tonini GP, Rappaport E, Devoto M, Maris JM. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature.* **2008** Oct 16;455(7215):930-5.

N

Nagai J, Ishida Y, Koga N, Tanaka Y, Ohnuma K, Toyoda Y, Katoh A, Hayabuchi Y, Kigasawa H. A new sensitive and specific combination of CD81/CD56/CD45 monoclonal antibodies for detecting circulating neuroblastoma cells in peripheral blood using flow cytometry. *J Pediatr Hematol Oncol.* **2000** Jan-Feb;22(1):20-6.

Nagai J, Kigasawa H, Tomioka K, Koga N, Nishihira H, Nagao T. Immunocytochemical detection of bone marrow-invasive neuroblastoma cells. *Eur J Haematol.* **1994** Aug;53(2):74-7.

Naito H, Kuzumaki N, Uchino J, Kobayashi R, Shikano T, Ishikawa Y, Matsumoto S. Detection of tyrosine hydroxylase mRNA and minimal neuroblastoma cells by the reverse transcription-polymerase chain reaction. *Eur J Cancer.* **1991**;27(6):762-5.

Navalkele P, O'Dorisio MS, O'Dorisio TM, Zamba GK, Lynch CF. Incidence, survival, and prevalence of neuroendocrine tumors versus neuroblastoma in children and young adults: nine standard SEER registries, 1975-2006. *Pediatr Blood Cancer.* **2011** Jan;56(1):50-7.

Navarro S, Amann G, Beiske K, Cullinane CJ, d'Amore ES, Gambini C, Mosseri V, De Bernardi B, Michon J, Peuchmaur M; European Study Group 94.01 Trial and Protocol. Prognostic value of International Neuroblastoma Pathology Classification in localized resectable peripheral neuroblastic tumors: a histopathologic study of

localized neuroblastoma European Study Group 94.01 Trial and Protocol. *J Clin Oncol.* **2006** Feb 1;24(4):695-9.

Nickerson HJ, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Perez C, Atkinson JB, Selch M, Gerbing RB, Stram DO, Lukens J. Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol.* **2000** Feb;18(3):477-86.

Nisen PD, Waber PG, Rich MA, Pierce S, Garvin JR Jr, Gilbert F, Lanzkowsky P. N-myc oncogene RNA expression in neuroblastoma. *Natl Cancer Inst.* **1988** Dec 21;80(20):1633-7.

Nowicki M, Miśkowiak B. Comparison of the cell immunophenotype of metastatic and primary foci in stage IV-S neuroblastoma. *Folia Histochem Cytobiol.* **2002**;40(3):297-303

Nyári TA, Kajtár P, Parker L; Hungarian Paediatric Oncology Group. Neuroblastoma in Hungary. *Eur J Cancer.* **2006** Sep;42(14):2350-4.

O

Ohira M, Morohashi A, Inuzuka H, Shishikura T, Kawamoto T, Kageyama H, Nakamura Y, Isogai E, Takayasu H, Sakiyama S, Suzuki Y, Sugano S, Goto T, Sato S, Nakagawara A. Expression profiling and characterization of 4200 genes cloned from primary neuroblastomas: identification of 305 genes differentially expressed between favorable and unfavorable subsets. *Oncogene.* **2003** Aug 21;22(35):5525-36.

Oppedal BR, Storm-Mathisen I, Kemshead JT, Brandtzaeg P. Bone marrow examination in neuroblastoma patients: a morphologic, immunocytochemical, and immunohistochemical study. *Hum Pathol.* **1989** Aug;20(8):800-5.

Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol.* **1990** Aug;10(8):4007-15.

P

Pagani A, Macri L, Faulkner LB, Tintori V, Paoli A, Garaventa A, Bussolati G. Detection procedures for neuroblastoma cells metastatic to blood and bone marrow: blinded comparison of chromogranin A heminested reverse transcription polymerase chain reaction to tyrosine hydroxylase nested reverse transcription polymerase chain reaction and to anti-GD2 immunocytology. *Diagn Mol Pathol.* **2002** Jun;11(2):98-106.

Parikh NS, Howard SC, Chantada G, Israels T, Khattab M, Alcasabas P, Lam CG, Faulkner L, Park JR, London WB, Matthay KK. SIOP-PODC adapted risk stratification and treatment guidelines: Recommendations for neuroblastoma in low- and middle-income settings. *Pediatr Blood Cancer.* **2015** Mar 21.

Patard JJ, Bresseur F, Gil-Diez S, Radvanyi F, Marchand M, François P, Abi-Aad A, Van Cangh P, Abbou CC, Chopin D, et al. Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *Int J Cancer.* **1995** Feb 20;64(1):60-4.

Patel K, Moore SE, Dickson G, Rossell RJ, Beverley PC, Kemshead JT, Walsh FS. Neural cell adhesion molecule (NCAM) is the antigen recognized by monoclonal antibodies of similar specificity in small-cell lung carcinoma and neuroblastoma. *Int J Cancer.* **1989** Oct 15;44(4):573-8.

Patton T, Olshan AF, Neglia JP, Castleberry RP, Smith J. Parental exposure to medical radiation and neuroblastoma in offspring. *Paediatr Perinat Epidemiol.* **2004** May;18(3):178-85.

Pearson, A.D.J. and Philip, T. Neuroblastoma. Brodeur, G.M., Sawada, T., Tsuchida, Y. and Voute, P.A. (eds), pp. 551-560 (Elsevier Science B.V., Amsterdam, **2000**).

Perez CA, Matthay KK, Atkinson JB, Seeger RC, Shimada H, Haase GM, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN. Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a children's cancer group study. *J Clin Oncol.* **2000** Jan;18(1):18-26.

Peris Bonet R, Felipe García S, Martínez Ruiz N, Pardo Romaguera E, Valero Poveda S. Cáncer infantil en España. Estadísticas 1980-2013. Registro Nacional de Tumores Infantiles (RNTI-SEHOP). Valencia: Universitat de València, **2014**.

Perri P, Longo L, Cusano R, McConville CM, Rees SA, Devoto M, Conte M, Ferrara GB, Seri M, Romeo G, Tonini GP. Weak linkage at 4p16 to predisposition for human neuroblastoma. *Oncogene.* **2002** Nov 28;21(54):8356-60.

Peuchmaur M, d'Amore ES, Joshi VV, Hata J, Roald B, Dehner LP, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK, Shimada H. Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer.* **2003** Nov 15;98(10):2274-81.

Pinkerton CR, Blanc Vincent MP, Bergeron C, Fervers B, Philip T. Induction chemotherapy in metastatic neuroblastoma--does dose influence response? A critical review of published data standards, options and recommendations (SOR) project of the National Federation of French Cancer Centres (FNCLCC). *Eur J Cancer.* **2000** Sep;36(14):1808-15. Review.

Plantaz D, Mohapatra G, Matthay KK, Pellarin M, Seeger RC, Feuerstein BG. Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol.* **1997** Jan;150(1):81-9.

Powis MR, Imeson JD, Holmes SJ. The effect of complete excision on stage III neuroblastoma: a report of the European Neuroblastoma Study Group. *J Pediatr Surg.* **1996** Apr;31(4):516-9.

Pramparo T, Libiger O, Jain S, Li H, Youn YH, Hirotsune S, Schork NJ, Wynshaw-Boris A. Global developmental gene expression and pathway analysis of normal brain development and mouse models of human neuronal migration defects. *PLoS Genet.* **2011** Mar;7(3)

Pritchard J, Cotterill SJ, Germond SM, Imeson J, de Kraker J, Jones DR. High dose melphalan in the treatment of advanced neuroblastoma: results of a randomised trial (ENSG-1) by the European Neuroblastoma Study Group. *Pediatr Blood Cancer.* **2005** Apr;44(4):348-57.

Pritchard-Jones K, Kaatsch P, Steliarova-Foucher E, Stiller CA, Coebergh JW. Cancer in children and adolescents in Europe: developments over 20 years and future challenges. *Eur J Cancer.* **2006** Sep;42(13):2183-90.

Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, Carter SL, Cibulskis K, Hanna M, Kiezun A, Kim J, Lawrence MS, Lichtenstein L, McKenna A, Pedamallu CS, Ramos AH, Shefler E, Sivachenko A, Sougnez C, Stewart C, Ally A, Birol I, Chiu R, Corbett RD, Hirst M, Jackman SD, Kamoh B, Khodabakshi AH, Krzywinski M, Lo A, Moore RA, Mungall KL, Qian J, Tam A, Thiessen N, Zhao Y, Cole KA, Diamond M, Diskin SJ, Mosse YP, Wood AC, Ji L, Spoto R, Badgett T, London WB, Moyer Y, Gastier-Foster JM, Smith MA, Guidry Auvil JM, Gerhard DS, Hogarty MD, Jones SJ, Lander ES, Gabriel SB, Getz G, Seeger RC, Khan J, Marra MA, Meyerson M, Maris JM. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet.* **2013** Mar;45(3):279-84.

Q

Quillien V, Raoul JL, Heresbach D, Collet B, Toujas L, Brasseur F. Expression of MAGE genes in esophageal squamous-cell carcinoma. *Anticancer Res.* **1997** Jan-Feb;17(1A):387-91.

R

- Rakic P.** Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science*. **1974** Feb 1;183(4123):425-7.
- Reid MM**, Hamilton PJ. Histology of neuroblastoma involving bone marrow: the problem of detecting residual tumour after initiation of chemotherapy. *Br J Haematol*. **1988** Aug;69(4):487-90.
- Reid MM**, Pearson AD. Bone-marrow infiltration in neuroblastoma. *Lancet*. **1991** Mar 16;337(8742):681-2.
- Reid MM**, Roald B. Bone marrow trephine biopsy in infants. European Neuroblastoma Study Group. *Arch Dis Child*. **1997** Jul;77(1):60-1.
- Reiter JL**, Brodeur GM. High-resolution mapping of a 130-kb core region of the MYCN amplicon in neuroblastomas. *Genomics*. **1996** Feb 15;32(1):97-103.
- Reynolds CP**, Kane DJ, Einhorn PA, Matthay KK, Crouse VL, Wilbur JR, Shurin SB, Seeger RC. Response of neuroblastoma to retinoic acid in vitro and in vivo. *Prog Clin Biol Res*. **1991**;366:203-11.
- Reynolds**, R.G. Smith, A sensitive immunoassay for human neuroblastoma cells in: M.S. Mitchell, H.F. Oettgen (Eds.), *Hybridomas in cancer diagnosis and treatment* 1982, Raven Press, New York, **1982**, pp. 235–240.
- Rill DR**, Santana VM, Roberts WM, Nilson T, Bowman LC, Krance RA, Heslop HE, Moen RC, Ihle JN, Brenner MK. Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells. *Blood*. **1994** Jul 15;84(2):380-3.
- Rimoldi D**, Salvi S, Reed D, Coulie P, Jongeneel VC, De Plaen E, Brasseur F, Rodriguez AM, Boon T, Cerottini JC. cDNA and protein characterization of human MAGE-10. *Int J Cancer*. **1999** Sep 9;82(6):901-7.
- Rogers DW**, Treleaven JG, Kemshead JT, Pritchard J. Monoclonal antibodies for detecting bone marrow invasion by neuroblastoma. *J Clin Pathol*. **1989** Apr;42(4):422-6.
- Rogner UC**, Wilke K, Steck E, Korn B, Poustka A. The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28. *Genomics*. **1995** Oct 10;29(3):725-31.
- Ross AA.** Minimal residual disease in solid tumor malignancies: a review. *J Hematother*. **1998** Feb;7(1):9-18. Review.
- Rubie H**, De Bernardi B, Gerrard M, Canete A, Ladenstein R, Couturier J, Ambros P, Munzer C, Pearson AD, Garaventa A, Brock P, Castel V, Valteau-Couanet D, Holmes K, Di Cataldo A, Bricard B, Mosseri V, Marquez C, Plantaz D, Boni L, Michon J. Excellent outcome with reduced treatment in infants with nonmetastatic and unresectable neuroblastoma without MYCN amplification: results of the prospective INES 99.1. *J Clin Oncol*. **2011** Feb 1;29(4):449-55.
- Russell HV**, Hicks J, Okcu MF, Nuchtern JG. CXCR4 expression in neuroblastoma primary tumors is associated with clinical presentation of bone and bone marrow metastases. *J Pediatr Surg*. **2004** Oct;39(10):1506-11.
- Russo V**, Traversari C, Verrecchia A, Mottolese M, Natali PG, Bordignon C. Expression of the MAGE gene family in primary and metastatic human breast cancer: implications for tumor antigen-specific immunotherapy. *Int J Cancer*. **1995** Jun 22;64(3):216-21.

S

- Saarinen UM**, Sariola H, Hovi L. Recurrent disseminated retinoblastoma treated by high-dose chemotherapy, total body irradiation, and autologous bone marrow rescue. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. **1991** Fall;13(3):315-9.

- Sano H**, Bonadio J, Gerbing RB, London WB, Matthay KK, Lukens JN, Shimada H. International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age. *Eur J Cancer*. **2006** May;42(8):1113-9.
- Sariola H**, Terävä H, Rapola J, Saarinen UM. Cell-surface ganglioside GD2 in the immunohistochemical detection and differential diagnosis of neuroblastoma. *Am J Clin Pathol*. **1991** Aug;96(2):248-52.
- Savelyeva L**, Corvi R, Schwab M. Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells. *Am J Hum Genet*. **1994** Aug;55(2):334-40.
- Scarcella DL**, Chow CW, Gonzales MF, Economou C, Brasseur F, Ashley DM. Expression of MAGE and GAGE in high-grade brain tumors: a potential target for specific immunotherapy and diagnostic markers. *Clin Cancer Res*. **1999** Feb;5(2):335-41.
- Schleiermacher G**, Michon J, Ribeiro A, Pierron G, Mosseri V, Rubie H, Munzer C, Bénard J, Auger N, Combaret V, Janoueix-Lerosey I, Pearson A, Tweddle DA, Bown N, Gerrard M, Wheeler K, Noguera R, Villamon E, Cañete A, Castel V, Marques B, de Lacerda A, Tonini GP, Mazzocco K, Defferrari R, de Bernardi B, di Cataldo A, van Roy N, Brichard B, Ladenstein R, Ambros I, Ambros P, Beiske K, Delattre O, Couturier J. Segmental chromosomal alterations lead to a higher risk of relapse in infants with MYCN-non-amplified localised unresectable/disseminated neuroblastoma (a SIOOPEN collaborative study). *Br J Cancer*. **2011** Dec 6;105(12):1940-8.
- Schleiermacher G**, Peter M, Michon J, Hugot JP, Vielh P, Zucker JM, Magdelenat H, Thomas G, Delattre O. Two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. **1994** Aug;10(4):275-81.
- Schleiermacher G**, Rubie H, Hartmann O, Bergeron C, Chastagner P, Mechinaud F, Michon J; Neuroblastoma Study Group of the French Society of Paediatric Oncology. Treatment of stage 4s neuroblastoma--report of 10 years' experience of the French Society of Paediatric Oncology (SFOP). *Br J Cancer*. **2003** Aug 4;89(3):470-6.
- Schmidt ML**, Lukens JN, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Gerbing RB, Stram DO, Perez C, Haase GM, Matthay KK. Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma: A prospective Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol*. **2000** Mar;18(6):1260-8.
- Schultz-Thater E**, Juretic A, Dellabona P, Lüscher U, Siegrist W, Harder F, Heberer M, Zuber M, Spagnoli GC. MAGE-1 gene product is a cytoplasmic protein. *Int J Cancer*. **1994** Nov 1;59(3):435-9.
- Schulz G**, Cheresch DA, Varki NM, Yu A, Staffileno LK, Reissfeld RA. Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients. *Cancer Res*. **1984** Dec;44(12 Pt 1):5914-20.
- Schwab M**, Alitalo K, Varmus HE, Bishop JM, George D. A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed, and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumour cells. *Nature*. **1983** Jun 9-15;303(5917):497-501.
- Seeger RC**, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med*. **1985** Oct 31;313(18):1111-6.
- Seeger RC**, Reynolds CP, Gallego R, Stram DO, Gerbing RB, Matthay KK. Quantitative tumor cell content of bone marrow and blood as a predictor of outcome in stage IV neuroblastoma: a Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol*. **2000** Dec 15;18(24):4067-76.

- Seeger RC**, Wada R, Brodeur GM, Moss TJ, Bjork RL, Sousa L, Slamon DJ. Expression of N-myc by neuroblastomas with one or multiple copies of the oncogene. *Prog Clin Biol Res.* **1988**;271:41-9.
- Shimada H**, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer.* **1999** Jul 15;86(2):364-72.
- Shimada H**, Chatten J, Newton WA Jr, Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, Marsden HB, Misugi K. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst.* **1984** Aug;73(2):405-16.
- Shimada H**, Umehara S, Monobe Y, Hachitanda Y, Nakagawa A, Goto S, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer.* **2001** Nov 1;92(9):2451-61.
- Shinoura N**, Dohi T, Kondo T, Yoshioka M, Takakura K, Oshima M. Ganglioside composition and its relation to clinical data in brain tumors. *Neurosurgery.* **1992** Sep;31(3):541-9.
- Shochat SJ**, Abt AB, Schengrund CL. VCN-releasable sialic acid and gangliosides in human neuroblastomas. *J Pediatr Surg.* **1977** Jun;12(3):413-8.
- Shojaei-Brosseau T**, Chompret A, Abel A, de Vathaire F, Raquin MA, Brugières L, Feunteun J, Hartmann O, Bonaïti-Pellié C. Genetic epidemiology of neuroblastoma: a study of 426 cases at the Institut Gustave-Roussy in France. *Pediatr Blood Cancer.* **2004** Jan;42(1):99-105.
- Shono K**, Tajiri T, Fujii Y, Suita S. Clinical implications of minimal disease in the bone marrow and peripheral blood in neuroblastoma. *J Pediatr Surg.* **2000** Oct;35(10):1415-20.
- Sievers EL**, Radich JP. Detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Curr Opin Hematol.* **2000** Jul;7(4):212-6. Review.
- Simon T**, Hero B, Hunneman DH, Berthold F. Tumour markers are poor predictors for relapse or progression in neuroblastoma. *Eur J Cancer.* **2003** Sep;39(13):1899-903.
- Slavc I**, Ellenbogen R, Jung WH, Vawter GF, Kretschmar C, Grier H, Korf BR. myc gene amplification and expression in primary human neuroblastoma. *Cancer Res.* **1990** Mar 1;50(5):1459-63.
- Söling A**, Schurr P, Berthold F. Expression and clinical relevance of NY-ESO-1, MAGE-1 and MAGE-3 in neuroblastoma. *Anticancer Res.* **1999** May-Jun;19(3B):2205-9.
- Spitz R**, Betts DR, Simon T, Boensch M, Oestreich J, Niggli FK, Ernestus K, Berthold F, Hero B. Favorable outcome of triploid neuroblastomas: a contribution to the special oncogenesis of neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.* **2006** May;167(1):51-6.
- Spitz R**, Hero B, Ernestus K, Berthold F. Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* **2003** Jan;9(1):52-8.
- Srivatsan ES**, Ying KL, Seeger RC. Deletion of chromosome 11 and of 14q sequences in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer.* **1993** May;7(1):32-7.
- Stiller CA**, Parkin DM. International variations in the incidence of neuroblastoma. *Int J Cancer.* **1992** Oct 21;52(4):538-43.
- Stram DO**, Matthay KK, O'Leary M, Reynolds CP, Haase GM, Atkinson JB, Brodeur GM, Seeger RC. Consolidation chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation versus continued chemotherapy for metastatic neuroblastoma: a

report of two concurrent Children's Cancer Group studies. *J Clin Oncol.* **1996** Sep;14(9):2417-26.

Stutterheim J, Gerritsen A, Zappeij-Kannegieter L, Kleijn I, Dee R, Hooft L, van Noesel MM, Bierings M, Berthold F, Versteeg R, Caron HN, van der Schoot CE, Tytgat GA. PHOX2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma. *J Clin Oncol.* **2008** Nov 20;26(33):5443-9.

Stutterheim J, Gerritsen A, Zappeij-Kannegieter L, Yalcin B, Dee R, van Noesel MM, Berthold F, Versteeg R, Caron HN, van der Schoot CE, Tytgat GA. Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: the superiority of a panel of real-time quantitative PCR markers. *Clin Chem.* **2009** Jul;55(7):1316-26.

Sugimoto T, Sawada T, Matsumura T, Kemshead JT, Horii Y, Saida T, Imashuku S, Takeuchi Y. Diagnosis of neuroblastoma metastasis in bone marrow with a panel of monoclonal antibodies. *Med Pediatr Oncol.* **1988**;16(3):190-6.

Suzuki M, Cheung NK. Disialoganglioside GD2 as a therapeutic target for human diseases. *Expert Opin Ther Targets.* **2015** Mar;19(3):349-62.

Suzuki T, Yokota J, Mugishima H, Okabe I, Ookuni M, Sugimura T, Terada M. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14q in neuroblastoma. *Cancer Res.* **1989** Mar 1;49(5):1095-8.

Swerts K, Ambros PF, Brouzes C, Navarro JM, Gross N, Rampling D, Schumacher-Kuckelkorn R, Sementa AR, Ladenstein R, Beiske K. Standardization of the immunocytochemical detection of neuroblastoma cells in bone marrow. *J Histochem Cytochem.* **2005** Dec;53(12):1433-40.

Swerts K, De Moerloose B, Dhooge C, Brichard B, Benoit Y, Laureys G, Philippé J. Detection of residual neuroblastoma cells in bone marrow: comparison of flow cytometry with immunocytochemistry. *Cytometry B Clin Cytom.* **2004** Sep;61(1):9-19.

Swerts K, De Moerloose B, Dhooge C, Vandesomepele J, Hoyoux C, Beiske K, Benoit Y, Laureys G, Philippé J. Potential application of ELAVL4 real-time quantitative reverse transcription-PCR for detection of disseminated neuroblastoma cells. *Clin Chem.* **2006** Mar;52(3):438-45.

T

Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res.* **2002** Mar 15;62(6):1832-7.

Takayama H, Suzuki T, Mugishima H, Fujisawa T, Ookuni M, Schwab M, Gehring M, Nakamura Y, Sugimura T, Terada M, et al. Deletion mapping of chromosomes 14q and 1p in human neuroblastoma. *Oncogene.* **1992** Jun;7(6):1185-9.

Takeda O, Homma C, Maseki N, Sakurai M, Kanda N, Schwab M, Nakamura Y, Kaneko Y. There may be two tumor suppressor genes on chromosome arm 1p closely associated with biologically distinct subtypes of neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer.* **1994** May;10(1):30-9.

Takita J, Hayashi Y, Kohno T, Shiseki M, Yamaguchi N, Hanada R, Yamamoto K, Yokota J. Allelotype of neuroblastoma. *Oncogene.* **1995** Nov 2;11(9):1829-34.

Takita J, Hayashi Y, Kohno T, Yamaguchi N, Hanada R, Yamamoto K, Yokota J. Deletion map of chromosome 9 and p16 (CDKN2A) gene alterations in neuroblastoma. *Cancer Res.* **1997** Mar 1;57(5):907-12.

Takita J, Ishii M, Tsutsumi S, Tanaka Y, Kato K, Toyoda Y, Hanada R, Yamamoto K, Hayashi Y, Aburatani H. Gene expression profiling and identification of novel prognostic marker genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer.* **2004** Jun;40(2):120-32.

- Tanaka T**, Serneo FF, Higgins C, Gambello MJ, Wynshaw-Boris A, Gleeson JG. Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J Cell Biol.* **2004** Jun 7;165(5):709-21.
- Tchirkov A**, Paillard C, Halle P, Bernard F, Bordigoni P, Vago P, Deméocq F, Kanold J. Significance of molecular quantification of minimal residual disease in metastatic neuroblastoma. *J Hematother Stem Cell Res.* **2003** Aug;12(4):435-42.
- Teitz T**, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med.* **2000** May;6(5):529-35.
- Theissen J**, Oberthuer A, Hombach A, Volland R, Hertwig F, Fischer M, Spitz R, Zapatka M, Brors B, Ortmann M, Simon T, Hero B, Berthold F. Chromosome 17/17q gain and unaltered profiles in high resolution array-CGH are prognostically informative in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer.* **2014** Aug;53(8):639-49.
- Thompson PM**, Seifried BA, Kyemba SK, Jensen SJ, Guo C, Maris JM, Brodeur GM, Stram DO, Seeger RC, Gerbing R, Matthay KK, Matise TC, White PS. Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* **2001** Jan;36(1):28-31.
- Träger C**, Kogner P, Lindskog M, Ponthan F, Kullman A, Kågedal B. Quantitative analysis of tyrosine hydroxylase mRNA for sensitive detection of neuroblastoma cells in blood and bone marrow. *Clin Chem.* **2003** Jan;49(1):104-12.
- Träger C**, Vernby A, Kullman A, Ora I, Kogner P, Kågedal B. mRNAs of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase but not of GD2 synthase are specific for neuroblastoma minimal disease and predicts outcome for children with high-risk disease when measured at diagnosis. *Int J Cancer.* **2008** Dec 15;123(12):2849-55.
- Trochet D**, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, Deville A, de Pontual L, Schleiermacher G, Coze C, Philip N, Frébourg T, Munnich A, yonnet S, Delattre O, Amiel J. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet.* **2004** Apr;74(4):761-4.
- Tsang KS**, Li CK, Tsoi WC, Leung Y, Shing MM, Chik KW, Lee V, Ng MH, Yuen PM. Detection of micrometastasis of neuroblastoma to bone marrow and tumor dissemination to hematopoietic autografts using flow cytometry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer.* **2003** Jun 1;97(11):2887-97.

V

- Van den Eynde B**, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med.* **1995** Sep 1;182(3):689-98.
- van der Bruggen P**, Bastin J, Gajewski T, Coulie PG, Boël P, De Smet C, Traversari C, Townsend A, Boon T. A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3. *Eur J Immunol.* **1994** Dec;24(12):3038-43.
- Van Roy N**, Laureys G, Cheng NC, Willem P, Opdenakker G, Versteeg R, Speleman F. 1;17 translocations and other chromosome 17 rearrangements in human primary neuroblastoma tumors and cell lines. *Genes Chromosomes Cancer.* **1994** Jun;10(2):103-14.
- Vandesompele J**, Baudis M, De Preter K, Van Roy N, Ambros P, Bown N, Brinkschmidt C, Christiansen H, Combaret V, Lastowska M, Nicholson J, O'Meara A, Plantaz D, Stallings R, Brichard B, Van den Broecke C, De Bie S, De Paepe A, Laureys G, Speleman F. Unequivocal delineation of clinicogenetic subgroups and development of a new model for improved outcome prediction in neuroblastoma. *J Clin Oncol.* **2005** Apr 1;23(10):2280-99.

Viprey VF, Corrias MV, Kagedal B, Oltra S, Swerts K, Vicha A, Ladenstein R, Burchill SA. Standardisation of operating procedures for the detection of minimal disease by QRT-PCR in children with neuroblastoma: quality assurance on behalf of SIOPEN-R-NET. *Eur J Cancer*. **2007** Jan;43(2):341-50.

Viprey VF, Gregory WM, Corrias MV, Tchirkov A, Swerts K, Vicha A, Dallorso S, Brock P, Luksch R, Valteau-Couanet D, Papadakis V, Laureys G, Pearson AD, Ladenstein R, Burchill SA. Neuroblastoma mRNAs predict outcome in children with stage 4 neuroblastoma: a European HR-NBL1/SIOPEN study. *J Clin Oncol*. **2014** Apr 1;32(10):1074-83.

W

Wang Y, Einhorn P, Triche TJ, Seeger RC, Reynolds CP. Expression of protein gene product 9.5 and tyrosine hydroxylase in childhood small round cell tumors. *Clin Cancer Res*. **2000** Feb;6(2):551-8.

Warzynski MJ, Graham DM, Axtell RA, Higgins JV, Hammers YA. Flow cytometric immunophenotyping test for staging/monitoring neuroblastoma patients. *Cytometry*. **2002** Dec 15;50(6):298-304.

Wei JS, Greer BT, Westermann F, Steinberg SM, Son CG, Chen QR, Whiteford CC, Bilke S, Krasnoselsky AL, Cenacchi N, Catchpoole D, Berthold F, Schwab M, Khan J. Prediction of clinical outcome using gene expression profiling and artificial neural networks for patients with neuroblastoma. *Cancer Res*. **2004** Oct 1;64(19):6883-91.

West DC, Shamberger RC, Macklis RM, Kozakewich HP, Wayne AS, Kreissman SG, Korf BR, Lavally B, Grier HE. Stage III neuroblastoma over 1 year of age at diagnosis: improved survival with intensive multimodality therapy including multiple alkylating agents. *J Clin Oncol*. **1993** Jan;11(1):84-90.

Westermann F, Schwab M. Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Lett*. **2002** Oct 28;184(2):127-47. Review.

Weynants P, Lethé B, Brasseur F, Marchand M, Boon T. Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas. *Int J Cancer*. **1994** Mar 15;56(6):826-9.

White PS, Maris JM, Beltinger C, Sulman E, Marshall HN, Fujimori M, Kaufman BA, Biegel JA, Allen C, Hilliard C, et al. A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1995** Jun 6;92(12):5520-4.

White PS, Maris JM, Sulman EP, Jensen SJ, Kyemba SM, Beltinger CP, Allen C, Kramer DL, Biegel JA, Brodeur GM. Molecular analysis of the region of distal 1p commonly deleted in neuroblastoma. *Eur J Cancer*. **1997** Oct;33(12):1957-61.

White PS, Thompson PM, Seifried BA, Sulman EP, Jensen SJ, Guo C, Maris JM, Hogarty MD, Allen C, Biegel JA, Matise TC, Gregory SG, Reynolds CP, Brodeur GM. Detailed molecular analysis of 1p36 in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. **2001** Jan;36(1):37-41.

Wimmer K, Zhu XX, Lamb BJ, Kuick R, Ambros PF, Kovar H, Thoraval D, Motyka S, Alberts JR, Hanash SM. Co-amplification of a novel gene, NAG, with the N-myc gene in neuroblastoma. *Oncogene*. **1999** Jan 7;18(1):233-8.

Wölfel M, Jungbluth AA, Garrido F, Cabrera T, Meyen-Southard S, Spitz R, Ernestus K, Berthold F. Expression of MHC class I, MHC class II, and cancer germline antigens in neuroblastoma. *Cancer Immunol Immunother*. **2005** Apr;54(4):400-6.

Wu ZL, Schwartz E, Seeger R, Ladisch S. Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas. *Cancer Res*. **1986** Jan;46(1):440-3.

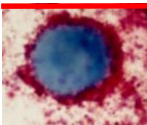
Y

Yamashita N, Ishibashi H, Hayashida K, Kudo J, Takenaka K, Itoh K, Niho Y. High frequency of the MAGE-1 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. **1996** Dec;24(6):1437-40.

Yin B, Zeng Y, Liu G, Wang X, Wang P, Song Y. MAGE-A3 is highly expressed in a cancer stem cell-like side population of bladder cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol*. **2014** May 15;7(6):2934-41.

Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Anderson B, Villablanca JG, Matthay KK, Shimada H, Grupp SA, Seeger R, Reynolds CP, Buxton A, Reisfeld RA, Gillies SD, Cohn SL, Maris JM, Sondel PM; Children's Oncology Group. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med*. **2010** Sep 30;363(14):1324-34.

Anexos



IX.- Anexos.**Anexo I: Publicaciones.****1.- Publicaciones relacionadas con la tesis doctoral.**

- **Oltra S**, Martínez F, Orellana C, Grau E, Fernández JM, Cañete A, Castel V. Minimal residual disease in neuroblastoma: to GAGE or not to GAGE. *Oncol Res.* 2004;14(6):291-5.
- **Oltra S**, Martínez F, Orellana C, Grau E, Fernández JM, Cañete A, Castel V. The doublecortin gene, a new molecular marker to detect minimal residual disease in neuroblastoma. *Diagn Mol Pathol.* 2005 Mar;14(1):53-7.
- Castel V, Cañete A, Noguera R, Navarro S, **Oltra S**; Grupo Español de Neuroblastoma (SEOP). [Neuroblastoma]. *Clin Transl Oncol.* 2005 Apr;7(3):133-45. Review.
- Viprey VF, Corrias MV, Kagedal B, **Oltra S**, Swerts K, Vicha A, Ladenstein R, Burchill SA. Standardisation of operating procedures for the detection of minimal disease by QRT-PCR in children with neuroblastoma: quality assurance on behalf of SIOPEN-R-NET. *Eur J Cancer.* 2007 Jan;43(2):341-50.
- **Oltra S**, Grau E, Martínez F, Orellana C, Cañete A, Fernández JM, Hernández-Martí M, Castel V. MAGE-A1 expression is associated with good prognosis in neuroblastoma tumors. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009 Apr;135(4):523-31.
- Yáñez Y, Grau E, **Oltra S**, Cañete A, Martínez F, Orellana C, Noguera R, Palanca S, Castel V. Minimal disease detection in peripheral blood and bone marrow from patients with non-metastatic neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011 Aug;137(8):1263-72.
- Yáñez Y, Hervas D, Grau E, **Oltra S**, Perez G, Palanca S, Bermudez M, Marquez C, Cañete A, Castel V. TH and DCX mRNAs in peripheral blood and bone marrow predict outcome in metastatic neuroblastoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015 Oct 24.

2.- Publicaciones relacionadas con el tema de la tesis doctoral.

- Grau E, **Oltra S**, Orellana C, Hernández-Martí M, Castel V, Martínez F. There is no evidence that the SDHB gene is involved in neuroblastoma development. *Oncol Res.* 2005;15(7-8):393-8.
- Balaguer J, Cañete A, Costa E, **Oltra S**, Hernández M, Castel V. Tumour Banks in pediatric oncology. *Clin Transl Oncol.* 2006 Dec;8(12):884-8.
- Grau E, **Oltra S**, Martínez F, Orellana C, Cañete A, Hernández M, Castel V. Focus in neuroblastoma research. Editor Julio A. Fernandez. ISBN 1-60021-484-3. 2007 Nova Science Publishers Inc.
- Grau E, Martínez F, Orellana C, Canete A, Yañez Y, **Oltra S**, Noguera R, Hernández M, Bermúdez JD, Castel V. Epigenetic alterations in disseminated neuroblastoma tumour cells: influence of TMS1 gene hypermethylation in relapse risk in NB patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010 Sep;136(9):1415-21.
- Grau E, Martínez F, Orellana C, Canete A, Yañez Y, **Oltra S**, Noguera R, Hernández M, Bermúdez JD, Castel V. Hypermethylation of apoptotic genes as independent prognostic factor in neuroblastoma disease. *Mol Carcinog.* 2011 Mar;50(3):153-62.

Anexo II: Financiación

1.- Becas personales

Becario Proyecto FIS Instituto de Salud Carlos III)

Neuroblastoma: caracterización biológica y estudio de enfermedad mínima residual (FIS 99/0630)

Unidad de Genética, Hospital Universitario La Fe

Desde Abril 2000 a Diciembre de 2001

Becario Proyecto EVES (Consellería de Sanitat, Generalitat Valenciana)

Caracterización genética y estudio de enfermedad mínima residual en Neuroblastoma (EVES BM-006-2002)

Unidad de Genética, Hospital Universitario La Fe

Desde enero de 2002 a septiembre de 2002

Becario BEFI (Instituto de Salud Carlos III)

Referencia: 02/9089

Unidad de Genética, Hospital Universitario La Fe

Desde Octubre de 2002 hasta Abril de 2005

2.- Proyectos de investigación

Título del proyecto: Neuroblastoma: caracterización biológica y estudio de enfermedad mínima residual

Entidad financiadora: Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 99/0630)

Entidades participantes: Hospital Universitario La Fe

Duración, desde: 01-01-1999 hasta: 31-12-2001

Título del proyecto: Caracterización Genética y estudio de Enfermedad Mínima Residual en Neuroblastoma.

Entidad financiadora: EVES (EVES BM-006-2002)

Entidades participantes: Hospital Universitario La Fe, Hospital Clínico Universitario de Valencia

Duración, desde: 01-01-2002 hasta: 31-12-2002

Título del proyecto: Estudio de Enfermedad Residual Mínima en Sangre y Medula Osea de Niños con Neuroblastoma de Alto Riesgo. Valor de la inmunocitología, PCR cuantitativa y búsqueda de nuevos marcadores.

Entidad financiadora: Fondo de Investigación Sanitaria (PI020315)

Entidades participantes: Hospital Universitario La Fe

Duración, desde: 2003 hasta: 2005

Título del proyecto: Patología molecular de los tumores sólidos infantiles. Aportación al diagnóstico y a la individualización del tratamiento

Entidad financiadora: Fondo de Investigación Sanitaria (G03/089)

Entidades participantes: Hospital Universitario La Fe

Duración, desde: 01-01-2003 hasta: 31-12-2005

Título del proyecto: International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Research Network. Thematic Network. Work package number WP4. Bone Marrow Subcommittee

National Reference Laboratory (Spain)

Entidad financiadora: European Commission specific programme Quality of Life and Management of Living Resources (QoL)

Entidades participantes: Hospital Universitario La Fe

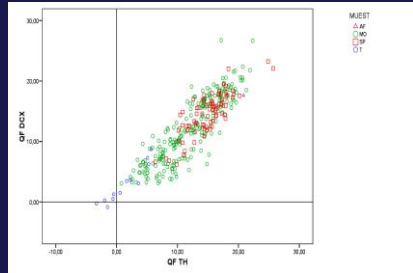
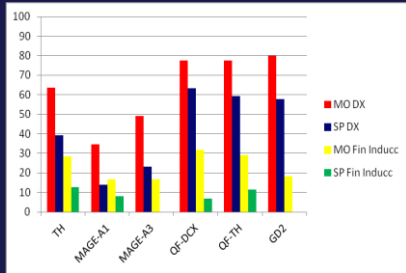
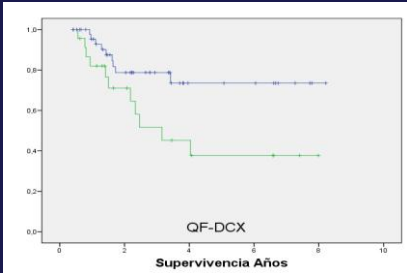
Duración, desde: 2002 hasta: 2005

Título del proyecto: Caracterización de alteraciones cromosómicas y epigenéticas de utilización clínica en tumores pediátricos del sistema nervioso.

Entidad financiadora: Consellería de Sanidad, Generalitat Valenciana.

Entidades participantes: Hospital Universitario La Fe

Duración, desde: 2006 hasta: 2006



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

