

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y
GINECOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**



**VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA**

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DE UNA PUNTUACIÓN SEMICUANTITATIVA
DE MIBG COMO FACTOR PRONÓSTICO EN
NEUROBLASTOMA METASTÁSICO Y CORRELACIÓN CON
OTROS FACTORES PRONÓSTICOS CONOCIDOS**

**JULIA BALAGUER GULL
Oncología Pediátrica
Valencia, 2013**

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRÍCIA Y
GINECOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE VALENCIA**



**EVALUACIÓN DE UNA PUNTUACIÓN SEMICUANTITATIVA
DE MIBG COMO FACTOR PRONÓSTICO EN
NEUROBLASTOMA METASTÁSICO Y CORRELACIÓN CON
OTROS FACTORES PRONÓSTICOS CONOCIDOS**

Autora: Julia Balaguer Guill- Oncología Pediátrica
Directores de Tesis: Adela Cañete Nieto
Joaquin Donat Colomer
Pilar Bello Arqués

Dña. Adela Cañete Nieto, Doctora en Medicina por la Universidad de Valencia y Profesora Asociada del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

D. Joaquin Donat Colomer, Doctor en Medicina por la Universidad de Valencia y Profesor Titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Dña. Pilar Bello Arqués, Doctora en Medicina por la Universidad de Valencia.

CERTIFICAMOS:

Que la Tesis Doctoral Titulada **“Evaluación de una puntuación semicuantitativa de MIBG como factor pronóstico en Neuroblastoma metastásico y correlación con otros factores pronósticos conocidos”** ha sido realizada íntegramente por Dña. Julia Balaguer Guill bajo nuestra supervisión.

Dicho trabajo está concluido y, en nuestro criterio, reúne todos los méritos necesarios para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia a 14 de marzo de 2013.

Fdo. Prof^a. Adela Cañete Nieto

Fdo. Prof. Joaquin Donat Colomer

Fdo. Dra. Pilar Bello Arqués

AGRADECIMIENTOS:

A mi familia

A mis padres, por darme la vida y creer en mí, y porque me han enseñado casi todo lo importante que sé...

A mis hermanos y abuelos, por quererme y apoyarme siempre.

A Herminio, *pel teu amor incondicional... espere poder dedicar-te el temps que te mereixes...*(Have I ever told you...?)

A mis hijos Ferran y Marc, por enseñarme cada día a superarme a mí misma, y hacerme querer ser mejor persona...

A mis maestros, a mis compañeros, por su gran apoyo y motivación, tanto en la elaboración de esta tesis como en el resto de mi vida profesional.

A mis amigos, por compartir los buenos y malos momentos. Vosotros sabéis quién sois.

PROYECTOS Y PUBLICACIONES:

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la concesión de un Contrato de Investigación Predoctoral post-residentes para Personal Investigador en Formación otorgada por el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

PUBLICACIONES:

- Semiquantitative ^{123}I -Metaiodobenzylguanidine score as prognosis marker in high risk neuroblastoma. J Balaguer, A Cañete, A Rivas, A Mateo, V Castel. Congress journal Pediatric Blood & Cancer, October, 2012.
- Early Scintigraphic response by ^{123}I -I-MIBG scan correlates with overall survival in Stage 4 neuroblastoma. Balaguer J, Cañete A, Rivas A, Mateo A, Castel V. Congress journal Pediatric Blood & Cancer, October, 2008.
- New prognostic markers in neuroblastoma. Samuel Navarro, Marta Piqueras, Eva Villamón, Yania Yáñez, Julia Balaguer, Adela Cañete, Rosa Noguera. Expert Opinion on Medical Diagnostics Nov 2012, Vol. 6, No. 6: 555–567.

- Actualización en neuroblastoma. J Balaguer, V Castel. Anales de Pediatría Continuada (Programa de formación continuada en pediatría).Sept-oct 2008; Vol 6 (5):276-283.

Proyectos de investigación:

Colaboración con el Centro de Investigación en Tecnologías Gráficas de la Universidad Politécnica de Valencia: Procesamiento automático de MIBG mediante algoritmos de medición cuantitativa de captación de imágenes individuales.

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
MO	Médula ósea
BUMEL	Régimen de acondicionamiento en el trasplante de progenitores hematopoyéticos con busulfan y melfalan
CCSG	Children´s Cancer Study Group (grupo de estudio del cáncer pediátrico)
CEM	Régimen TAMO con carboplatino, etopósido y melfalan
CI	Intervalo de confianza
COG	Children´s Oncology Group (Grupo de oncología pediátrica)
COJEC	Programa de inducción rápida con platino (CBDCA, CDDP, CYC, VCR, VP16)
CR	Respuesta completa
EBMT	Grupo Europeo de Trasplante de medula ósea
EMR	Enfermedad mínima residual
ENE	Enolasa neuronal específica
ENSG	European Neuroblastoma Study Group.(Grupo europeo estudio del neuroblastoma)
ENQUA	European Neuroblastoma Group for Quality Assessment of Biological Markers (grupo europeo de neuroblastoma para la evaluación de calidad de los marcadores biológicos)
G-CSF	Factor de crecimiento estimulante granulocítico (filgrastim)
GD2	Gangliósido

Gy	Gray
HVA	Acido homovanílico
IL2	Interleukina-2
INCR	International Neuroblastoma Response Criteria (criterios internacionales de respuesta del neuroblastoma)
INSS	International Neuroblastoma Staging System (sistema internacional de estadiaje del neuroblastoma)
INRGSS	International Neuroblastoma Risk Group Staging System
LDH	Lactato deshidrogenasa
SLE	Supervivencia libre de eventos adversos
LINES	Low and Intermediate Neuroblastoma Study
LOH	pérdida de heterocigosidad
MIBG	metaiodobencilguanidina
post Score	Score de MIBG post inducción
NB	Neuroblastoma
N-Myc	Amplificación gen MYC
PCNA	Antígeno de proliferación nuclear
RT-PCR	Trascrición inversa por reacción en cadena de polimerasa
TAC	Tomografía computerizada
TAMO	Trasplante autólogo de médula ósea
TRK	Tirosin-kinasa transmembrana
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VMA	Acido vanilmandélico

ÍNDICE GENERAL

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN:

1. Neuroblastoma:

1..1 Definición

1..2 Factores pronósticos

1..2.1 Clínicos:

1..2.1.1 Edad.

1..2.1.2 Estadio.

1..2.1.3 Localización del tumor primitivo.

1..2.2 Biológicos:

1..2.2.1 Catecolaminas y Meta- yodo-bencil-guanidina.

1..2.2.2 Enolasa neuronal específica.

1..2.2.3 Ferritina.

1..2.2.4 Enzima láctico-deshidrogenasa.

1..2.2.5 Factores pronósticos histopatológicos:
Shimada y Clasificación Patológica
Internacional (INPC).

1..2.3 Genéticos:

1..2.3.1 Amplificación del oncogén N-Myc.

1..2.3.2 Pérdida de heterocigosidad en el brazo
corto del cromosoma 1 (LOH 1p).

1..2.3.3 Pérdida de heterocigosidad en el brazo largo del cromosoma 11 (LOH 11q).

1..2.3.4 Ploidía.

1..2.3.5 Alteraciones cromosómicas segmentarias.

1..2.3.6 ALK

1..2.3.7 Del1p.

1..2.3.8 Otros.

2. Clínica

3. Procedimientos diagnósticos:

3..1 Estudio del tumor primario

3..2 Estudio de las metástasis

4. Metaiodobencilguanidina:

4..1 Radiofármaco.

4..2 Distribución.

4..3 Procedimiento.

4..4 Valor pronóstico.

5. Estudio de la Médula Ósea: Citología y Biopsia (AP)

5..1 Citología (Punción aspirativa de médula ósea).

5..2 Biopsia de Médula ósea.

5..3 Inmunocitología.

5..4 RT-PCR.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

PACIENTES Y METODOS:

1. Población a estudio:

1.1. Manejo de los pacientes:

1.1.1. Diagnóstico

1.1.2. Tratamiento:

- Estudio cooperativo NII92 de la Sociedad Española de Oncología Pediátrica.
- Estudio cooperativo NAR99 de la Sociedad Española de Oncología Pediátrica.
- Estudio cooperativo HRNBL Internacional de Oncología Pediátrica (SIOPEN).

1.2. Manejo de las muestras:

1.2.1. Material para cultivos celulares.

1.2.2. Material para biología molecular.

2. Métodos:

2.1. Evaluación de la respuesta y estudio de la enfermedad mínima residual.

2.1.1. Metayodobencilguanidina.

2.1.1.1. Preparación del paciente.

2.1.1.2. Radiofármaco: ¹²³I-MIBG

2.1.1.3. Gammacámara

2.1.1.4. Protocolo de exploración.

2.1.1.5. Procesado.

2.1.1.6. Interpretación.

2.1.1.7. Descripción score Semicuantitativo utilizado.

2.1.2. Estudio de la enfermedad mínima residual en médula ósea mediante marcadores genéticos.

2.2. Estadística:

2.2.1. Variables clínicas.

2.2.1.1. Edad y sexo.

2.2.1.2. Localización del tumor primitivo.

2.2.1.3. Localización de las metástasis.

2.2.1.4. Estadío.

2.2.1.5. Situación actual del paciente.

2.2.1.6. Recaída.

2.2.1.7. Fallecimiento.

2.2.2. Variables séricas.

2.2.2.1. Enolasa.

2.2.2.2. LDH

2.2.2.3. Ferritina

2.2.3. Variables tisulares.

2.2.3.1. Histología.

2.2.3.2. Clasificación de Shimada

2.2.4. Variables genéticas.

2.2.4.1. Aislamiento de DNA genómico.

2.2.4.2. Amplificación del oncogén N-Myc y la Delección 1p.

2.2.4.3. Índice de DNA.

RESULTADOS:

1. Características generales de la muestra y estudio de las variables:
 - 1.1. Edad.
 - 1.2. Amplificación N-Myc.
 - 1.3. MTX óseas al diagnóstico.
 - 1.4. MTX médula ósea al diagnóstico
 - 1.5. Recaída
 - 1.6. SLE, SG s/ F pronósticos
 - 1.7. Tiempo de supervivencia a 5 años: según superación o no de horizontes de supervivencia definidos por percentiles.

2. Estudio de la enfermedad mínima residual tras quimioterapia de inducción.
 - 2.1. Estudio de los diferentes factores según Score de Metaiodobencilguanidina (MIBG).
 - 2.1.1. Características generales.
 - 2.1.2. Score MIBG pre-tratamiento de inducción para evaluación de afectación basal.
 - 2.1.3. Score MIBG post- tratamiento de inducción para evaluación de respuesta.

2.1.4. Tiempo de supervivencia a 5 años: según superación o no de horizontes de supervivencia definidos por percentiles.

2.2. Estudio de la enfermedad mínima residual en médula ósea tras quimioterapia de inducción en pacientes con neuroblastoma metastático: técnicas habituales y nuevas técnicas.

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

ABSTRACT:

SEMIQUANTITATIVE ^{123}I -METAIODOBENZYLGUANIDINE SCORE AS PROGNOSIS MARKER IN HIGH RISK NEUROBLASTOMA: CORRELATION WITH OTHER PROGNOSTIC MARKERS AND MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN BONE MARROW.

Purpose: Metaiodobenzylguanidine (MIBG), specifically taken up in cells of sympathetic origin, provides a highly sensitive and specific marker for the detection of metastases in neuroblastoma. Our aim has been to investigate whether response to induction therapy, evaluated by ^{123}I -MIBG correlates with overall survival (OS) and other prognostic factors in children with metastatic neuroblastoma.

Patients and Methods: Medical records and imaging studies from 28 patients with stage 4 neuroblastoma have been retrospectively reviewed. Treatment consisted of intensive chemotherapy, delayed surgery, megatherapy and local irradiation. The scintigraphic response was evaluated by ^{123}I -MIBG scans, using a semi-quantitative scoring system for grading positivity (*see ref*). It was applied as a pilot retrospective study trying to determine the feasibility of this procedure in our setting, in order to be prospectively implemented in the next international cooperative study.

Results: Patients whose score at diagnosis was ≤ 14 had better life-expectancy (>90 months) than those with score >14 at diagnosis (p value 0,052). Only 25% of patients with N-Myc amplified neuroblastoma survived more than 20 months compared to 89% of the non-amplified neuroblastoma patients (p value 0,03). A trend correlating abnormal MIBG after induction therapy and worse outcome was observed (survival was 0% if score >0 vs. 35% in the cases with score 0; p value 0.07). Patients with abnormal MIBG after induction were older than those with complete MIBG response (median age at diagnosis: 4.5 vs. 2.8 years respectively; p value 0.14).

There were no statistical differences between N-Myc amplification and persistent MIBG uptake after induction (28% vs. 33%; p value 0.79), but there was correlation with time of survival between cases with MIBG after induction >0 and $=0$ (18.43 vs. 33.45 months respectively; p value 0.059) and Overall Survival between cases with MIBG after induction >0 and $=0$ (0% vs. 33%; p value 0.063).

Conclusions: Semiquantitative ^{123}I -MIBG score post induction therapy can be utilized to identify a subset of ultra-high-risk patients, with worse prognosis, and faster relapses. More studies are needed to obtain a cut point. Nonetheless, alternative therapeutic strategies should be considered for these patients with poor response.

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL:

1.- NEUROBLASTOMA:

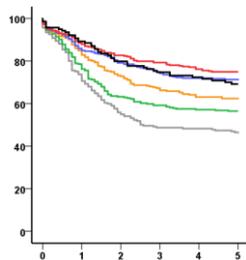
1..1 Definición:

Los tumores neuroblásticos son neoplasias embrionarias del sistema nervioso simpático, derivadas de células con origen en la cresta neural que en el embrión emigran hacia la médula adrenal, ganglios simpáticos para y prevertebrales, y paraganglios simpáticos como el órgano de Zuckerkand¹.

Su incidencia² oscila entre 8-10 casos por millón de niños y año (Registro nacional de tumores infantiles), siendo el tumor extracraneal más frecuente en la infancia y el cuarto en frecuencia en el cómputo total de neoplasias infantiles tras las leucemias, tumores del SNC y linfomas³. Por lo tanto, suponen entre un 8-10% de los cánceres de la infancia, y más del 50% de los cánceres del lactante^{2,4,5}. En nuestro país, entre el año 1980 y el 2007, el neuroblastoma supuso un 10% de todos los tipos de cáncer diagnosticados entre 0 y 14 años, el 47% de los neuroblastomas se diagnosticaron en el primer año de vida y el 90% antes de los 5 años, presentando metástasis el 51% de los niños mayores de 1 año.

En nuestra Unidad de Oncología Pediátrica, entre enero 1992 y diciembre 2007 hubo 1580 nuevos pacientes < 14 años diagnosticados de cáncer, siendo 140 de ellos neuroblastomas (suponiendo aproximadamente un 11,3% sobre el total).

Figura 1:RNTI-SEHOP. Neuroblastomas. Supervivencia a 5 años del diagnóstico por cohortes de año de incidencia. 0-14 años, 1980-2006. N casos = 1.624
% Supervivencia



Tiempo de supervivencia en años

Cohortes: 05-06 (negro); 00-04 (rojo); 95-99 (azul); 90-94 (naranja); 85-89 (verde); 80-84 (gris).

Neuroblastoma de alto riesgo:

En general⁶, el 40% de los pacientes se diagnostican con un tumor localizado y el resto son metastásicos, con una supervivencia global a los 5 años del diagnóstico de tan sólo 30%.

Su comportamiento clínico es muy variable, siendo posible desde una regresión o maduración espontánea hasta tumores diseminados muy agresivos, con mala evolución a pesar de tratamiento intensivo.

La baja tasa supervivencia a largo plazo de algunos pacientes⁷, especialmente aquellos identificados como Neuroblastoma de alto riesgo, hacen necesario un nuevo enfoque en busca de nuevos factores predictores de respuesta precoz, que identifiquen aquellos pacientes de ultra-alto riesgo que puedan beneficiarse de tratamientos más intensivos, así como nuevas estrategias como la combinación de fármacos que actúen por otras vías o la inmunoterapia, para intentar aumentar la supervivencia.

En el año 2002 se activó el primer estudio europeo sobre pacientes con neuroblastoma de alto riesgo, en el que se incluían pacientes mayores de un año con metástasis o estadios 2 y 3 con amplificación del oncogén N-Myc; modificándose en el año 2004 para permitir la inclusión de lactantes con tumores con N-Myc amplificado (con una SG 20% en el estudio 99.4). Este protocolo incluía la megaterapia con rescate de progenitores hematopoyéticos precedida de quimioterapia de inducción de intensidad moderada, cirugía diferida y radioterapia sobre lecho tumoral como estrategia de tratamiento.

Se aleatorizaron dos regímenes de acondicionamiento (BUMEL frente a CEM) y un tratamiento de mantenimiento que incluía no sólo el tratamiento diferenciador con ácido 13-cis-retinoico sino también la inmunoterapia. En Septiembre del 2011 se habían reclutado 1748 pacientes y se han resuelto dos de las tres aleatorizaciones planteadas: En la primera (R0), se demuestra que los pacientes que reciben G-CSF durante la inducción presentan menos complicaciones infecciosas, días de hospitalización e misma eficacia para la aféresis que los pacientes que no lo reciben.

En Octubre del 2010 se cerró la segunda aleatorización (R1), por consejo del Comité de Expertos Independientes, ya que el régimen BUMEL era más eficaz en cuanto a mayor supervivencia (SG a 3 años BUMEL 49% vs. CEM 33%) y menor toxicidad que el régimen CEM para el acondicionamiento en la megaterapia.

La tercera aleatorización (R2) sobre la inmunoterapia sigue en marcha modificada en Julio del 2009, tras los resultados del Ensayo del *Children's*

Oncology Group sobre la superioridad de la misma asociada al tratamiento de mantenimiento con el ácido 13- sic-retinoico frente al tratamiento diferenciador exclusivo. Así, desde Julio 2009 todos los pacientes se tratan con el tratamiento diferenciador y ch14.18, aleatorizando el uso de Il-2 a dosis altas, subcutánea.

Se planea introducir una nueva modificación con una cuarta aleatorización (R3) sobre la quimioterapia de inducción, comparando la actual (*Rapid- Cojec*) con el régimen americano modificado, basado en el N7 del MSKCC (Memorian Sloan Ketterine Cancer Center New York).

Neuroblastoma de muy alto riesgo:

Actualmente existe una tendencia a intentar identificar pacientes de MUY ALTO RIESGO, ya sea por una pobre o lenta respuesta inicial al tratamiento (malos respondedores y/o refractarios) o porque han recaído tras conseguir un control inicial de la enfermedad.

Los Comités de que se encargan de medir la Enfermedad Mínima residual (Biología y Medicina Nuclear) han estado trabajando en colaboración con los otros grupos cooperativos en los últimos años para definir exactamente lo que se considera una respuesta adecuada, con biomarcadores que reflejen la situación de la enfermedad.

Tanto el COG como SIOPEN están diseñando estudios fase I y II con nuevos fármacos, utilizando estrategias tipo “pick the winner-drop the loser”, que permiten realizar ensayos en poblaciones muy pequeñas, como sería el

caso de los pacientes con NB de muy alto riesgo, con un “backbone” específico de terapia (nuevos quimioterápicos como temozolamida y camptotecinas que han demostrado respuestas en enfermedad avanzada) al que añadir nuevos fármacos “diana”: antiangiogénicos, fármacos que alteran la estabilidad de la oncoproteína N-Myc, Anti-ALK, PI3K, mTor, etc...

También la inmunoterapia ha emergido, destinada a incrementar la eficacia inmunomoduladora de los anticuerpos existentes, disminuir su toxicidad, explorar nuevas vías (inmunocitoquinas, anti-idiotipos y vacunas, combinación con el trasplante de intensidad reducida haploidéntico, etc...).

Las terapias que incorporan ^{131}I -MIBG a dosis terapéuticas están desarrollándose en Estados Unidos y en Europa, donde se va a incluir en un nuevo estudio para pacientes refractarios o malos respondedores, con una aleatorización entre doble trasplante versus ^{131}I -MIBG terapéutica y megaterapia combinada. En cualquier caso, los estudios biológicos y de determinación de respuesta a través de biomarcadores van a ser cruciales.

1..2 Factores pronósticos:

El comportamiento biológico es muy variable, ya que en algunos pacientes puede regresar espontáneamente, en otros involuiona con un tratamiento mínimo, mientras que existen casos en los que la enfermedad progresa o reaparece a pesar de tratamientos muy agresivos ^{8,9}.

Mediante el estudio de los factores pronósticos, se intenta identificar y estratificar a los pacientes en diferentes grupos de riesgo en el momento del

diagnóstico, para ajustar el tratamiento en función de la agresividad del tumor, con el fin de conseguir un mayor índice de curaciones con la menor morbilidad a corto y largo plazo.

Tabla 1: Factores pronósticos en neuroblastoma:

FACTOR	IMPACTO: PEOR PRONOSTICO	REFERENCIA
EDAD	>18MESES	London WB et al. Clinical and biologic features predictive of survival after relapse of neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. J Clin Oncol. 2011 Aug 20;29(24):3286-92.
ESTADIO	METÁSTASIS MÉDULA ÓSEA, HUESO	Brodeur GM et al.: International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. J Clin Oncol 6 (12): 1874-81, 1988
ONCOGEN NMYC	NMA	Breit Set al. Suppression of MYC by high expression of NMYC in human neuroblastoma cells. J Neurosci Res. 1989 Sep;24(1):21-8. Canete A et al. Poor survival for infants with MYCN-amplified metastatic neuroblastoma despite intensified treatment: the International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Experience. J Clin Oncol. 2009 Mar 1;27(7):1014-9.
HISTOLOGIA	NB INDIFERENCIADO	Shimada H et al. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. Cancer. 1999 Jul 15;86(2):349-63. Sano Het al. International

		neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age. Eur J Cancer. 2006 May;42(8):1113-9.
CROMOSOMA 1	DELECCION	Caron H et al. 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.
CROMOSOMA 17	GANANCIA	Łastowska M et al. Identification of candidate genes involved in neuroblastoma progression by combining genomic and expression microarrays with survival data. Oncogene. 2007 Nov 22;26(53):7432-44.
CROMOSOMA 11	DELECCION	Attiyeh EF et al. Children's Oncology Group. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. N Engl J Med. 2005 Nov 24;353(21):2243-53.
PLOIDIA	DIPLOIDE	Ladenstein R et al. Prognostic significance of DNA di-tetraploidy in neuroblastoma. Med Pediatr Oncol. 2001 Jan;36(1):83-92.
PERFIL GENOMICO	ABERRACIONES ESTRUCTURALES	Schleiermacher Get al. Accumulation of segmental alterations determines progression in neuroblastoma. J Clin Oncol. 2010 Jul 1;28(19):3122-30.
TRK	TRK-A	Nakagawara A et al. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. N Engl J Med. 1993 Mar 25;328(12):847-54.
ANGIOGENESIS	INDICE VASCULAR	Cañete A et al. Angiogenesis in neuroblastoma: relationship to survival and other prognostic factors in a cohort of neuroblastoma patients. J Clin Oncol. 2000 Jan;18(1):27-34.

		Katzenstein HM, Salwen HR, Nguyen NN et al. Antiangiogenic therapy inhibits human neuroblastoma growth. Med Pediatr Oncol. 2001 Jan;36(1):190-3.
ATRX	MUTATION	Cheung NK et al. St Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome Project. Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. JAMA. 2012 Mar 14;307(10):1062-71.
ALK	MUTACIÓN	Mossé YP et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. Nature. 2008 Oct 16;455(7215):930-5.
MRP	EXPRESIÓN	Haber M et al. The prognostic value of MDR1 gene expression in primary untreated neuroblastoma. Eur J Cancer. 1997 Oct;33(12):2031-6.

1.2.1.- Factores pronósticos clínicos:

1.2.1.1.- Edad:

En ningún otro tumor pediátrico la edad juega un papel tan importante en cuanto al pronóstico¹⁰⁻¹².

Una revisión de 3666 pacientes con neuroblastoma registrados en un Protocolo de Estudio cooperativo (POG-CCG) desde 1986 a 2001 obtuvieron una edad media al diagnóstico de 19 meses.²

La edad > 12 meses al diagnóstico^{11,13} y la enfermedad diseminada han sido los 2 factores pronósticos más asociados a peor evolución desde hace más de 20 años¹⁴.

Ya en el año 1973, Mc Breslow y McCann¹⁵ realizaron un estudio con una muestra grande de pacientes diagnosticados de Neuroblastoma, identificando la edad como un factor pronóstico importante, y además como una variable independiente del sistema de estadificación utilizado.

Los pacientes del *Children's Oncology Group* (COG) y los del estudio europeo (SIOPEN) se estratifican actualmente según edad al diagnóstico. Aunque inicialmente, el punto de corte aceptado había sido 365 días, recientes estudios realizados por el *Children's Oncology Group* (COG)¹⁶ sugieren que el punto de corte debe situarse en edades más avanzadas. London et al¹⁶ estudiaron la influencia de la edad en el pronóstico en 3,666 pacientes con neuroblastoma, ajustando según N-Myc y estadio. Se eligió un punto de corte de 460 días en el que se confirmó una diferencia significativa en cuanto al pronóstico: 43% eran < 460 días, 57% eran mayores. La supervivencia libre de eventos a los 4 años fue de: 82% +/- 1% [n = 1,589] y 42% +/- 1% [n = 2,077] respectivamente; P < .0001. En los pacientes mayores de 12 años, fue del 10%. Todos los pacientes con estadio 4 o MYCN amplificados continuaron siendo de alto riesgo, pero el 5% de los pacientes entre 365-460 días fueron re-clasificados en un grupo de menor riesgo, puesto que la supervivencia libre de eventos fue de 92%.

Por ello, a partir de estos resultados¹⁷, el punto de corte se ha situado en 18 meses, puesto que el pronóstico de los pacientes de entre 12 y 18 meses es similar al de los menores de 1 año, pudiendo beneficiarse estos pacientes de un tratamiento menos intensivo, excepto aquellos con N-Myc o estadio M del INRGSS (4 del INSS).

1.2.1.2.- Estadio:

El estadio valora la extensión de la enfermedad al diagnóstico y es uno de los factores clínicos más importantes junto a la edad.

La extensión metastásica de los neuroblastomas ocurre mediante vía hematógica y linfática, un 50-60% de los pacientes se diagnostican con enfermedad diseminada, siendo las localizaciones más frecuentes de las metástasis la médula ósea, los huesos y el hígado, oscilando la supervivencia global entre el 10 y 15% a los 5 años⁶.

La importancia de evaluar la extensión de la enfermedad mediante el estadio se reconoce desde los años setenta (estadios de Evans, POG.Evans y colaboradores¹⁸ definieron unos criterios de estadificación que han sido utilizados por los algunos de los grupos cooperativos, aportando una mejor comparación de los pacientes.

En 1988¹⁹ gracias al impulso de la Fundación Forbeck, expertos de diferentes grupos nacionales consensuan los Criterios internacionales de Estadificación (*International Neuroblastoma Staging System*). Estos criterios comunes internacionales, se modifican en el año 1993²⁰ y han sido revisados

periódicamente, definiendo también los criterios de respuesta al tratamiento (INRC).

Tabla 2: Estadificación internacional INSS¹⁹.

ESTADÍO	DEFINICIÓN
1	Tumor localizado con escisión macroscópica completa, con enfermedad residual microscópica o sin esta; ganglios linfáticos ipsilaterales representativos, microscópicamente negativos para el tumor (los ganglios adheridos al tumor primario y extirpados junto a 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, la 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 (circunscrito a lactantes menores de un año de edad). La afectación medular debe ser mínima (o sea, <10% de células nucleadas totales identificadas como malignas por biopsia de hueso o por aspirado de médula ósea). Una afectación más extensa de la médula ósea se consideraría como enfermedad en estadio IV. Los resultados de la exploración con MBIG en caso de que se efectúe, deben ser negativos para la enfermedad en la médula ósea.

Tabla 3: INRC²⁰ : Criterios internacionales de respuesta al tratamiento.

RESPUESTA	DEFINICIÓN
RC	Respuesta completa (RC): desaparición total del tumor, sin indicios de enfermedad. Las concentraciones de VMA/HVA son normales.
MBRP	Respuesta parcial muy buena (MBRP): 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 permite cambios residuales en hueso.
RP	Respuesta parcial (RP): 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 (RM): 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 de 25% de aumento en cualquier lesión.
EE	Enfermedad estable (EE): no hay lesiones nuevas; reducción de menos de 50% y aumento menor del 25% en cualquier lesión.
PE	Progresión de la enfermedad (PE): cualquier lesión nueva; aumento de cualquier lesión cuantificable en más de 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. Se debe ser cuidadoso al diagnosticar una enfermedad metastásica en un lactante al que inicialmente se consideró de estadio 1 o 2. Si la localización de las metástasis concuerda con el patrón de enfermedad 4S (piel, hígado, médula ósea con infiltración menor del 10%), deben tratarse como un estadio 4S.

Castel et al ²¹, en 1999 estudiaron una muestra de 194 pacientes con neuroblastoma, diagnosticados con una edad media de 2 años, aplicando la estadificación INSS sin observar incremento de las complicaciones post-

quirúrgicas. La respuesta al tratamiento se evaluó mediante el (INRC) en 63 pacientes con neuroblastoma metastásico, observándose diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia, que se relacionaron con el estadio INSS ($P < 0.001$).

A pesar de que muchos países alrededor del mundo lo han utilizado, se han objetivado algunos problemas, que han hecho necesaria la búsqueda de nuevos sistemas de estadificación:

Por un lado, el INSS no es adecuado para clasificar a los pacientes según su riesgo previo al tratamiento, puesto que se basa en la cirugía que se realice. En realidad, el mismo tumor puede clasificarse como INSS estadio 1 o 3 dependiendo de la pericia del cirujano, haciendo imposible la comparación de los diferentes estudios investigacionales basados en el mismo.

Del mismo modo, un tumor que “regrese espontáneamente” no puede ser clasificado según el INSS.

Además, hubo dos aspectos que no quedaron claramente definidos en la clasificación INSS: la evaluación adecuada de los ganglios linfáticos y la definición exacta de la línea media.

En 2004, investigadores de los grandes grupos cooperativos como el *Children's Oncology Group* (COG) de Norte América y Australia-Nueva Zelanda, el *German Pediatric Oncology and Hematology Group* (GPOH), el *Japanese Neuroblastoma Study Group* (JNBSG), y la *International Society of Pediatric Oncology Europe Neuroblastoma* (SIOPEN) Group- and China constituyeron el *International Neuroblastoma Risk Group* (INRG) Task Force,

desarrollando el *INRG Staging System* (INRGSS) y el *INRG Risk Classification System* para neuroblastoma.

Debido a los cambios terapéuticos acaecidos a lo largo de los últimos años, la necesidad de un nuevo sistema de estadificación para los pacientes diagnosticados de neuroblastoma se hizo patente, por lo que este grupo de expertos analizó la supervivencia libre de eventos de 8800 pacientes diagnosticados de NB entre 1990 y 2002, identificando 16 grupos de riesgo, que pudieron re-agruparse dentro de 4 grupos: muy bajo, bajo, intermedio y alto riesgo.

El INRGSS^{22,23} publicado en 2009, fue designado para la estadificación tumoral al diagnóstico, antes de la cirugía u otro tratamiento. Este nuevo sistema de estadificación INRG²⁷, incluye 2 estadios localizados (L1 y L2), que dependen de la presencia de alguno de los 20 factores de riesgo definidos por imagen o *image-defined risk factors* (IDRFs) y 2 estadios metastásicos (M y Ms, comparables con los estadios 4 y 4S del INSS, descrito por Evans y modificado posteriormente en cuanto a tamaño del tumor primitivo y edad.)

Tabla4: Estadificación Internacional INRGSS^{23,24}.

ESTADÍO	DEFINICIÓN
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 MAS factores de riesgo definidos por imagen.
M	Enfermedad metastática a distancia (excepto estadios Ms)
MS	Enfermedad metastática en niños menores de 18 m con metástasis confinadas a la piel, hígado y/o médula ósea.

Los IDRFs o Factores de riesgo definidos por imagen²⁵, son factores de riesgo quirúrgicos, que son detectados por la imagen al diagnóstico, y cuya presencia sugiere que la extirpación del tumor sea dificultosa o arriesgada en el momento de la cirugía inicial, y por lo tanto, aunque se debe individualizar cada caso, la resección completa sería considerada de riesgo en ese momento. De este modo, la imagen al diagnóstico ha cobrado mayor importancia, en detrimento del tipo de cirugía. Además, dado que las imágenes pueden ser revisadas retrospectivamente, se supone que este sistema basado en los hallazgos de imagen al diagnóstico o preoperatorios será más robusto y reproducible que el anterior, basado en los hallazgos quirúrgicos. También es esperable que facilite la revisión centralizada por radiólogos expertos, siendo la evaluación más uniforme. Actualmente este sistema no se utiliza para valoración de riesgo en la cirugía diferida.

Los factores de riesgo definidos por imagen son²³:

1. Extensión de tumor ipsilateral en dos compartimientos:

- Cuello:
 - Tumor engloba carótida o arteria vertebral o vena yugular interna
 - Tumor que se extiende a la base del cráneo
 - Tumor comprimiendo la tráquea
- Unión cérvico-torácica:
 - Tumor engloba las raíces del plexo braquial
 - Engloba la V subclavia o A vertebral y carótida
- Tórax:
 - Tumor engloba la aorta y ramas principales
 - Tumor comprimiendo los bronquios tráquea o principal
 - Tumor de mediastino inferior, infiltrando la unión costo-vertebral entre T9 y T12
- Toracoabdominal-abdominal:
 - Tumor engloba la aorta y la vena cava
- Abdomen y pelvis:
 - Tumor infiltrando la porta hepatis o el ligamento hepatoduodenal
 - Tumor englobando las ramas de la arteria mesentérica superior y la raíz del mesenterio

- Tumor que engloba la raíz del tronco celíaco y/o de la arteria mesentérica superior
 - Tumor invade uno o ambos pedículos renales
 - Tumor que engloba la aorta y la vena cava
 - Tumor que engloba las ilíacas
 - Tumor pélvico que engloba el nervio ciático
2. Extensión del tumor intraespinal, cualquiera que sea la ubicación, siempre que: más de un tercio del canal espinal en el plano axial esté invadido, no sean visibles los espacios perimedulares leptomeníngeos, o la señal de la médula espinal sea anormal.
3. Infiltración de estructuras de órganos adyacentes: Pericardio, diafragma, riñón, hígado, bloque duodeno-pancreático y mesenterio.
4. Condiciones relevantes, pero que no se consideran factores de riesgo por imagen:
- Tumores primarios multifocales
 - Derrame pleural, con o sin células malignas
 - Ascitis, con o sin células malignas

Este nuevo sistema de estadificación no intenta sustituir al INSS, siendo la recomendación actual su aplicación en paralelo, en previsión de una mejor comparación de los Ensayos Clínicos basados en el riesgo a nivel mundial²².

Es destacable, en el caso del Neuroblastoma¹², una forma peculiar de enfermedad diseminada¹⁰ conocida como Estadio 4s o Ms que se da en lactantes con tumor primitivo abdominal y metástasis a distancia en hígado, piel (nódulos subcutáneos) o médula ósea (con menos de un 10% de infiltración tumoral). En ellos, se han visto casos de regresión completa espontánea, probablemente secundaria a fenómenos de muerte celular programada y maduración, y por lo tanto, el pronóstico suele ser mejor que en los pacientes con metástasis en otras localizaciones.^{26,27}

1.2.1.3.- Localización del tumor primitivo:

Se ha observado que los neuroblastomas localizados en mediastino posterior y cuello tienen mejor pronóstico que los neuroblastomas abdominales primarios²⁸. Entre éstos, tienen peor pronóstico los localizados en la glándula suprarrenal que los situados a nivel paravertebral.

1.2.2.- Factores pronósticos biológicos:

Se han identificado numerosos factores pronósticos clínicos y biológicos²⁹⁻³¹, como la elevación de la láctico-deshidrogenasa, la ferritina sérica, enolasa neuronal específica y las catecolaminas urinarias.

1.2.2.1.- Catecolaminas:

En el 85-90% de los pacientes con neuroblastoma, las catecolaminas o sus metabolitos en sangre u orina se encuentran elevados, incluyendo adrenalina, noradrenalina y sus metabolitos, ácido vanilmandélico (VMA), homovanílico (HVA) y dopamina.

Los valores absolutos de dichos metabolitos no han demostrado tener valor pronóstico, pero sí el cociente VMA/HVA cuyo valor mayor de 1 se ha relacionado con mejor pronóstico (especialmente en pacientes con enfermedad diseminada)³². Por otro lado, la excreción de dopamina se produce en los tumores más inmaduros, y por lo tanto, con peor pronóstico.

Estas determinaciones pueden utilizarse con fines diagnósticos en caso de duda, seguimiento de la enfermedad, o como screening en lactantes en vigilancia sin tratamiento siendo de valor pronóstico³³.

La molécula de Meta-yodo-bencil-guanidina (MIBG) es un análogo sintético de la adrenalina que se desarrolló inicialmente para visualizar la médula adrenal y se utilizó para la detección de feocromocitomas. Sin embargo, pronto se vio que era captada por las vesículas secretoras adrenérgicas de los neuroblastomas, compitiendo con la noradrenalina. En realidad, es utilizada por las células de neuroblastoma de la misma forma que la noradrenalina y ello permite, al estar marcada con yodo radioactivo (bien ¹²³I o ¹³¹I) ser usada como método diagnóstico o terapéutico respectivamente. De hecho, todos los tumores neuroblásticos (excepto

ganglioneuromas) pueden acumular MIBG independientemente de la secreción de catecolaminas.

La detección de MIBG ha demostrado una sensibilidad del 90-95% y una especificidad de casi el 100% para localizar lesiones neuroblásticas y se utiliza para el diagnóstico y estadificación de neuroblastoma. Este tema está ampliado en el apartado correspondiente.

1.2.2.2.- Enolasa neuronal específica (ENE):

Es una isoenzima de 2-fosfo-D-glicerato-hidroxilasa ampliamente distribuida en el organismo, que se expresa en las células neuronales y no neuronales. Se determina en suero y se encuentra muy elevada en el 95% de pacientes con neuroblastoma diseminado, pero no es específica. Un valor >100 mg/ml al diagnóstico es pronóstico en lactantes <1 año pero no en mayores. En pacientes con enfermedad localizada rara vez alcanza niveles tan altos³⁴.

Addenbedi et al³⁵ estudiaron los valores de Enolasa neuronal específica en 21 pacientes con neuroblastoma en diferentes estadios, viendo que representaba un marcador moderadamente sensible y específico de los pacientes durante el seguimiento, además de aclarar el diagnóstico en algunos casos³⁶.

1.2.2.3.- Ferritina:

Las células de NB in vitro producen ferritina, y puede ser detectada en el suero de ratones inmunodeficientes portadores de neuroblastomas. Este marcador rara vez está elevado en tumores localizados (y si lo está se asocia a peor pronóstico), pero sí en pacientes con estadios 3 y 4³⁷.

1.2.2.4.- Enzima Láctico-deshidrogenasa (LDH)³⁸:

Es un marcador inespecífico de carga tumoral, así que puede estar muy elevada en caso de enfermedad diseminada.

1.2.2.5.- Factores pronósticos histopatológicos:

Dado que los tumores neuroblásticos tienen su origen en células pluripotenciales de la cresta neural, pueden mostrar un amplio espectro de diferenciación, que se traduce en una marcada heterogeneidad y complejidad histológica, desde el neuroblastoma indiferenciado hasta el estadio final de maduración representado por el ganglioneuroma.

Clasificación patológica internacional (INPC):

Desde los años 80 diferentes grupos internacionales de estudio de tumores neuroblásticos han intentado consensuar los criterios de diagnóstico, estadificación y determinación de factores pronósticos.

El Comité Internacional para el estudio Patológico del NB (INPC) elaboró una clasificación con significación pronóstica y relevancia biológica . Para ello, adoptó, con algunas modificaciones³⁹, el esquema de clasificación

propuesto originalmente por Shimada et al ⁴⁰, basado en los cambios morfológicos que se asocian a la secuencia madurativa, pero manteniendo la nomenclatura tradicional (NB, GNB, GN).⁴¹

Las ventajas que proporciona este sistema de clasificación radican en que consigue una mayor concordancia entre observadores y presenta un mayor grado de significación estadística con respecto a las diferencias en supervivencia entre los grupos favorable y desfavorable³⁹. Además, los dos principales marcadores morfológicos de valor pronóstico (grado de diferenciación y MKI) tienen significación biológica. El grado de diferenciación se correlaciona con la expresión del receptor del factor de crecimiento neural, Trk A, que cuando está aumentado se asocia con diferenciación morfológica y evolución favorable⁴². Por otro lado, un alto índice de mitosis se correlaciona con amplificación del N-Myc⁴³

Así pues, los tumores neuroblásticos se dividen en tres grandes categorías morfológicas, tal como se exponen a continuación:

Clasificación Patológica Internacional (INPC):

A.- Neuroblastoma:

- Subtipo indiferenciado
- Subtipo pobremente diferenciado
- Subtipo en diferenciación

B.- Ganglioneuroblastoma

- Subtipo entremezclado
- Subtipo nodular

C.- Ganglioneuroma

- En maduración
- Maduro

El valor pronóstico de la clasificación INPC ha sido confirmado para neuroblastomas en general⁴⁴ y también en los casos localizados⁴⁵.

Burgues et al⁴⁶ estudiaron la relación entre el pronóstico y la clasificación histopatológica de una serie de 182 casos de neuroblastoma, demostrando diferencias en cuanto a la supervivencia en los casos desfavorables vs los favorables (57 vs 89 meses respectivamente). Además, se encontró una asociación de los casos desfavorables con una mayor tendencia a tener amplificación N-Myc o delección 1p. El estadio 4 y el subtipo indiferenciado fueron los factores más importantes en relación al pronóstico.

Navarro et al⁴⁵ estudiaron 120 pacientes con neuroblastoma en estadios 2A y 2B (INSS) no amplificados, tratados dentro del protocolo internacional 94.1 para Neuroblastoma localizado. La tasa de supervivencia fue de 97% a los 5 años en los definidos como de histología favorable y de 74% en los desfavorables (($p=0.0002$). De este modo, concluyen que la categorización del INPC tiene impacto en la evolución de los pacientes con neuroblastomas localizados también.

1.2.3.- Factores pronósticos genéticos:

La característica biológica de los tumores neuroblásticos es la complejidad de las alteraciones genéticas adquiridas por sus células (que aparecen en casi el 80% de los casos), siendo algunos de estos cambios genéticos marcadores pronósticos independientes de los hallazgos clínicos.

Se han identificado un gran número de alteraciones genéticas recurrentes en NB⁴⁷. La amplificación del oncogén N-Myc se observa en aproximadamente el 20% de los casos y está claramente asociada a un peor pronóstico⁴⁸. Las variaciones del estado de ploidía también se han descrito en recién nacidos, con casi-triploidías asociadas con un resultado excelente, y las diploidía / tetraploidía se correlacionan con un peor resultado⁴⁹. Otras anomalías estructurales cromosómicas se producen recurrentemente en NB, como deleciones en el cromosoma 1p, 3p y 11q, todas se piensa que pueden albergar genes supresores de tumores, todavía no identificados⁵⁰. La ganancia del brazo q del cromosoma 17, que se supone incluye oncogenes, que podrían jugar un papel en la génesis del NB representa la anomalía genética más frecuente en lactantes, y se cree que es un potente predictor independiente de mal pronóstico^{51,52}

1.2.3.1.- Amplificación del oncogénN-Myc:

Biedler y Spengler⁵³ comunicaron la existencia de Regiones cromosómicas con Tinción Homogénea (HSR) y sugirieron que su existencia, junto a la de los cromosomas dobles diminutos comunicadas por Coxen

1965⁵⁴, podían ser manifestaciones de una amplificación génica. Esta hipótesis fue confirmada en 1983 por Schwab y colaboradores⁵⁵, identificando dicha anomalía en el oncogén N-Myc, localizado en el cromosoma 2 (2p24). Esta amplificación génica (N-Myc), que se da en un 20% de pacientes, tiene implicaciones pronósticas muy importantes ya que se suele asociar a tumores que se presentan en estadios avanzados y que progresan con rapidez a pesar del tratamiento. En un estudio del *Children's Cancer Study Group* (CCSG)⁵⁶, la supervivencia libre de progresión a los 18 meses fue de 70% en los pacientes sin amplificación del N-Myc, del 30% en pacientes con 3 a 10 copias (ganancia N-Myc) y del 5% en pacientes con más de 10 copias (amplificación N-Myc).

En los pacientes con enfermedad localizada, rara vez se encuentran copias múltiples del gen N-Myc y en la mayor parte de los casos, se relaciona con evolución desfavorable. Sin embargo, algunos autores como Cohn⁵⁷, en 1995 apuntan que, en el NB localizado, la existencia de N-Myc no implicaría necesariamente una evolución desfavorable. El grupo cooperativo italiano⁵⁸, comunicó su experiencia en 295 niños con neuroblastoma confirmando el peor pronóstico de pacientes con N-Myc excepto en estadios 4s.

Noguera et al⁵⁹ describieron un caso de un paciente con NB 4s que diseminó tras un periodo de latencia de 26 meses, este paciente presentaba ganancia de N-Myc y tetraploidía al diagnóstico.

Actualmente, existe consenso en cuanto a que independientemente de la edad y con estadios ≥ 2 , la detección de la Amplificación N-Myc es de

mal pronóstico incluso en lactantes⁷, aunque sigue siendo controvertido su significado pronóstico en estadios 1⁶⁰.

1.2.3.2.- Pérdida de heterocigosidad en el brazo corto del cromosoma 1 (LOH 1p):

En un porcentaje alto de pacientes con estadios avanzados o recaídas no se detecta N-Myc, por lo que se considera que deben existir otros factores pronósticos genéticos desfavorables. La delección o pérdida de heterocigosidad (LOH) del brazo corto del cromosoma 1 fué identificada en 1977 por Brodeur y colaboradores⁶¹ cuando observaron líneas celulares y tumores neuroblásticos primarios. Se puede estudiar mediante citogenética y, en la actualidad también se usan metodologías como el análisis genómico por CGH, PCR, estudio de polimorfismos, hibridación in situ , FISH, etc....

Se postula la existencia de uno o más genes supresores en el extremo distal del brazo corto del cromosoma 1 (1p36), cuya pérdida estaría implicada en la génesis de un NB agresivo. La presencia de cambios en 1p se ha correlacionado con enfermedad metastásica⁶² y tumores irreseables mientras que tumores localizados y clínicamente favorables presentaban un cromosoma 1 intacto⁶³. Se han propuesto diferentes genes como candidatos (TNFR2, varios factores de transcripción, un miembro de la familia E2F, HKR3...), pero no se han identificado.

En cualquier caso, la relación entre esta alteración génica y la evolución de los pacientes ha sido estudiada por diferentes grupos (Ambros⁶⁴

y cols; Caron⁵⁰ y cols) y hoy en día se observa en un 30-35% de los tumores neuroblásticos y asociada a otros datos de alto riesgo como edad mayor de 1 año, estadio avanzado y amplificación de MYCN.

Aunque sigue siendo controvertido su poder pronóstico independiente, al ir asociada a otras variables como N-Myc, en 1996, Caron⁵⁰ y cols. postularon que habría dos tipos de deleciones: una deleción corta, no asociada a N-Myc y heredada por línea materna y otra de mayor tamaño, asociada a N-Myc y heredada al azar. Además, demostraron mediante un análisis multivariante, que el valor pronóstico de la deleción 1p era superior al de N-Myc e independiente de la edad y estadio, puesto que las curvas de Kaplan-Meier de Supervivencia Libre de Acontecimientos (SLA) a 3 años fueron de un 12% para aquellos con LOH en el cromosoma 1 y 75% para aquellos con un cromosoma íntegro. Sin embargo, no parecía tener efecto significativo sobre la supervivencia global. De ese modo, concluyeron que el conocimiento de la integridad de 1p podría ser útil en la predicción de recidivas.

También Ambros y cols⁶⁴ demostraron que la integridad del cromosoma 1 y las células casi-triploides son requisitos genéticos para la maduración espontánea del NB.

Por todo ello, actualmente, en neuroblastomas localizados (1,2) y en estadios 4s, la deleción 1p permite identificar a un subgrupo de pacientes, generalmente sin N-Myc ni otros factores desfavorables, como enfermos de

alto riesgo (SLE a los 3 años del 34% para aquellos con LOH 1p frente a 100% para aquellos sin LOH).

1.2.3.3.- Pérdida de heterocigosidad en el brazo largo del cromosoma 11 (11q):

Aunque la delección 1p tuvo mucha importancia al final de los años 90, la descripción de la delección 11q lo ha sustituido actualmente en importancia, debido a que el primero suele asociarse a la amplificación N-Myc, que ya estarían incluidos en grupos de mayor riesgo, beneficiándose por tanto de la intensificación terapéutica que ello conlleva. Por otro lado, el 11q permite re-estratificar a los paciente sin N-Myc, que recibirían menos tratamiento, permitiendo la identificación de aquellos con más riesgo, correspondiendo generalmente a niños más mayores y con evolución más tórpida.

Attiyeh y cols⁶⁵ estudiaron la pérdida de heterocigosidad para 1p36 (1p36 LOH) y 11q23 (11q23 LOH) en 915 muestras de pacientes con neuroblastoma registrados en el COG, identificando un subgrupo con de pacientes con pérdida de heterocigosidad desbalanceada, es decir, pérdida de 11q, pero no de 11p (Unb11q LOH); demostrando que Unb11q LOH y 1p36 LOH son factores que se asocian de forma independiente a un peor pronóstico en los pacientes con Neuroblastoma. La delección 1p fué identificada en 209/898 tumores (23 %) y 11q en 307/913 (34 %). Unb11q LOH se encontró en 151/307 tumores con 11q23 LOH (17% del total de la cohorte). Hubo una fuerte asociación entre 1p36 LOH, 11q23 LOH, y unb11q LOH y tumors con

características de alto riesgo ($P < 0.001$). 1p36 se asoció con ($p < 0.001$), pero 11q23 LOH y unb11q LOH no ($p < 0.001$ y $p = 0.002$, respectivamente). Los casos con unb11q LOH se asociaron a una supervivencia libre de eventos y supervivencia global a los 3 años de 50,5% y 66,5% respectivamente, comparado con 74,2 % y 83,2 % entre los casos sin unb11q LOH ($p < 0.001$ para ambas comparaciones). En un análisis multivariante, unb11q LOH se asoció de forma independiente a una disminución de la supervivencia libre de eventos ($P = 0.009$) en toda la cohorte, y ambos 1p36 LOH y unb11q LOH se asociaron de forma independiente a una disminución de la supervivencia libre de progresión en el subgrupo de pacientes con características de bajo y riesgo intermedio ($P = 0.002$ y $P = 0.02$, respectivamente).

Caren et al⁶⁶ realizaron un análisis de las aberraciones cromosómicas que determinaban un peor pronóstico en NB, especialmente en aquellos tumores sin amplificación N-Myc. Analizaron 165 tumores, comparando los grupos de alto riesgo, definidos por la amplificación N-Myc ($n = 37$) y la delección 11 q ($n = 21$). La edad media de los pacientes al diagnóstico fue de 21 meses para aquellos que presentaban N-Myc, comparado con 42 meses para los que no la presentaban. El tiempo medio de supervivencia tras el diagnóstico fue de 16 meses y 40 meses respectivamente. La supervivencia global a los 8 años fue de 35% en ambos grupos. N-Myc y 11q fueron casi mutuamente excluyentes, solo hubo un caso en el que ambas aberraciones estaban presentes de forma concomitante. También el número de aberraciones segmentarias fue diferente, ya que en el grupo N-Myc había una

media de 4 aberraciones, comparado con 12 en el grupo de 11q. El incremento de la frecuencia de roturas cromosómicas en el grupo de delección 11q hace presuponer una mayor inestabilidad (H2AFX, localizado en 11q23.3 es un gen de inestabilidad cromosómica que se encuentra en la región de la delección 11q). Además, en el grupo de aberraciones segmentarias no relacionadas con N-Myc o del 11q, el grupo con ganancia 17q tuvo peor pronóstico.

1.2.3.4.- Ploidía:

El contenido de ADN tumoral y la ploidía permanecen constantes a pesar del tratamiento y se relacionan también con el pronóstico. Ya en 1984 Look et al⁶⁷ observaron que el contenido de ADN elevado se asociaba con estadios menos avanzados de la enfermedad, mientras que tumores con un contenido de ADN “ normal” (diploide o tetraploide) se presentaban con un estadio más avanzado y peor respuesta al tratamiento.

Los estudios de Look et al⁶⁸ revelaron en 1991 que la amplificación del gen N-Myc estaba presente significativamente en los tumores diploides y en la enfermedad avanzada, mientras que la hiperdiploidia estaba asociada con larga supervivencia libre de enfermedad en lactantes y niños jóvenes. Hayashi et al^{49,69}, distinguían tres niveles de ploidía: pseudodiploide, pseudotriploide y pseudotetraploide, reseñando que las anomalías estructurales cromosómicas como la delección de 1p eran mucho más frecuentes en tumores diploides y tetraploides; además, la amplificación N-Myc estaba restringida al grupo

diploide. De ese modo, la ploidía se correlacionaba con la edad, el estadio, la amplificación N-Myc y la supervivencia, estando la pseudotriploidia asociada a una evolución favorable⁴⁸.

En pacientes menores de un año de edad, los tumores hiperploides se asociaban con un tumor localizado y mayor supervivencia a largo plazo, pero los tumores diploides con un fracaso terapéutico precoz. Esta relación también se mantenía en pacientes entre 12 y 24 meses, y en cualquier estadio, siendo más evidente en estadio D (equivalente al 4 del INSS) y no se daba en el Ds (equivalente al 4s del INSS). Pero, la ploidía no predecía la evolución en pacientes mayores de 2 años con estadios avanzados.

1.2.3.5. Alteraciones cromosómicas segmentarias:

Las alteraciones cromosómicas segmentarias, como la delección de cromosomas 1p, 3p, 11q y ganancia de 1q, 2p y 17q se observan frecuentemente en el neuroblastoma, y algunas de ellas han demostrado tener impacto pronóstico. Suelen asociarse a pacientes mayores, con tumores en estadios más avanzados y peor pronóstico. Además, se ha observado que puede existir una evolución o acumulación de alteraciones cromosómicas, encontrándose en los tumores en recaída en los que no existían al diagnóstico, especialmente en aquellos que eran localizados y se hacen metastásicos.

Schleiermacher et al^{70,71}, encontraron un 29,6% de tumores en los que coexistían las alteraciones numéricas y las segmentarias, comprobándose su mal pronóstico, igual que en los pacientes con alteraciones sólo segmentarias.

1.2.3.6. Gen Kinasa de linfoma anaplásico(ALK)

Las mutaciones germinales del gen ALK pueden explicar algunos neuroblastomas hereditarios. Mosse et al⁷² identificaron alteraciones 2p23-24 en familias con neuroblastoma, y después de estudiar 194 neuroblastomas de alto riesgo, en el 12,4% encontraron mutaciones a este nivel, concluyendo que la mutación ALK es la causa más importante de neuroblastoma familiar y que esta mutación germinal o adquirida puede ser utilizada como target en el tratamiento.

La mutación ALK aparece tanto en pacientes de bajo riesgo como en los avanzados⁷³.

1.2.3.7. Del 11 q:

Schleiermacher⁷⁴ G y colaboradores realizaron un estudio mediante CGH en 147 muestras de pacientes con neuroblastoma en los que no había amplificación N-Myc, demostrando que la existencia de ganancias o pérdidas de cromosomas enteros (grupo 1) se asociaba más a pacientes menores de 12 meses y enfermedad localizada ($p < 0.0001$); así como las de tipo parcial o grupo 2 (incluyendo ganancia 17q) se asociaban a un aumento del riesgo de recaída, incluso en pacientes con enfermedad localizada ($p = 0.007$). Aunque son necesarios más estudios, concluyeron que el perfil genómico realizado mediante CGH en NB localizados sin amplificación N-Myc, puede ser utilizado para un mejor manejo terapéutico de estos pacientes.

El criterio INRG posibilita la clasificación de casi todos los tumores neuroblásticos, pero no considera los datos de estos estudios pangenómicos más actuales, basados en array-CGH. En realidad, el INRGSS considera el estatus del cromosoma 1p o 11q, pero no alteraciones segmentarias que ocurren en otras regiones cromosómicas alteradas en neuroblastoma. Sin embargo, los análisis adicionales de los datos del INRG claramente demuestran que la existencia de alteraciones segmentarias de los cromosomas 1p, 11q y/o 17q pueden combinarse para definir un perfil genómico segmentario con un impacto pronóstico mayor que el estatus aislado de 1p o 11q (*Schleiermacher, Couturier, oral presentación ANR 2008 Congreso; Tokyo, Japón*). Hasta hace poco, ninguna técnica era suficientemente fiable y robusta ni era fácilmente accesible para definir el estatus de la mayoría de alteraciones cromosómicas recurrentes en un entorno clínico. La llegada de la técnica de MLPA ahora posibilita el análisis de todos los tumores neuroblásticos para definir un perfil multi-genómico cuando el array-CGH no esté disponible. Este hallazgo ha contribuido a la mejor estratificación de los pacientes por grupo de riesgo en el momento del diagnóstico, aplicándose en el nuevo protocolo europeo de neuroblastoma de bajo riesgo e intermedio (LINES).

1.2.3.8.- Otros factores pronósticos:

- Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) y sus receptores (TRK):

La TRK es una tirosin-kinasa transmembrana que actúa como receptor para el factor de crecimiento nervioso o neurotrofina. Anormalidades en las vías de regulación del Factor de Crecimiento Nervioso pueden contribuir a la formación o progresión del neuroblastoma: así, aquellos en los que falta el receptor de alta afinidad para el NGF (TRK-A) progresan rápidamente. Sin embargo, una alta expresión de este gen está asociada con estadios localizados de enfermedad y se ha descrito como marcador de buen pronóstico.

Nakagawara⁴² y colaboradores, demostraron la ausencia de expresión del gen TRK-A en neuroblastomas avanzados y la alta expresión del mismo en aquellos con una evolución favorable. Se ha demostrado también una relación inversa con la N-Myc. La mayor parte de estudios emplean métodos de Biología Molecular, analizando la expresión del mRNA del TRK-A en tumores neuroblásticos y diferentes líneas celulares de neuroblastoma.

Donovan y cols⁷⁵ comunicaron la utilidad del estudio de estos receptores mediante inmunohistoquímica para el diagnóstico de los tumores de células pequeñas, redondas y azules de la infancia. Posteriormente otros grupos (Dominici⁷⁶,

Tanaka⁷⁷, Kramer⁷⁸) los han estudiado en Neuroblastoma mediante estas técnicas.

- CD44:

CD44 es una glicoproteína de superficie que interviene en la adhesión celular. Se expresa en gran variedad de tejidos hematopoyéticos y no hematopoyéticos. La forma más común o estándar en el sistema hematopoyético tiene un peso molecular entre 80 y 90 Kilodaltons, otras variantes participan en el proceso de diseminación metastática y se han encontrado en una gran variedad de tumores, relacionándose con mal pronóstico.

Se ha estudiado la presencia de la variante estándar del CD44⁷⁸ en NB, mediante métodos inmunohistoquímicos. La mayor parte de tumores procedentes de enfermos con estadios 1, 2, y 3 la expresan con gran intensidad, así como todos los tumores 4s y ganglioneuromas. En cambio, sólo un pequeño porcentaje de estadios 4 la expresan. Se ha visto también que existe una relación inversa entre la amplificación del oncogénN-Myc y la expresión de CD44. Así que a pesar de que en otros tumores la expresión de CD44 es considerada un factor de mal pronóstico, en los tumores neuroblásticos se ha descrito en estadios avanzados de enfermedad como baja o ausente y se considera un marcador de buen pronóstico.

- Gangliósidos:

En la superficie de la célula de NB se encuentran diferentes tipos de gangliósidos, frente a los cuales se han desarrollado anticuerpos monoclonales, que pueden ser utilizados con fines diagnósticos y terapéuticos.

En 1985, Ladisch y cols⁷⁹ demostraron que dichos gangliósidos (GD2) se pueden encontrar en el suero de niños con NB y sus niveles pueden relacionarse con el pronóstico de los mismos (niveles altos indicarían un mal pronóstico).

- Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) y otros péptidos:

Neuroblastomas y ganglioneuromas frecuentemente producen diferentes péptidos, como el Péptido intestinal vasoactivo (VIP) , Neuropéptido Y y somatostatina. Estos péptidos pueden causar síntomas al liberarse, pero también influyen en el crecimiento tumoral y la diferenciación de una forma autocrina y paracrina. Su análisis en plasma y tejido tumoral es útil para el diagnóstico, juicio pronóstico y seguimiento clínico de niños con estos tumores.

La pancreostatina es un péptido intestinal regulador derivado de la cromogranina A, que es la proteína soluble de las vesículas de almacenamiento de catecolaminas en las células adrenérgicas. Se han detectado niveles elevados de la misma en plasma e inmunorreactividad mediante RIA e inmunohistoquímica, en muestras de pacientes con tumores localizados, tumores en vías de diferenciación y con buena evolución clínica. Análogos sintéticos de la cromogranina A se están utilizando con fines diagnósticos e incluso terapéuticos. Schilling⁸⁰ y cols en 1991 demostraron que los tumores triploides son los que presentan mayor expresión de receptores de somatostatina, mientras que en tumores con deleciones del cromosoma 1 suele estar ausente.

- P-glicoproteína y gen de la Multirresistencia a Drogas (MDR1):

Chan y cols⁸¹ demostraron que la expresión de P-glicoproteína podía ser indicativo de fallo terapéutico precoz en neuroblastomas diseminados.

En el cromosoma 16p13 existe otro gen implicado en los fenómenos de resistencia a fármacos: es el gen de la proteína asociada a resistencia a multidrogas (MRDP) que codifica una glicoproteína de membrana que determina la resistencia a drogas como los alcaloides de la vinca, antraciclinas y epipodofilotoxinas. En 1996 Norris y colaboradores⁸² encontraron un aumento de su expresión en neuroblastomas con N-Myc amplificado y disminución de su expresión en neuroblastomas que se han diferenciado “in vitro”. En este estudio correlacionaron dichos hallazgos con la supervivencia de los pacientes, observando que aquellos con altos niveles de MRP presentaban peor supervivencia, manteniéndose la significación estadística al corregir para N-Myc. La sobreexpresión del gen de resistencia a multidrogas asociado a proteínas (MRP) se ha relacionado con la amplificación de N-Myc, con la resistencia a la quimioterapia^{83,84} y como indicador pronóstico independiente del estado del gen N-Myc.

- Angiogénesis:

En 1996 Meitar⁸⁵ y colaboradores demostraron que un índice vascular (número de vasos por mm² de área tisular) superior a 4 se correlacionaba con enfermedad diseminada ($p=0.006$) y supervivencia pobre ($p<0.0001$), además,

también se asociaba con amplificación del oncogén N-Myc ($p=0.02$) e histología desfavorable ($p = 0.02$).

Cañete et al⁸⁶ estudiaron la angiogénesis tumoral en 69 muestras de neuroblastomas utilizando métodos morfométricos. Para ello utilizaron una inmunoperoxidasa con marcador anti-CD34. Las células endoteliales resultaron ser más prominentes en el neuroblastomas indiferenciado, no encontrando diferencias entre los diferentes grupos de riesgo: Edad, estadio, histopatología, TRK-A, P-glicoproteína, N-Myc. La supervivencia global fue de 75%, y la libre de eventos de 55% a los 50 meses. Las características angiogénicas de los tumores no influyeron en la existencia o no de recaídas locales o metástasis.

Drozynska et al⁸⁷, en 2006 estudiaron la expresión de VEGF y Flk-1 en 82 pacientes con neuroblastoma, encontrando que no había diferencias significativas en cuanto a la densidad microvascular y la expresión de VEGF en pacientes que habían recibido quimioterapia respecto a los que no. Sin embargo, sí encontraron mayor actividad angiogénica en pacientes menores, con tumores menos diferenciados y en aquellos tumores localizados en la glándula suprarrenal.

- Apoptosis y oncogén bcl2:

El oncogén bcl2 es un protooncogén que promueve el crecimiento celular al inhibir la muerte celular programada (apoptosis), una forma de desaparición celular que tiene lugar durante la neurogénesis normal.

En 1993, Castle y colaboradores⁸⁸ estudiaron un conjunto de 40 neuroblastomas, utilizando técnicas inmunohistoquímicas y un anticuerpo monoclonal frente a bcl2: 16 fueron positivos y se correlacionaron con histología desfavorable, amplificación del N-Myc y menor supervivencia. También Mejía y colaboradores⁸⁹ en 1998 relacionaron la sobreexpresión de la proteína bcl-2 en 87 casos de neuroblastoma con uno o más factores de mal pronóstico (Shimada desfavorable, amplificación del N-Myc, expresión de PCNA elevado).

- Antígeno de Proliferación Nuclear (PCNA):

Es un marcador de proliferación celular, de localización nuclear, también estudiado en el neuroblastoma. Este antígeno, es un compuesto auxiliar de la ADN polimerasa que está implicado en fenómenos de replicación y reparación del ADN. Por citometría de flujo, se ha visto que la población de células que expresan PCNA se superpone a la población celular en fase S a fase M. El grupo alemán⁹⁰ y el japonés⁹¹ han demostrado que se puede utilizar como factor pronóstico y que está ligado a la proliferación del N-Myc. Rudolph y colaboradores⁹² en 1997, estudiaron el significado pronóstico de la expresión de PCNA en 101 casos de Neuroblastomas: está íntimamente ligado al estadio (estadio 4s presenta muy baja expresión de PCNA) y grado tumoral. En el caso de los ganglioneuroblastomas, aquellos de tipo compuesto presentan una mayor capacidad proliferativa, reflejada por una mayor expresión de PCNA.

Aunque este grupo no estudia la relación de la expresión de PCNA con la amplificación del oncogén N-Myc, Kawasaki⁹¹ y colaboradores en 1995, sí lo hacen y encuentran una relación muy importante entre el índice de PCNA, amplificación del oncogén N-Myc y pronóstico ($p < 0.01$).

- Coamplificación del gen DDX1 y N-Myc:

El gen DDX1 es un gen de la familia ARN helicasa, que participa en el inicio de la transcripción de ADN a ARN, alteración de la estructura secundaria de ARN, unión del ARN y splicing. Algunos de los genes de esta familia se han implicado en la tumorigénesis de los linfomas.

George y colaboradores⁹³ demostraron que la co-amplificación del gen DDX1 y N-Myc separaba un subgrupo dentro de los enfermos con N-Myc amplificado, con mayor tendencia a recaer, siendo la recaída más precoz que en los pacientes con N-Myc amplificado sin amplificación DDX1. (4.1 ± 1.4 , $n = 8$ meses vs 19.6 ± 4.5 , $n = 17$) ($P = 0.04$).

- Telomerasa:

El acortamiento progresivo de los telómeros está implicado en la senescencia celular y apoptosis. Una alta concentración de telomerasas están asociadas con hallazgos clínicos y genéticos desfavorables y con menor probabilidad de supervivencia. Reynolds y cols⁹⁴ estudiaron por Northern Blot la expresión de la telomerasa en Neuroblastomas no tratados, encontrando una expresión superior a 33 (control positivo=100) en el 41% de los tumores

estudiados. La expresión de la misma aumenta al aumentar el estadio. Hiyama y colaboradores⁹⁵ en 1997 relacionaron la expresión alta de actividad de la telomerasa con factores genéticos desfavorables (N-Myc, LOH 1p).

- Expresión de p53 y su proteína:

Aunque se conoce la ausencia de mutaciones en p53 en estos tumores, algunos autores como Tweddle⁹⁶ han demostrado la existencia de expresión de la proteína nuclear de p53 mediante inmunohistoquímica y la han correlacionado con una evolución adversa.

- Mutaciones en ATRX:

Cheung y col⁷³ encontraron esta mutación en el 44% de los pacientes adolescentes o jóvenes adultos con neuroblastoma metastásico. Estos resultados sugieren que la inactivación de esta vía se correlaciona con una mayor edad al diagnóstico, dando lugar a un tumor de crecimiento lento pero progresivo. Esta mutación podría ser utilizada como diana terapéutica en estos pacientes.

2.- CLÍNICA:

Las manifestaciones clínicas del NB dependen del origen y grado de extensión del tumor primario y/o las metástasis. La mayoría de los diagnósticos

se realizan en menores de 5 años, siendo rara su detección después de los 10 años.

La localización más frecuente es el abdomen (69%). La glándula adrenal se encuentra afectada en el 40% de los niños mayores, siendo sólo el 25% en los lactantes. En éstos últimos, es más frecuente la localización torácica y cervical de los tumores primarios, presentándose como dificultad respiratoria en algunos casos.

La forma de presentación de los tumores abdominales puede ser la distensión abdominal, molestias o masa abdominal indurada y fija, que puede ser incluso un hallazgo casual del pediatra o los propios padres. El compromiso hepático es masivo y frecuente en lactantes con enfermedad estadio 4s, pudiendo llegar a producir compromiso respiratorio. Si la tumoración abdominal es grande, puede comprimir, afectando al retorno venoso y linfático de las extremidades inferiores, dando lugar a edema de piernas y escroto o provocar hipertensión arterial mediada por renina por compresión vascular renal.

Es poco común el desarrollo de taquicardia, flushing facial e hipertensión arterial mediada por liberación de epinefrina, pero sí existen descritos casos de crecimiento repentino y hemorragia espontánea del tumor con gran distensión abdominal y dolor.

Los neuroblastomas de localización torácica (15%) suelen diagnosticarse accidentalmente cuando se practica una radiografía de tórax por otra causa, pudiendo ser asintomáticos o provocar tos crónica hasta llegar

a producir obstrucción mecánica con síndrome de vena cava superior. Las masas cervicales (5%) y las lesiones torácicas altas producen síndrome de Horner con ptosis unilateral, miosis, anhidrosis y enoftalmos.

Los tumores paraespinales en región torácica-abdominal y pélvica, cuya edad de presentación más frecuente es en lactante, pueden llegar a extenderse por los forámenes intervertebrales, produciendo sintomatología compresiva de raíces nerviosas y médula espinal, con paraplejia y disfunción autonómica, y pérdida de control de esfínteres (de difícil diagnóstico en estas edades en las que todavía existe incontinencia fisiológica).

Existe un 5% de neuroblastomas que se alojan en ganglios simpáticos pélvicos y en un 1% de pacientes, el tumor primario no se identifica.

La extensión metastásica de los neuroblastomas ocurre mediante vía hematológica y linfática, estando presentes en el 51% de los niños al diagnóstico según series españolas, siendo la sintomatología también la derivada de los órganos diana afectados.

La infiltración de huesos periorbitarios y retrobulbar produce proptosis y equimosis periorbitaria ("hematoma en anteojos") siendo frecuente la presencia de masas a otros niveles del cráneo, que invade en mayor o menor medida el espacio epidural.

La infiltración de médula ósea se puede manifestar como dolor óseo (especialmente a la deambulación o en forma de irritabilidad en lactantes), insuficiencia medular con disminución del recuento de las 3 series sanguíneas en sangre periférica, y fiebre.

A nivel cutáneo, en lactantes con neuroblastoma grado 4s pueden observarse nódulos indurados azulados, muy característicos aunque poco frecuentes.

Es común también, que pueda presentarse enmascarado con síntomas constitucionales inespecíficos como el fallo de medro, irritabilidad, fiebre tumoral y sudoración excesiva como reflejo de un estado hipercatabólico, especialmente en casos con enfermedad avanzada.

Raramente se disemina hacia pulmón o cerebro, y cuando lo hace, habitualmente, es en el contexto de enfermedad terminal.

En los adolescentes tiene un curso indolente, aunque su distribución es similar a la de los más pequeños. En estas edades, la sensibilidad a la quimioterapia es menor y suelen presentar estadios avanzados^{97,98}, sin amplificación del gen N-Myc pero con cariotipos diploides y cambios cromosómicos estructurales (especialmente la del 11q). Además, suelen ser recurrentes y con un pronóstico ominoso a largo plazo.

Es característico del neuroblastoma, aunque no frecuente, que cursen con síndromes paraneoplásicos:

- Síndrome opsoclono-mioclono: Síndrome paraneoplásico que más frecuentemente se ha asociado al neuroblastoma, aunque el 50% de los síndromes opsoclono-mioclono no se acompaña de un neuroblastoma. Se trata de movimientos oculares rápidos, ataxia y mioclonías que se llegan a observar en el 2-4% de pacientes con este tumor y puede persistir incluso tras tratar el tumor. Suele

presentarse en formas localizadas sin amplificación del gen N-Myc y buen pronóstico.

La etiología parece inmunológica, debido a la existencia de una reactividad cruzada de los anticuerpos anti-tumorales con el cerebelo. En el 70-80% de los casos se producen déficits neurológicos importantes, con retraso motor-cognitivo, déficit de aprendizaje y anomalías del comportamiento. Actualmente existe controversia sobre el tratamiento, aunque en la mayoría de los casos se utilizan corticoides, inmunoglobulinas intravenosas y quimioterapia (CFM) si no cumplen criterios para recibir quimioterapia convencional.

- Tumores secretores de VIP: Hasta el 7-9% pueden secretar VIP, dando lugar a una diarrea acuosa intratable, que provoca hipokaliemia, hipocalcemia y deshidratación. Los síntomas suelen resolverse tras la resección quirúrgica del tumor, y se ha asociado más frecuentemente a ganglioneuromas y ganglioneuroblastomas, que son tumores histológicamente más maduros.

3.- PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS:

Las características de la imagen en el tumor neuroblástico dependerán de la técnica utilizada, y aunque el ganglioneuroma suele ser un tumor localizado, relativamente homogéneo, el tipo histológico no puede ser

discriminado mediante la imagen, siendo necesario el estudio anatómopatológico.

Para las localizaciones abdominal y pélvica, que son las más frecuentes, la ecografía es la principal modalidad utilizada al inicio del diagnóstico en pediatría, debido a su disponibilidad amplia, poca invasividad y no usar radiaciones ionizantes. Esta técnica junto con las imágenes Doppler permiten un análisis preciso de la relación del tumor con los órganos y vasos adyacentes. El hígado también se evalúa bien con ecografía en la infancia. En los recién nacidos, también se puede utilizar para describir la afectación intraespinal. Sin embargo, esta técnica está asociada a importantes limitaciones: baja reproducibilidad entre observadores, limitación en la evaluación de tumores muy calcificados a causa de sombra acústica y una gran limitación en el examen retrospectivo de los datos que es obligatorio para los ensayos clínicos. Por lo tanto, debe realizarse una resonancia magnética o un TAC al diagnóstico para una estadificación adecuada y precisa. El TAC se reconoció inicialmente como una técnica útil para el diagnóstico y evaluación de NBs, y está ampliamente disponible en los hospitales. Los aparatos multicorte permiten adquisiciones rápidas sin artefactos de movimiento, reduciendo la necesidad de sedación en la mayoría de las situaciones. Las extensiones intraespinales de los tumores también se visualizan bien y se pueden hacer reconstrucciones multiplanares post-tratamiento. Sin embargo, el TAC requiere la inyección intravenosa de contraste de yodo para aumentar el contraste de tejidos blandos y para evaluar las relaciones entre el tumor y

los vasos adyacentes. Además, se asocia con una exposición a la radiación significativa y es bien conocido que los niños tienen una mayor sensibilidad a las radiaciones ionizantes⁹⁹

La resonancia magnética se ha reconocido , como el método de imagen más útil¹⁰⁰, incluso superior al TAC porque tiene una resolución de contraste más alto y no utiliza la radiación ionizante¹⁰¹.

No hay consenso en la literatura radiológica sobre la necesidad de inyección de contraste con gadolinio para evaluar las extensiones de NB. Las imágenes ponderadas en T1 y T2 (WI) ofrecen realmente excelentes contrastes de tejidos y puede lograrse una imagen adecuada de los vasos sin el uso de contraste¹⁰²

Las principales limitaciones de la RM son la disponibilidad local en algunos países y, en comparación con la TAC, la necesidad de sedación en niños pequeños debido al tiempo necesario para la adquisición de las secuencias. La RM es la modalidad recomendada para investigar la extensión intraespinal de los tumores primarios paraespinales debido a la excelente visualización de la médula espinal, las raíces nerviosas y los espacios subaracnoideos

Actualmente se ha llegado a un consenso sobre el uso de las diferentes técnicas o modalidades de imagen (Guidelines for imaging and staging of neuroblastic tumors: Consensus report from the international neuroblastoma risk group Project. Brisse et al2011¹⁰³):

3.1. Estudio del tumor primario:

- Radiología Simple:

Puede ser la primera prueba en realizarse en caso de clínica osteo-articular, pero no proporciona información precisa acerca de la extensión tumoral. Hallazgos más frecuentes son:

- Efecto masa o visceromegalias.
- Calcificaciones patológicas, visibles con esta técnica en el 30% de los casos que las tienen.
- Afectación ósea:
 - Por infiltración tumoral: se manifiesta como áreas radiolucetas por debajo de las metafisis; en el caso del cráneo se ve un ensanchamiento de suturas debido a metástasis durales. En otros casos se aprecian áreas líticas o esclerosas.
 - Por erosión o remodelación por masas adyacentes; en caso de afectación de la columna se manifiesta como erosión de cuerpos vertebrales o de pedículos (cuando hay extensión intrarraquídea); si se afectan las costillas, se aprecia una separación entre ellas.

- Ecografía:

Excelente para el diagnóstico¹⁰⁴, inocua, rápida y bajo coste. Sirve incluso en caso de masas prenatales¹⁰⁵.

Ante la sospecha de un tumor pélvico o abdominal en un niño, la ecografía es de elección por su inocuidad¹⁰⁶ y disponibilidad., además, es de elección para estudiar el hígado. La imagen típica consiste en una masa heterogénea, hiperecogénica con áreas hipoecoicas en algunos casos (que corresponden a necrosis o hemorragia) y ecos puntiformes o calcificaciones. En el caso de que no sea órgano-dependiente, es decir, cuando se encuentran mal delimitadas respecto a órganos vecinos, rodeando o infiltrando vasos, se puede usar el estudio Doppler para diferenciar desplazamiento por compresión o invasión de dichas estructuras vecinas.

En neonatos, puede utilizarse incluso para el estudio de la afectación intraespinal. No obstante, la Ecografía tiene importantes limitaciones como la baja reproductibilidad interobservador, dificultad para el estudio de tumores muy calcificados por la sombra acústica, y restricciones en cuanto a su revisión retrospectiva. Además, no es suficiente para la planificación del tratamiento, por ello, es necesaria una RNM o TAC para el estudio diagnóstico y estadificación inicial.

- Tomografía computarizada:

Tanto la TAC como la RM son modalidades de elección para el estudio de extensión y la estadificación¹⁰⁷ y seguimiento del neuroblastoma, dependiendo de la localización del tumor, pero la tomografía computarizada tiene como factor limitante el acúmulo de radiación ionizante y el riesgo que ello conlleva de desarrollar segundos tumores.

En el cráneo, las lesiones más frecuentes son las metástasis durales, que captan contraste y desplazan el parénquima subyacente. En las metástasis óseas, se observa engrosamiento del díploe y erosiones corticales con reacción perióstica. La afectación del ala mayor del esfenoides es característica pero poco frecuente, y produce destrucción e invasión infraorbitaria. En la afectación parenquimatosa se observan masas heterogéneas que pueden contener sangrado o calcificaciones y que captan en anillo o de forma heterogénea.

En el cuello, la RM delimita mejor las estructuras afectas.

En tórax, el TAC es de utilidad si existen metástasis pulmonares, más difíciles de detectar con la RM. Pueden verse nódulos o áreas de consolidación parenquimatosa. Puede presentarse con masas paravertebrales, cuya extensión intrarraquídea se delimita mejor con la RM. Más del 50% de los tumores torácicos tienen calcificaciones visibles.

En abdomen y pelvis, se presenta como una gran masa con calcificaciones y áreas de hemorragia que capta contraste de forma irregular. Puede desplazar órganos vecinos o incluso infiltrarlos. El patrón de desplazamiento orienta sobre el origen del tumor: si es suprarrenal, desplaza el riñón inferiormente, si es paravertebral lo desplaza anteriormente.

Puede comprimir o invadir los grandes ejes vasculares, provocando su obstrucción o trombosis. En caso de afectación hepática, la administración de contraste permite ver la captación heterogénea del mismo o los nódulos múltiples en algunos casos.

- **Resonancia Magnética:**

Aunque la RM puede no ser necesaria para un diagnóstico inicial, es de gran utilidad en el seguimiento¹⁰⁰, ya que diferencia tumor residual o recidiva de fibrosis o cicatrices postquirúrgicas. No produce radiaciones ionizantes, por lo que se evita la exposición en el menor. La limitación de la técnica es su coste, que puede precisar sedación y que no está disponible en todos los centros.

Tiene mayor capacidad de delimitación de la extensión en localizaciones complejas como el conducto raquídeo, ya que valora los agujeros de conjunción y la compresión o invasión de las estructuras del conducto raquídeo. Por otra parte, la afectación vascular también queda delimitada, especialmente si se inyecta contraste con gadolinio, identificándose los vasos rodeados de tumor con vacío de señal en su interior, indicando la existencia de flujo que descarta invasión.

El tumor suele comportarse como hipointenso en T1, hiperintenso en T2 y con captación de contraste patente, aunque irregular. Si existen áreas hemorrágicas, se comportan como hiperintensos en T1 y las áreas con calcio se manifiestan con baja señal en todas las secuencias.

3.2. Estudio de las metástasis:

- **Médula ósea y hueso:**

Las metástasis a distancia de neuroblastoma¹⁰⁸ suelen localizarse en médula ósea (70%) o hueso (55%). La médula ósea se debe estudiar según

las recomendaciones del INSS: se recomienda siempre que sea posible realizar aspiraciones de médula ósea (de dos lugares distintos) para evaluar la morfología y los trépanos de médula ósea (de dos lugares distintos). Se deben realizar por personal experimentado, ya que es complicado obtener especímenes satisfactorios en niños. Si no se obtienen los trépanos, se recomienda realizar 4 aspirados.

El TAC¹⁰⁹ ha demostrado una baja sensibilidad para el diagnóstico de las metástasis óseas, en comparación a la ¹²³I-MIBG o la gammagrafía con ^{99m}Tc-Difosfonatos, pero sí puede ser de ayuda para diferenciar una metástasis de médula ósea vs hueso cortical en caso de metástasis osteomedular que capta en el estudio con ¹²³I-MIBG.

El papel de la Resonancia Magnética¹⁰⁰ (RM) de cuerpo entero combinando secuencia T1 con y sin contraste para el estudio de la infiltración de médula ósea todavía no está definido en el neuroblastoma, aunque ha demostrado gran sensibilidad^{110,111}. La principal limitación es la baja especificidad de la RMN, además, no existen resultados en cuanto a su uso como estudio de la respuesta tumoral, aunque la RNM de difusión es una herramienta prometedora, ya que el neuroblastoma ha demostrado que restringe la difusión debido a su alta densidad celular.

De acuerdo con el INRGSS, la captación de la MIBG en el esqueleto es una condición para considerar que un paciente tiene un neuroblastoma estadio M, incluso en niños < 12 meses. Sin embargo, SIOOPEN¹¹² ha demostrado recientemente, que esta captación debe de ser confirmada por

rayos-X o TAC para considerar si hay una metástasis verdadera en niños < 12 meses. Si la metástasis ósea no se confirma por radiología, el niño debe de ser observado, como en el estadio Ms, con un pronóstico de curación excelente (>95%).

- Otras localizaciones:

La afectación de ganglios linfáticos debe ser evaluada de forma precisa al diagnóstico ya que puede cambiar el estadio del paciente.

Las metástasis hepáticas y subcutáneas, más frecuentemente observadas en recién nacidos (síndrome de Pepper, estadio 4S o MS) pueden ser evaluadas con ecografía, TAC o RNM.

En el caso de las metástasis hepáticas, pueden manifestarse como nódulos focales o infiltración difusa (que se observa principalmente en los recién nacidos y a veces no se ve en el TAC al aumentar la atenuación parenquimatosa de forma uniforme, pero sí produce hepatomegalia).

Las metástasis pulmonares y pleurales, más comunes entre los pacientes con amplificación de N-Myc, son poco frecuentes, siendo su patrón en TAC inespecífico.

Aunque la enfermedad pleural está asociada con las tasas de supervivencia reducida en pacientes con enfermedad metastásica, su efecto sobre el pronóstico en caso de derrame pleural o ascitis aislada en pacientes con enfermedad loco-regional no está claro, y no se consideran criterios de riesgo definidos por imagen (IDRFs)

La metástasis en parénquima cerebral o meníngicas también son raras y se observan en las recaídas. Suelen verse como lesiones quísticas o hemorrágicas con calcificaciones.

4.- MEDICINA NUCLEAR (METAIODOBENCILGUANIDINA):

La I-MIBG es un análogo estructural de la guanetidina y la noradrenalina, que tiene una gran afinidad con la médula suprarrenal y el tejido nervioso adrenérgico. Una vez yodado con ^{131}I o ^{123}I , permite la obtención de imágenes de los tumores derivados del neuroectodermo, incluyendo neuroblastomas y feocromocitomas¹¹³, aunque otros tumores, como los paragangliomas, carcinomas medulares de tiroides, carcinoides tumores, los tumores de células de Merkel de la piel, y las metástasis de estos tumores, han mostrado captación de ^{123}I -MIBG¹¹⁴.

La aplicación de la gammagrafía con MIBG fue descrita ya en 1984 por Kimming B et al¹¹⁵. Su utilidad ha dejado de ser exclusivamente complementaria del resto de técnicas de imagen, para contribuir a la estadificación en las fases iniciales del diagnóstico y la valoración de la respuesta en los sucesivos controles¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Se le atribuye una especificidad del 95% y una sensibilidad de un 87-90% para detectar neuroblastomas primarios y secundarios. La sensibilidad¹¹⁹ para detectar-identificar puntos o sitios individuales de enfermedad es de alrededor del 80% y la sensibilidad en términos de estadificación es del 90-

95%. En los neuroblastomas diferenciados, como ganglioneuromas, es en los que presentan una tasa más alta de falsos negativos¹²⁰. En general, el valor predictivo positivo es del 98% y el valor predictivo negativo es del 70% en cuanto al diagnóstico del tumor primario¹²¹.

La gammagrafía con de ¹²³I-MIBG aumenta la precisión diagnóstica¹¹⁹, una vez realizados los habituales procedimientos diagnósticos de imagen, como la ecografía, la TAC o RM, que aportan una información anatómica superior, con detalles como los límites del tumor o su proximidad o invasión de órganos vecinos, muy necesarios para el planteamiento de la cirugía y para valorar la respuesta tras tratamiento quimioterápico o radioterápico.

También la MIBG juega un papel muy importante en aquellos casos en los que la biopsia no es practicable o el resultado es no concluyente, ya que proporciona una imagen funcional, no sólo del tumor sino también de la posible existencia de metástasis o tumor residual tras cirugía, además de valorar la respuesta tras tratamiento.

La alta afinidad del tumor también permite el uso terapéutico^{122,123} del compuesto marcado con ¹³¹I, tanto como terapia inicial¹²⁴ como formando parte del régimen de acondicionamiento, seguido de rescate con progenitores hematopoyéticos. Algunos autores han utilizado dosis progresivamente mayores, bien de la MIBG sola o combinada con topotecán o cisplatino para el tratamiento de recaídas o de pacientes con tumores resistentes a la quimioterapia de inducción estándar.(Yanik et al¹²⁵, Garaventa¹²⁶) y también como terapia inicial

Actualmente, el INRC19,20 (International Neuroblastoma Response Criteria) recomienda la utilización de la MIBG como procedimiento diagnóstico del tumor primario y valoración de la extensión de la enfermedad y afectación ósea.

El valor respectivo de la gammagrafía con ^{123}I -MIBG¹²⁷ y gammagrafía ósea con $^{99\text{mTc}}$ -Difosfonatos en pacientes con neuroblastoma fue muy controvertido en el pasado. Está claro que ni la gammagrafía con ^{123}I -MIBG ni la gammagrafía ósea con $^{99\text{mTc}}$ -Difosfonatos solas detectan todas las lesiones. Por lo tanto, la evaluación inicial debe incluir ambas exploraciones. En cuanto a la evaluación de la respuesta, la MIBG parece ser superior, tanto en el tumor primario como en las metástasis, ya que en la gammagrafía ósea se descubren con frecuencia captaciones anormales inespecíficas, sin captación de MIBG correspondiente. Sin embargo, la gammagrafía con $^{99\text{mTc}}$ -Difosfonatos tiene su papel en los casos en que el tumor primario no es MIBG ávido o si la cirugía ha sido previa a la realización de la MIBG. Su sensibilidad es del 70%- 78% y su especificidad del 1% para la detección de metástasis óseas^{20,103}. Su limitación es la gran captación fisiológica de las metáfisis en crecimiento de los niños, que puede ser malinterpretada como metástasis u ocultarlas.

En ciertas circunstancias, puede ser de ayuda utilizar otros marcadores en relación con MIBG. En caso de dificultades para diferenciar

entre la captación tumoral de MIBG y retención fisiológica del radiofármaco en la pelvis renal se puede utilizar, bien la furosemida para lavar la actividad de la pelvis renal o realizar una gammagrafía con ^{99m}Tc -DMSA/MAG3/DTPA para identificar el riñón. No es necesaria la sonda vesical salvo en casos particulares. Sin embargo, incluso en el neuroblastoma pélvico, la actividad de la vejiga es rara vez un problema. Se debe estimular que el niño (sobre todo si coopera) orine antes de adquirir la imagen.

En los casos en que existe incertidumbre en cuanto al sitio exacto de captación del radiofármaco ^{123}I -MIBG puede ser útil la realización/adquisición de un SPECT (tomografía por emisión de fotón único). El abdomen es el área donde con más frecuencia se produce esta incertidumbre: las lesiones en o cerca del hígado, así como cerca de la vejiga o cualquier otra área de captación fisiológica intensa son indicaciones para hacer imágenes SPECT. La viabilidad del SPECT¹²⁸ depende del niño y del equipo disponible (de cámara múltiple).

Según algunos autores¹²⁹, en estos casos de NB que no captan MIBG, la gammagrafía de emisión de positrones (PET-TAC) podría tener su indicación, ya que describe mejor la localización y el número de lesiones, permitiendo la mejor representación de la captación focal pequeña de difícil visualización, especialmente si se encuentra en zonas cercanas a órganos de intensa captación fisiológica como el hígado y la vejiga. Las herramientas de postprocesado también habilitan la fusión de SPECT e imágenes de TAC, mejorando la localización anatómica¹⁰³. Sin embargo, otros autores como

Gelfand¹³⁰ no creen que aporte información adicional de interés salvo en contados casos, en parte por la dificultad de realización en niños.

El papel de la Tomografía de emisión de positrones con 18F-fluorodeoxiglucosa (PET-18F-FDG)¹³¹ todavía está bajo investigación. La exposición a la radiación asociada y su coste más elevado, en comparación con la MIBG, puede explicar el uso hasta ahora limitado de esta técnica. Otra limitación es la alta absorción fisiológica de FDG en el cerebro, que puede ocultar metástasis a ese nivel.

- Radiofármaco:

La MIBG tiene una estructura muy parecida a la de un neurotransmisor, la norepinefrina, y a la de un inhibidor ganglionar, la guanitidina. Esta molécula de MIBG se marca o radioioda con ¹³¹I o ¹²³I.

¹²³I-MIBG es el radiofármaco de elección en niños ya que con él se obtienen imágenes de alta calidad. La energía de emisión gamma de 159 keV para ¹²³I es más adecuada para la imagen que la de 360 keV para ¹³¹I; las diferencias en términos de la carga de la radiación permite inyectar mayor actividad con ¹²³I en comparación con ¹³¹I. Además, los resultados de la gammagrafía con ¹²³I-MIBG están disponibles más rápidamente^{132,133}.

Se concentra en las vesículas neurosecretoras de las terminaciones presinápticas del SN simpático según dos mecanismos:

Una vía específica de los tumores de cresta neuronal, siendo un mecanismo de captación de aminas tipo-1, ATP-asa y Na-dependiente, de baja capacidad y alta afinidad.

Un mecanismo difusional, inespecífico y que no consume energía.

Una vez introducida en el citoplasma celular, permanece almacenada y se elimina por la orina sin alteraciones estructurales. La MIBG no se une a receptores postsinápticos ni es degradada por enzimas que catabolizan las catecolaminas.

Los canales del calcio pueden ser activados por la adrenalina, acetilcolina y nifedipino, el bloqueo de la liberación de la MIBG puede aumentar su retención; de este modo se mejora la visualización de las lesiones, o se incrementa la irradiación de tumores en los casos de administración terapéutica de ^{131}I -MIBG.

- Biodistribución

La MIBG se concentra en los gránulos neurosecretores de los tejidos derivados de la cresta neural, independientemente de su origen maligno o no. Presenta una distribución típica en todo el organismo, debido a la gran extensión del sistema simpático y a la ruta metabólica de eliminación fisiológica¹³⁴.

Se acumula normalmente en glándulas salivares, pulmón, miocardio (particularmente alta en los lactantes, en el resto se equilibra con la captación hepática), hígado, intestino, bazo y glándulas adrenales normales.

Los músculos esqueléticos, la mucosa nasal, el tracto urinario, la vesícula biliar también pueden mostrar una acumulación del marcador de intensidad variable.

Con ^{123}I -MIBG pueden ocasionalmente visualizarse, en las primeras imágenes, asas de intestino delgado, pero su actividad disminuye a las 24 horas, predominando en colon. La captación de MIBG por los órganos de diversos sistemas refleja una inervación adrenérgica rica o excreción de catecolaminas (o ambos). El yodo libre causa captación tiroidea (que puede ser bloqueada con la administración previa de yodo estable o perclorato).

Tras su administración endovenosa la mayor parte de la actividad se elimina por vía urinaria (70-90% en 96 horas; 60% en el primer día), en su mayor parte en forma nativa; lo que origina, en algunos casos, actividad en cavidades renales y sistemática en vejiga urinaria.

Una pequeña fracción, químicamente no caracterizada, se excreta por vía intestinal.

No debe existir captación esquelética. Las extremidades muestran sólo una ligera actividad muscular y en estos casos el hueso puede aparecer como una zona de fotones deficiente.

- Captación patológica:

La captación de MIBG en tejidos blandos se observa en el tumor primario y zonas de metástasis como los ganglios linfáticos, hígado, hueso y médula ósea.

La intensidad de la captación de MIBG puede ser similar en los tumores benignos y malignos. Del mismo modo, la maduración del neuroblastoma puede ocurrir sin cambio en la intensidad de la captación.

La captación de ^{123}I -MIBG en el esqueleto puede observarse, ya sea como áreas focales de aumento de la captación o como una captación difusa. El aumento de la captación del marcador se relaciona tanto con metástasis ósea como con infiltración de médula ósea o ambas cosas.

Las suprarrenales normales son visibles regularmente con ^{123}I -MIBG, pero sólo en una pequeña proporción de los casos, de forma tardía (48-72 h), si el trazador es ^{131}I -MIBG. Una captación suprarrenal anómala se traduce como un depósito incrementado con disposición asimétrica; la falta de referencias anatómicas para su localización puede solventarse con inyección sucesiva de pequeñas dosis de radiofármacos renales ($^{99\text{mTc}}$ -MAG3-DTPA; $^{99\text{mTc}}$.DMSA) o con tropismo óseo.

Áreas anormales de captación de localización extra-adrenal pueden ser más difícilmente interpretables y precisar de estudios de correlación radiológica.

La valoración de la infiltración hepática mediante la MIBG puede ser dificultosa, debido a que la biodistribución y eliminación del radiotrazador se realiza en parte por esta vía. En caso de afectación, se puede observar un aumento de las dimensiones hepáticas y una heterogeneidad y aumento de intensidad de la captación, que tiene especial valor en los estadios 4s.

Según se recoge en la literatura¹³⁵, la sensibilidad de la detección de feocromocitomas, neuroblastomas y paragangliomas es de alrededor de un 86% con una especificidad de casi el 100% utilizando el ¹²³I-MIBG por lo que se considera el trazador de elección. La tasa de detección en otras neoplasias de origen cromafín es notablemente inferior, salvo en el tumor carcinoide.

-Interacciones:

Numerosos fármacos¹³⁶ y alimentos pueden interferir en el estudio ya sea inhibiendo el mecanismo de captación, depósito, transporte o el almacenaje en las vesículas neurosecretoras, y que es necesario evitar previo a la realización de la gammagrafía¹³⁷, por lo tanto, es importante la revisión de los fármacos prescritos para suspenderlos antes de la MIBG, teniendo en cuenta la posibilidad de medicamentos de dispensación sin receta.

Dichos fármacos, se deben interrumpir al menos por un tiempo equivalente a cuatro periodos de vida media biológica:

Los fármacos más comunes son broncodilatadores que contienen: fenoterol (Berotec®), Salbutamol (Ventolin®), terbutalina (Bricanyl®) y gotas nasales y aerosoles que contengan Xilometazolina (Otrivine gotas®).

Otros fármacos que interfieren son:

Antidepresivos tricíclicos (amitriptilina, imipramina...)

Antihipertensivos (reserpina, labetalol y otros bloqueantes alfa y beta adrenérgicos, calcioantagonistas).

Simpaticomiméticos (efedrina, fenilefrina, fenilpropanolamina, dopamina, dobutamina, anfetaminas).

Antagonistas del calcio: nifedipina (Adalat®), nicardipina (Cardene®), amlodipina (Norvasc®),

Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina: Captopril (Capoten®), enalapril (Vasotec®),

Bloqueantes de los receptores adrenérgicos: labetalol (Trandate®), amiodarona (Cordarone®),

Inhibidores de la bomba de sodio: digoxina (Lanoxin®).

Antisépticos.

Cocaína.

Estos fármacos no son habituales en niños, pero se debe investigar expresamente si se están tomando descongestionantes y antigripales, que contienen fenilpropanolamina y otros principios frecuente causa de interferencias.

Entre los alimentos que interfieren en la captación de la MIBG se encuentra la vainilla y plátano, por lo que se deben evitar los días previos a la realización de la prueba.

Falsos negativos:

Existen diferentes situaciones en las que una o varias lesiones puedan pasar desapercibidas:

Razones físicas relacionadas con la limitada resolución espacial que impedirá la detección de lesiones muy pequeñas¹³⁰.

Razones anatómicas¹³⁸, con lesiones localizadas cerca de una masa voluminosa del tumor primario o metastásico, o cerca de tejido blando con una alta captación fisiológica (miocardio, glándulas tiroideas y salivales, hígado, riñón, vejiga y colon).

Ausencia o baja captación del tumor o tumores relacionados con razones fisiopatológicas derivadas de la heterogeneidad de los tumores, la necrosis isquémica de la masa tumoral, la falta de gránulos, la pérdida de la capacidad del tumor para captar la sustancia inyectada, la inhibición farmacéutica o alguna razón desconocida¹¹⁹.

5.- ESTUDIO EMR DE MÉDULA ÓSEA:

La quimioterapia mieloablativa seguida del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica (TPH) se utiliza en los pacientes con NB de alto riesgo que han alcanzado una remisión completa o muy buena remisión parcial tras la quimioterapia de inducción y posterior cirugía del tumor primario. Sin embargo, el 40-50% de estos pacientes experimentan una recaída después del TPH, resultando en este grupo la tasa de supervivencia libre de enfermedad a los 2 años, menor del 40%.

En el NB estadio 4, la principal localización metastásica es la médula ósea. Su análisis durante la evaluación aporta gran información sobre la respuesta tumoral, ya que la persistencia de micrometástasis predice un mayor riesgo de recidiva, pero existe controversia respecto al mejor método de evaluación de metástasis en médula ósea.

Frappaz et al¹³⁹, 2004 analizaron la sensibilidad de la biopsia vs la MIBG para la detección de metástasis de neuroblastoma en médula ósea en 20 pacientes mayores de 1 año. Concluyeron que es necesario realizar ambos procedimientos para estadificación al diagnóstico y evaluación de respuesta posteriormente, ya que la infiltración de médula ósea que es detectable por medio de esta técnica puede ser indetectable en MIBG o viceversa.

Kushner¹⁴⁰ et al estudiaron 162 pacientes diagnosticados de NB de alto riesgo en el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC), revisaron las MIBG, (99m)Tc, la médula ósea y las catecolaminas en orina realizadas al diagnóstico y tras la quimioterapia de inducción, encontrando que en 15/38 pacientes con afectación histológica de médula ósea, ésta no era evidente en la MIBG y en 5 pacientes en los que la MIBG era positiva para metástasis, la histología de médula ósea fue negativa. Por lo que concluyeron también que es necesario realizar ambas pruebas para asegurar una buena valoración de remisión tras el tratamiento de inducción.

Los recientes avances de las técnicas de biología molecular han permitido la descripción de alteraciones cromosómicas en células tumorales y la identificación de oncogenes y genes supresores involucrados en la

transformación maligna, por lo que el estudio de la enfermedad mínima residual (EMR) ha ido adquiriendo una importancia trascendental en la detección y seguimiento de pacientes con mayor probabilidad de recaída y peor pronóstico a largo plazo.

La EMR consiste en la persistencia de un clon anormal, aún en niveles bajos, durante o tras finalizar el tratamiento. Tiene significado pronóstico ya que puede predecir el riesgo de recaída de la enfermedad y por este motivo, conocer su presencia nos puede ayudar a plantear estrategias terapéuticas para prevenirla.

Los métodos de estudio para detectar EMR^{141,142} deben cumplir unos requisitos previos para poder ser considerados útiles, entre los que se incluyen una elevada sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y aplicabilidad de la técnica.

Los procedimientos que actualmente cumplen estos requisitos son la inmunofenotipificación por citometría de flujo, la inmunocitología, la hibridación in situ con fluorescencia (FISH) y transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real o real-time PCR¹⁴³.

A pesar de que los métodos morfológicos están validados y aceptados como “Gold standard” para la estadificación inicial de los pacientes con neuroblastoma, son insuficientes para el seguimiento durante el tratamiento, ya que no detectan infiltración tumoral menor del 1%. Actualmente, se está realizando la determinación de la EMR en una muestra de sangre periférica

(SP) y 2 aspirados de médula ósea, así como la histología en las biopsias de médula ósea (MO) y, si es subsidiario de TPH, en los productos de aféresis.

La inmunocitología y técnicas de biología molecular como la RT-PCR permiten detectar marcadores o genes característicos de las células neuroblásticas, como la tirosina hidroxilasa (TH), los gangliósidos GD2, el gen de la doblecortina (DCX) y el phos2b con una mayor sensibilidad, manteniendo la especificidad¹⁴².

5.1. Citometría de flujo:

Tecnología utilizada para analizar y definir el perfil inmunofenotípico de las células neoplásicas y establecer así la presencia de fenotipos aberrantes. Se basa en la aplicación de anticuerpos monoclonales específicos, dirigidos contra proteínas de membrana o intracitoplasmáticas, que llevan apareado un fluorocromo para su detección y visualización mediante un sistema informático apropiado. Posee una sensibilidad superior a 1×10^{-4} , es decir, es capaz de detectar una célula tumoral entre 10.000 células normales¹⁴⁴.

5.2. Inmunocitología¹⁴⁴:

El objetivo de esta técnica es la identificación de estructuras antigénicas que permitan detectar células neoplásicas en un tejido (médula ósea, sangre periférica y/o productos de aféresis), mediante anticuerpos monoclonales "tumor-específicos". Posee una sensibilidad de 1×10^5 .

La inmunocitología, mediante el uso de anticuerpos monoclonales "neuroblastoma específicos"; principalmente los antiGD2¹⁴⁵, es otro método

útil, aunque menos sensible que la RT-PCR para cuantificar la GD2 sintetasa, en la detección de células neuroblásticas ocultas en MO y SP.

Los GD2 son glicosfingolípidos que contienen ácido siálico y están abundantemente expresados en el NB. Se detectan, no sólo en las células tumorales, sino también en el plasma de los enfermos y por tanto, pueden ser de utilidad para detectar una mínima masa tumoral a distintos niveles. En diferentes estudios se ha observado que la detección de gangliósidos GD2 en MO por inmunocitología (utilizando anticuerpos monoclonales anti-GD2) o por RT-PCR, es muy útil para la detección de EMR, viendo que si es positiva se relaciona fuertemente con la progresión de la enfermedad.

Los anti-GD2 se fijan a la membrana de la célula tumoral y permiten identificar células aisladas en el aspirado de MO o en SP. Sin embargo, precisa de muestras en fresco y requiere un recuento bajo microscopio. Por el contrario, la detección de EMR midiendo el GD2 por RT-PCR utiliza células mononucleares criopreservadas y puede reproducirse en múltiples ocasiones y para múltiples marcadores. La sensibilidad de detección por inmunocitología del GD2 es de 1 célula tumoral por 100.000 células sanas (1×10^{-5}), mientras que por RT-PCR es de 1 por 1.000.000 (1×10^{-6}). La síntesis de los GD2 depende de la enzima GD2 sintetasa, cuyo ARN-m supone un potencial marcador tumoral de EMR analizada mediante RT-PCR, según el grupo del MSKNY¹⁴³, pero posteriormente, no se ha conseguido confirmar su valor, y parece ser bastante inespecífico.

5.3. RT-PCR (Trascrición inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa)¹⁴⁶:

La detección molecular de marcadores tumorales mediante RT-PCR constituye un método altamente sensible y específico, es una técnica molecular que permite amplificar secuencias específicas de ADN o ARN expresadas en las células tumorales, multiplicando por 100 el número de copias que podemos obtener de un determinado fragmento de ADN.

Con la RT-PCR, se puede analizar el ARN de transcripción expresado en dichas células. Esto nos permite el estudio de los genes alterados por traslocaciones primarias y de otros genes característicos asociados a determinados tipos de tumor. En la monitorización de la EMR es importante la cuantificación de ésta mediante la RT-PCR en tiempo real, de manera que la comparación de su nivel de amplificación con los estándares adecuados, proporciona una medida cuantitativa del grado de afectación. Viprey¹⁴⁷, en 2007 publicó un trabajo en el que muestra un aumento de sensibilidad (90% vs 58%) tras la aplicación de unas normas o SOPs (Standard Operating Procedures) para dar uniformidad a la metodología utilizada para su análisis. Posee una sensibilidad que se sitúa entre 1×10^{-5} y 1×10^{-6} .

Ciertos estudios^{141,148} han demostrado que la presencia de EMR medida en MO y SP en pacientes con NB localizado mediante el análisis de TH (principal enzima involucrada en la síntesis de catecolaminas) por RT-PCR, se asocia con mayor probabilidad de recaída metastásica tras la extirpación del tumor primario. En el NB de alto riesgo, utilizando también el análisis de TH

por RT-PCR para detectar EMR, algunos estudios encuentran que la persistencia de la misma en MO tras cuatro meses de comenzar la quimioterapia predice un peor pronóstico (recaída y/o muerte en los siguientes 24 meses de media, rango de 13-43 meses) en comparación con los que no se observa EMR (no evidencia de enfermedad a los 61 meses de media, rango de 20-76 meses).

Wagner 2006 et al ¹⁴⁹ encontró una buena correlación entre N-Myc y TH en pacientes con NB de alto riesgo.

Oltra et al ¹⁴⁵ han propuesto el uso del gen de la doblecortina (DCX) como marcador molecular de EMR, basados en sus estudios en los que demuestran que la DCX tiene una buena especificidad y concordancia con la TH, mostrando mayor tasa de expresión.

Otros marcadores como la Ciclidina D1 ¹⁵⁰ y el Phos2b ¹⁵¹ están siendo estudiados actualmente.

5.4. TH-Phos2B :

La PCR, la tirosina hidroxilasa (TH) y GD2 sintetasa, se han utilizado como marcadores de enfermedad mínima residual en neuroblastoma, pero tienen expresión en los tejidos normales, lo que limita su especificidad.

PHOX2B ¹⁵² es un nuevo marcador que promete ser más específico para la detección de enfermedad mínima residual en el neuroblastoma. Stutterheim et al ¹⁵³ determinaron la expresión de PHOX2B, TH, y de la sintetasa de GD2 en los tejidos normales, para ello estudiaron 289 muestras de 101 pacientes holandeses y 47 muestras de 43 pacientes alemanes. En total, 51 muestras de

médula ósea normal, 37 de sangre periféricas y 24 de aféresis. En contraste con TH y sintasa GD2, PHOX2B no se expresó en ninguna de las muestras normales, concluyendo que PHOX2B es superior a la TH y GD2 sintasa en la especificidad y sensibilidad para la detección de enfermedad mínima residual de neuroblastoma¹⁵¹ mediante el uso de la PCR cuantitativa en tiempo real, por lo que proponen su inclusión en estudios prospectivos junto con TH y otros marcadores de enfermedad mínima residual.

INTRODUCTION

Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial childhood tumor, and it arises from the sympathetic nervous system. At the time of diagnosis, 50% are metastatic, with a 5-year survival rate of 30-40%. Approximately 10-15% of the tumors are resistant to induction treatment, and 40% of children who attain complete or partial remission will relapse despite treatment with aggressive multimodality therapy. Currently, less than 30% of high-risk patients are cured of their disease.

During the last 20 years, advances in the understanding of neuroblastoma tumor biology have resulted in the identification of prognostic variables that define risk-group criteria²⁴. Treatment tailored according to risk-group stratification has resulted in improved outcome and diminished toxicity for children with low and intermediate risk disease⁷⁰. However, children with high-risk NB have had only a slight improvement in outcome, that is thought to result in part from dose-intensification with myeloablative therapy and autologous bone marrow transplant¹⁵⁴.

Early response to therapy has been shown to have prognostic significance in many types of childhood cancers. Metaiodobenzylguanidine (¹²³I-MIBG) uptake has also been shown to be a highly sensitive and specific method to detect NB and to evaluate the response to therapy²⁰. Previous studies have indicated that a positive ¹²³I-MIBG scan obtained just before myeloablative therapy may be predictive of a poor outcome in stage 4 patients^{116,155-157}.

Our aim was to evaluate retrospectively osteomedullary uptake on diagnostic and postinduction therapy ^{123}I -MIBG scintigraphs in 28 stage 4 NB patients who received homogeneous intensive multimodality treatment that included high-dose chemotherapy with peripheral blood stem cell rescue. Nuclear medicine images were semi-quantitatively scored using criteria previously described¹⁵⁸, and the prognostic significance was evaluated. Our results suggest that patients with MIBG positive following induction therapy have an increased risk of relapse.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- Primarios:

Estudiar el valor pronóstico de la aplicación de un sistema de puntuación semicuantitativa para la interpretación de la ¹²³I-MIBG realizada en pacientes con neuroblastoma metastásicos al diagnóstico y tras tratamiento de inducción. Demostrar si el Score semicuantitativo sirve para predecir la respuesta al tratamiento.

- Secundarios:

1.- Evaluación de la puntuación semicuantitativa de captación de MIBG tras finalizar la inducción, con relación al momento del diagnóstico y su correlación con la Supervivencia Global y Libre de eventos.

2.- Estudio de la enfermedad mínima residual mediante DCX y TH de estos pacientes en médula ósea tras la inducción y correlación con riesgo de recaída posterior.

3.- Estudio de otros marcadores pronósticos biológicos ya conocidos en esta población (N-Myc, LDH, ferritina, delección 1p,) y correlación con la supervivencia libre de eventos y con la supervivencia global. Comparación y correlación entre ellos y con la puntuación de MIBG.

4.- Explorar la factibilidad de la aplicación de este procedimiento en nuestro medio para su exportación a nivel nacional y aplicación como centro de referencia, así como en el próximo protocolo cooperativo internacional de neuroblastoma.

OBJECTIVES:

Main objectives:

To study the prognostic value of applying a semiquantitative scoring system for the interpretation of the ^{123}I -MIBG performed at diagnosis and after induction therapy in metastatic neuroblastoma patients to predict response to treatment.

Secondary objectives:

1. – Evaluation of a ^{123}I -MIBG scoring system after induction therapy, compared to measurement at the time of diagnosis and correlation with overall and event-free survival.
2. - Study of bone marrow minimal residual disease by DCX and TH of these patients after induction and correlation with risk of subsequent relapse.
3. - Study of other known biological prognostic markers (N-Myc, LDH, ferritin, deletion 1p) and correlation with event-free and overall survival. Comparison and correlation between them and with the MIBG score.
4. – To explore the feasibility of applying this procedure in our setting, as a national referral center, as well as in the next Neuroblastoma International Cooperative Protocol.

PACIENTES Y MÉTODOS

PACIENTES Y MÉTODOS:

1. Población a estudio:
 - 1.1. Manejo de los pacientes:
 - 1.1.1. Evaluación de los pacientes.
 - 1.1.1.1. Criterios de inclusión.
 - 1.1.1.2. Criterios de exclusión.
 - 1.1.2. Protocolo de tratamiento:
 - 1.1.2.1. Estudio cooperativo NII92 de la Sociedad Española de Oncología Pediátrica.
 - 1.1.2.2. Estudio cooperativo NAR99 de la Sociedad Española de Oncología Pediátrica.
 - 1.1.2.3. Estudio cooperativo HRNBL Internacional de Oncología Pediátrica (SIOPEN).
 - 1.2. Manejo de las muestras:
 - 1.2.1. Material de biopsia.
 - 1.2.2. Material para biología molecular.
2. Métodos:
 - 2.1. Evaluación de la respuesta y estudio de la enfermedad mínima residual.
 - 2.1.1. Metayodobencilguanidina.
 - 2.1.1.1. Preparación del paciente.
 - 2.1.1.2. Radiofármaco: ¹²³I-MIBG

2.1.1.3. Gammacámara

2.1.1.4. Protocolo de exploración.

2.1.1.5. Procesado.

2.1.1.6. Interpretación.

2.1.1.7. Descripción score Semicuantitativo utilizado.

2.1.2. Estudio de la enfermedad mínima residual en médula ósea mediante marcadores genéticos.

2.2. Estadística:

2.2.1. Variables clínicas.

2.2.1.1. Edad y sexo.

2.2.1.2. Localización del tumor primitivo.

2.2.1.3. Localización de las metástasis.

2.2.1.4. Estadio.

2.2.1.5. Situación actual del paciente.

2.2.1.6. Recaída.

2.2.1.7. Fallecimiento.

2.2.2. Variables séricas.

2.2.2.1. Enolasa.

2.2.2.2. LDH

2.2.2.3. Ferritina

2.2.3. Variables tisulares.

2.2.3.1. Histología.

2.2.3.2. Clasificación de Shimada

2.2.4. Variables genéticas.

2.2.4.1. Aislamiento de DNA genómico.

2.2.4.2. Amplificación del oncogén N-Myc y la Delección 1p.

2.2.4.3. Índice de ADN.

1.- POBLACIÓN A ESTUDIO:

1.1. Manejo de los pacientes:

1.1.1. Evaluación de los pacientes:

Los pacientes incluidos en el estudio en total fueron 138 niños diagnosticados de neuroblastoma en un periodo comprendido entre enero 1992 y enero 2007 en la Unidad de Oncología Pediátrica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, hospital de referencia para dicho tumor. En dicho periodo, 1580 niños fueron diagnosticados de cáncer, siendo 138 los que correspondían a neuroblastoma (11,4 %). De ellos, 28 (5 %) eran metastáticos. Éstos últimos han sido la población de estudio de este proyecto.

Todos los pacientes fueron tratados homogéneamente con los protocolos consecutivos de la Sociedad Española de Oncología Pediátrica y de la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica posteriormente (N-II-92, NAR-99 y HRNBL-1).

El consentimiento informado se obtuvo de todos los padres o tutores legales previamente a la recogida de muestras e inicio del tratamiento.

La elección de los pacientes tratados en nuestro hospital como población de estudio estuvo motivada por la mejor accesibilidad a las muestras para el estudio de los factores pronósticos histológicos, genéticos y moleculares, debido a que nuestro hospital es de referencia a nivel nacional para este tipo de tumores, y además, y también el mejor acceso a las planchetas de MIBG para la aplicación del score de MIBG de forma

segura y sin sesgos secundarios al tratamiento digital de imágenes derivadas de su envío desde otros hospitales periféricos. Con todo ello, aunque se ha conseguido una muestra reducida, hemos conseguido aumentar la homogeneidad y calidad del estudio, para convertirlo en estudio piloto previo a la aplicación del score de MIBG en el próximo estudio internacional cooperativo de tratamiento del neuroblastoma.

Los datos clínicos relevantes fueron recogidos de forma objetiva y retrospectiva de las historias clínicas.

Para la evaluación de los diferentes marcadores biológicos pronósticos, se tomaron como valores de referencia los de nuestro laboratorio, siendo consideradas patológicas las siguientes cifras:

Ferritina > 350 ng/mL en lactantes y > 145 ng/mL en > 1 año.

ENE > 20 ng/mL (y muy patológica > 100 ng/mL).

LDH > 500 U/L (y muy patológica > 1000 U/L).

1.1.1.1. Criterios de inclusión:

- Diagnóstico establecido de Neuroblastoma según el Sistema Internacional para el Estadiaje del Neuroblastoma (INSS/INRGSS).
- Menores de 21 años.
- Neuroblastoma en estadio 4- metastático.

- Pacientes que han sido diagnosticados y tratados en la Unidad de Oncología Pediátrica del H la Fe de Valencia en el periodo comprendido entre enero 1992 y enero 2007.
- Consentimiento informado de los padres o tutores legales recogido.
- Disponibilidad de material tumoral para la determinación de factores pronósticos biológicos.
- Seguimiento provisional al menos de 3 años.
- Aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica local y nacional.

1.1.1.2. Criterios de exclusión:

- Neuroblastoma localizado.
- Otros diagnósticos.
- >21 años.

1.1.2. Protocolos de tratamiento:

En aquellos pacientes con diagnóstico de sospecha de neuroblastoma, se realizó una biopsia o exéresis tumoral de la masa, según los factores de riesgo quirúrgico, mediante la cual se realizó el estudio histológico que confirmó el diagnóstico de neuroblastoma, así como el estudio de los factores de riesgo histopatológicos y de biología molecular.

Una vez confirmado el diagnóstico, se estudió la extensión tumoral mediante la realización de 2 aspirados y biopsias de médula ósea (de ambas

crestas ilíaca), así como pruebas de imagen: ecografía de la localización del tumor primario, añadiéndose TAC/RM según localización. Para evaluar la existencia de metástasis óseas, se utilizó la ¹²³I-MIBG y en los casos en que era negativa se asoció la gammagrafía con tecnecio o el PET.

Una vez confirmado el diagnóstico y realizado el estudio de extensión, los pacientes fueron tratados siguiendo las recomendaciones del protocolo de tratamiento que se encontraba activo (en el periodo de tiempo estudiado se utilizaron 3 protocolos consecutivos).

Los 3 protocolos de tratamiento consecutivos que se utilizaron para el tratamiento de los pacientes objeto de este estudio son homogéneos en cuanto a la base del tratamiento (quimioterapia citorreductora, cirugía, megaterapia y tratamiento de mantenimiento).

Tabla 5: Diferencias entre N292 y HRNBL1:

	<u>N-II-92</u>	<u>HRNBL1</u>
Ciclofosfamida	8.4 g	4.2 g
Adriamicina	no	No
Cisplatino	300 mg	320 mg
Carboplatino	2 g	1.5 g
Días	92 días	70 días
Respuesta	90%	79%
Progresión enfermedad	15%	10%
Toxicidad	3.6%	3.8%
N	83	130
<i>NAR-99 es igual que N-II-92 pero infusión continua</i>		

1.1.2.1. ESTUDIO COOPERATIVO N-II-92 DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA:

Fue un estudio cooperativo multicéntrico en el que participaron 26 hospitales españoles.

En este estudio se intentó aumentar la supervivencia del anterior (N-I-87⁶) mediante el incremento de la intensidad de la quimioterapia de inducción. Respecto al protocolo anterior de tratamiento, se introdujeron dosis elevadas de ciclofosfamida y carboplatino en la quimioterapia de inducción, acortando su duración mediante la introducción de ciclos de cisplatino y VM26 entre los de ciclofosfamida y carboplatino, para mejorar su tolerancia.

También se incorporó el uso de factores de crecimiento hematopoyéticos para facilitar la recuperación hematológica y poder mantener la intensidad terapéutica. Como tratamiento de consolidación tras la cirugía, se recomendó el TAMO, basándose en los resultados del protocolo anterior. Para la evaluación de la respuesta, se utilizaron los criterios del INRC.

Además de los pacientes con neuroblastoma metastásico, también incluía a otros pacientes considerados de alto riesgo¹⁵⁹, fundamentalmente por el hallazgo de un número de copias del oncogén N-Myc mayor de 10 en el tejido tumoral (realizado por PCR). Sin embargo, los pacientes objeto de este

trabajo van a ser sólo los neuroblastomas metastáticos, independiente de la situación N-Myc.

La probabilidad de supervivencia global y libre de acontecimientos a 48 meses fue de 0,30 (DS =.02). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en supervivencia global o libre de enfermedad en función del tipo de metástasis al diagnóstico (hueso, médula ósea, otras) ($p < 0,75$), ni según el tratamiento de consolidación recibido (TMO frente a quimioterapia convencional) ($p < 0.08$). En el análisis multivariante, sólo la edad por debajo de 1 año ($p < 0.02$) y el índice de DNA ($p < 0.03$) tuvieron significación en la supervivencia libre de acontecimientos. La amplificación del N-Myc tuvo una tendencia a la significación en la supervivencia global ($p < 0.06$).

Se consiguió duplicar el tiempo medio de supervivencia de los pacientes de 18 meses a 33 y la mayor parte de recaídas fueron tras el tratamiento¹⁶⁰.

1.1.2.2. ESTUDIO COOPERATIVO N-AR-99 DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ONCOLOGIA PEDIATRICA:

Para intentar seguir aumentando el número de respondedores a la quimioterapia de inducción, se creó el protocolo NAR99, en el que se usan las mismas drogas que en el N-II-92 y a las mismas dosis, pero en infusión continua, basándose en los estudios americanos de principios de los 90 y en

nuestra propia experiencia ¹⁶¹ en el tratamiento de los pacientes que recaían o que eran refractarios. Además, se introdujeron las terapias diferenciadoras con ácido retinoico a dosis altas tras el TAMO.

La conclusión de este estudio fue que la toxicidad había sido mayor en el grupo de infusión continua en los lactantes, y los resultados se presentaron en la *Reunión Anual de Neuroblastoma (ANR) en 2004: "Comparison of two induction regimens for high risk neuroblastoma"*.

Fue en este protocolo cuando se inició un estudio nacional para la evaluación de enfermedad mínima residual en médula ósea y en producto de leucaféresis mediante biología molecular e inmunofluorescencia. Este proyecto consistía en la determinación en dichas muestras de genes propios de células de Neuroblastoma (Tirosin-hidroxilasa, GAGE, MAGE) y de gangliósidos GD2.

1.1.2.3. ESTUDIO COOPERATIVO HRNBL DE LA SIOPEN:

Se trató de un estudio randomizado para el tratamiento del Neuroblastoma de alto riesgo, realizado por el grupo de Neuroblastoma de la SIOP Europa, que incluye a pacientes en estadio 4 de la enfermedad mayores de 1 año y estadios 2, 3 y 4 de neuroblastoma con amplificación N-Myc.

El protocolo consiste en una quimioterapia rápida a dosis intensivas (COJEC) con el empleo recomendado de G-CSF¹⁶² (filgrastim), obtención de células madres de sangre periférica (aféresis), intento de extirpación completa del tumor primario, randomización de la terapia mieloablativa (BUMEL frente a CEM), seguido de rescate de células madre de sangre periférica (PBSCR), radioterapia en el lecho del tumor primario y randomización, ya sea a terapia

de diferenciación con 13-cis RA únicamente, a terapia de diferenciación e inmunoterapia con el anticuerpo quimérico anti-GD2.14.18 asociado o no a IL-2.

Los pacientes con respuesta insuficiente al final del COJEC son incluidos en el estudio TVD (Topotecan, vincristina, doxorubicina), pudiendo ser aleatorizados aquellos pacientes que alcanzan criterios de elegibilidad para el R1 tras 2 ciclos de TVD.

1.2. MANEJO DE LAS MUESTRAS:

El estudio biológico de las muestras fue realizado de forma protocolizada y los resultados se remitieron al Hospital Universitario y Politécnico La Fe como Coordinador de estudios y centro de referencia nacional para Neuroblastoma.

1.2.1. Material de biopsia:

Se enviaron fragmentos de más de 1 cm, evitando en lo posible áreas de necrosis, calcificación o hemorragia.

La toma de las muestras se realizó en un ambiente estéril (quirófano) y posteriormente la muestra se introdujo en un tubo con nitrógeno líquido para ser enviado a anatomía patológica. En otros casos, se envió en fresco, o en parafina. En todos los casos, se remitió a temperatura ambiente en un plazo no superior a 36 horas al centro de referencia para su estudio.

1.2.2. Material para biología molecular:

Se remitió un fragmento mayor de 1 cm, evitando en lo posible las áreas de necrosis, calcificación o hemorragia. La muestra se introdujo en tubos

para congelación (1.8 o 4.5 ml) de la casa NUNC y se congeló en nitrógeno líquido inmediatamente tras su extracción en quirófano, remitiéndose al centro de referencia en una caja de poliestireno (material aislante) llena de nieve carbónica en un plazo no superior a 48 horas.

Los estudios que se realizaron en dichas muestras fueron los siguientes:

Histopatología (incluida clasificación de Shimada): Realizado tras incluir una sección del tumor enviado en parafina, coincidiendo el estudio histológico con la sección analizada con los métodos de Biología Molecular.

Índice de DNA (ploidía).

Amplificación del N-Myc: Se ha estudiado a partir del protocolo N292, al principio de forma preferente y después obligatoria (1995). En un principio se estudió por PCR, y posteriormente por FISH (año 2000).E. Citogenético, con especial atención a la delección del 1p, dobles minutas y Zonas de Tinción Homogénea.Estudios de MLPA desde el inicio del último protocolo cooperativo (2010).

2. MÉTODOS:

2.1. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA Y ESTUDIO DE ENFERMEDAD

MÍNIMA RESIDUAL:

2.1.1. METAIODOBENCILGUANIDINA.

El iobengano (^{123}I) es una aralquilguanidina radioyodada. Su estructura contiene el grupo guanidina de la guanetidina unido a un grupo bencilo en el que se ha introducido yodo. Al igual que la guanetidina, las aralquilguanidinas son agentes bloqueantes de las neuronas adrenérgicas. Debido a la similitud funcional entre las neuronas adrenérgicas y las células cromafines de la médula suprarrenal, el iobengano se localiza preferentemente en la médula de las glándulas suprarrenales.

De las diferentes aralquilguanidinas, el iobengano es la sustancia preferida debido a su menor captación hepática y mayor estabilidad in vivo, lo que provoca menor captación tiroidea del yoduro liberado. Penetra en el tejido adrenomedular por dos vías: una es específica, el mecanismo de captación de aminas tipo-1, ATP-asa y Na-dependiente, de baja capacidad y alta afinidad; el segundo mecanismo es difusional, inespecífico y no consume energía. La MIBG no se une a receptores postsinápticos ni es degradada por enzimas que catabolizan las catecolaminas. El mecanismo de captación puede inhibirse por la captación de inhibidores tales como la cocaína o la desmetilimipramina. Después de la captación, un mecanismo activo transfiere al menos una fracción del iobengano intracelular a los gránulos de almacenamiento de las células.

El patrón de distribución del iobengano (^{123}I) incluye captación inicial rápida en el hígado (33% de la dosis administrada) y mucho menor en los pulmones (3%), miocardio (0,8%), bazo (0,6%) y en las glándulas salivales

(0,4%). La captación del iobenguano (¹²³I) en las glándulas suprarrenales normales (médula suprarrenal) permite visualizarlas, y en caso de hiperplasia, la captación estará aumentada.

El iobenguano es principalmente excretado de forma inalterada por los riñones. Del 70 al 90% de la dosis administrada se recupera en la orina en 4 días, la mitad en el primer día. Los siguientes productos de descomposición metabólica se han recuperado en la orina: yoduro (¹²³I), ácido metayodohipúrico (¹²³I), hidroxí-yodobencilguanidina (¹²³I) y ácido metayodobenzoico (¹²³I). Estas sustancias representan aproximadamente entre el 5 y el 15% de la dosis administrada. Una pequeña fracción, químicamente no caracterizada, se excreta por vía intestinal.

Numerosos fármacos pueden interferir en el estudio ya sea inhibiendo el mecanismo de captación, su transporte o el almacenaje en los gránulos.^{118,163}

2.1.1.1.Preparación del paciente:

La captación tiroidea debe ser bloqueada mediante la administración de solución yodo-yodurada de Lugol al 5% (contiene en 100 ml de excipiente, 5 gr de yodo y 10 gr de yoduro sódico; 1 ml de la solución equivale a 50 mg de yodo libre y 130 mg de yodo total), con una posología que depende del peso del paciente, administrándose desde 24 horas antes de la inyección del trazador hasta 24 horas después.

EDAD	DOSIS
Menores de 1 mes	16,5 mg/ día
1 mes - 3 años	37,5 mg/ día
3 años – 13 años	65 mg/ día
Mayores de 13 años	130 mg/ día

Suspender fármacos y alimentos que interfieren en la MIBG.

2.1.1.2. Radiofármaco: ^{123}I -MIBG.

Dosis: Las dosis administradas deben pautarse según el peso corporal¹⁶⁴ Administración intravenosa de 3,7 MBq/kg (100 μCi /kg) de peso de ^{123}I -MIBG.

Dosis mínima: ^{123}I -MIBG = 80 MBq

Dosis máxima recomendada: ^{123}I -MIBG = 400 MBq

Carga de Radiación: Depende de la actividad administrada y la edad del niño. es decir: 3,7 mSv para un niño de 5 años que recibe 5.18MBq/kg ^{123}I -MIBG [115] y 5.5mSv en un niño de 5 años que recibe 0,74 MBq / kg ^{131}I -MIBG¹⁶⁵.

2.1.1.3. Gammacámara:

Gammacámara: Doble detector rectangular.

Se adquieren las imágenes bien en un estudio multiestático o bien en barrido (rastreo corporal total). Estudio multiestático: Matriz de adquisición 256

x 256, durante 10 minutos o hasta que se alcancen 250000 cuentas. Barrido: Matriz de adquisición 1024 x 1024, con velocidad de scan de 5 cm por minuto.

Colimador: Se utiliza un colimador de orificios paralelos de baja energía y alta resolución, con la ventana energética centrada en 159 Kev. En el caso de que hayan dudas en el estudio planar, se realiza SPECT (Single photon emisión tomography) de la zona dudosa.

2.1.1.4. Protocolo de exploración:

a) Administración intravenosa de ^{123}I -MIBG:

La inyección debe ser lenta (por lo menos 5 minutos) en una vena periférica, y con un lavado con solución salina. Los efectos adversos potenciales de MIBG (vómitos, taquicardia, palidez, dolor abdominal) que no están relacionados con alergias son muy raros en el caso de la inyección lenta.

b) Adquisición de imágenes:

Cuando se usa ^{123}I -MIBG, las imágenes deben adquirirse entre 20-24 horas post-inyección del trazador, efectuando estudio gammagráfico de cuerpo entero o fragmentado.

Ciertas imágenes adquiridas más tardíamente - nunca después de las 48h - pueden ser útiles en los casos dudosos.

Cuando se usa la ^{131}I -MIBG, la exploración se realiza generalmente 48 horas después de la inyección y se puede repetir en el día 3 o posteriores.

El SPECT puede ser útil en caso de existir dudas en cuanto a la presencia de un foco sospechoso o su localización.

Tipo de estudio: Planar o SPECT.

Proyecciones: Estudio corporal completo.

Colocación del paciente: Posicionado en decúbito supino, órbita circular con arco de 360°, matriz de 64 x 64 o 128 x 128 cm, zoom 1, 120 proyecciones de 30 segundos..

2.1.1.5. Procesado:

En planar: Modo display, posibilidad de presentación en multiestático.

En rastreo: modo Cuerpo Entero, tras reconstrucción de la matriz de cuerpo entero a partir de los datos del barrido continuo. Es recomendable la presentación dual o comparativa, realizando saturación de brillos o manipulando la función gamma en uno de los juegos de imágenes. Pueden aplicarse máscaras (vejiga, intestino...), zooms de procesado, etc.

En SPECT: Procesado específico del paquete tomográfico.

2.1.1.6. Interpretación:

Guía europea de MIBG: *GUIDELINE FOR RADIOIODINATED MIBG SCINTIGRAPHY IN CHILDREN. Pierre Olivier*¹⁶⁶.

2.1.1.7. Score semicuantitativo utilizado:

Para la realización de este trabajo, se ha utilizado **el Score de Interpretación Semicuantitativa de MIBG que ha utilizado la SIOPEN**, con algunas modificaciones ("V. Lewington. *The prognostic value of semi-quantitative ¹²³I MIBG scintigraphy at diagnosis in high-risk neuroblastoma:*

Validation of the SIOPEN score method. J Clin Oncol 29: 2011 (suppl; abstr 9511)”).

Este score fue elegido por consenso por el subcomité de Medicina Nuclear del Grupo Europeo de Neuroblastoma de la SIOP en la Reunión ANR del 2008 para la evaluación de las metástasis óseas en los pacientes diagnosticados de neuroblastoma, después de la presentación de os estudios preliminares al aplicarlo a 357 pacientes con NB metastásico. Consideraron que al tratarse de un método sencillo, reproducible, y con poca variabilidad interobservadores, era el idóneo para ser utilizado en un estudio multicéntrico. Además, se encontró un punto de corte (3) captaciones óseas al diagnóstico y un score (3) tras la inducción que definían dos grupos con diferente supervivencia.

El cuerpo fue dividido en 7 regiones anatómicas (calota, órbitas-huesos faciales-base de cráneo, columna, costillas-esternón, pelvis, miembros superiores e inferiores).

En cada región, las lesiones fueron puntuadas según:

- Extensión: 0, no lesiones; 1, una lesión por segmento; 2, más de una lesión por segmento; 3, afectación difusa (ocupa >50% del segmento).
- Intensidad de la captación fue puntuada: 0, ausente; 1, captación dudosa; 2, captación débil; 3, captación intensa.

El score absoluto se obtuvo sumando los scores de intensidad y extensión de todos los segmentos, siendo el valor máximo 35.

El score relativo se obtuvo mediante la división del score absoluto tras la inducción por el score al diagnóstico.

Al tratarse de una evaluación de la metástasis, no se ha incluido la captación del tumor primario. Tampoco se ha incluido la afectación extra-osteomedular o de partes blandas en el score, siguiendo las indicaciones de la SIOPEN.

Para evaluar el valor pronóstico del score semicuantitativo se relacionó la puntuación obtenida en el score al diagnóstico con la supervivencia global, supervivencia libre de eventos, tiempo de supervivencia, así como su relación con otros factores pronósticos conocidos como son la edad o la coexistencia de amplificación N-Myc, delección 1p, niveles de LDH, niveles de ferritina, niveles de ENE, localización del tumor primario.

Lo mismo se realizó con el score post-quimioterapia de inducción, teniendo en cuenta que en este caso los valores fueron más bajos, interpretándose como respuesta de las metástasis óseas al tratamiento de inducción administrado. Se intentó en ambos casos encontrar un “umbral” o puntuación a partir de la cual se diferencien dos grupos con pronóstico diferente.

Los valores medios del score basal al diagnóstico de cada paciente se compararon con los resultantes del score obtenido tras la quimioterapia de inducción, obteniendo además una relación o score relativo (score diagnóstico/score tras inducción), y todo ello se intentó relacionar con la evolución de los pacientes.

Además del estudio de supervivencia global y libre de eventos, dado el mal pronóstico de estos pacientes, se ha estudiado el tiempo de supervivencia mediante el uso de “horizontes” de supervivencia definidos por percentiles, para diferenciar así el tiempo en que se produce la recaída:

- Tiempo de supervivencia ≥ 20 meses (percentil 25 del tiempo de supervivencia es 19,11 meses, por lo que, arbitrariamente se elige 20 meses como punto de corte).
- Tiempo de supervivencia ≥ 90 meses (percentil 75 del tiempo de supervivencia).

De este modo, se crean 2 grupos en los que se diferencia a los pacientes en los que la recaída es más precoz y aquellos en los que existe un tiempo de supervivencia mayor, puesto que las características de los tumores son diferentes.

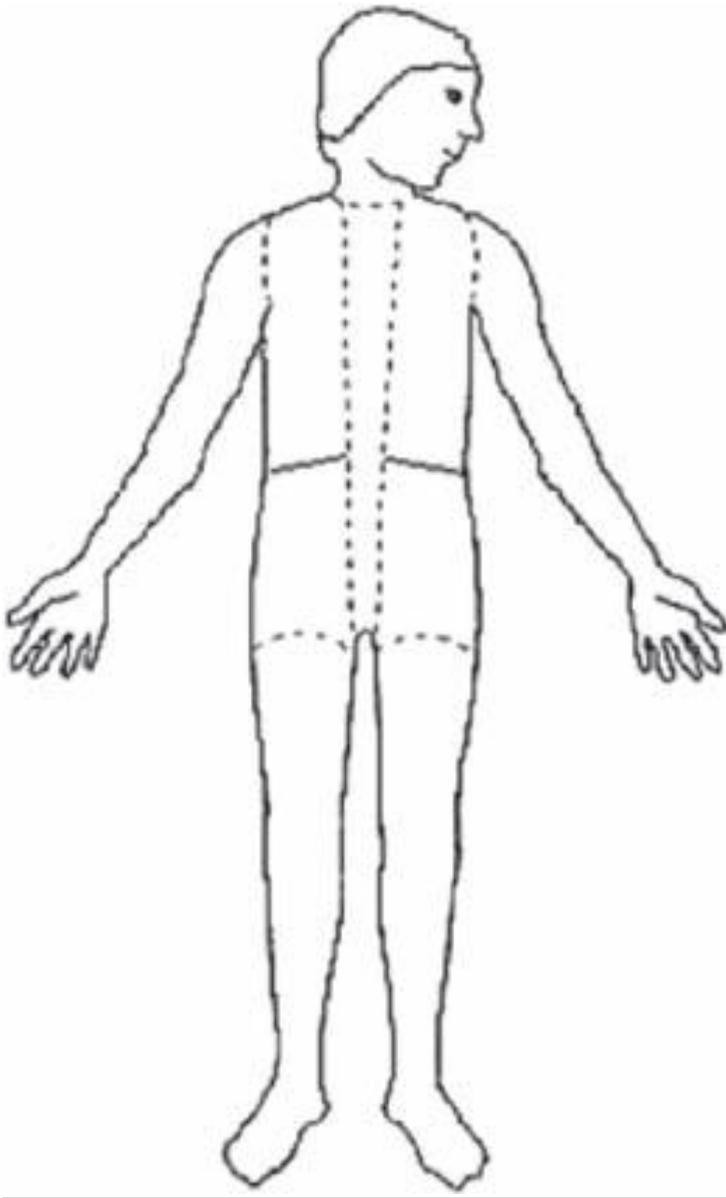


Figura 2: Plantilla para la Evaluación Estandarizada de MIBG:

Fecha:.....
 Paciente:.....
 Número de historia:
 Actividad inyectada:..... Tiempo tras inyección: 24 horas
 Otros, especificar:
 Localización del Tumor
 primario.....
 Cirugía: Si No

I. TUMOR PRIMARIO	
Captación en tumor primario Si: <input type="checkbox"/> No: <input type="checkbox"/>	Intensidad (*) <input type="checkbox"/> Homogénea = 1 <input type="checkbox"/> Extensión loco-regional ** Heterogénea = 2

II. LOCALIZACIÓN ESQUELÉTICA	
Cráneo	Intensidad (*) ----- Extensión (**) -----
Órbitas y huesos faciales (base de cráneo)	Intensidad (*) ----- Extensión (**) -----
Columna vertebral	Intensidad (*) ----- Extensión (**) -----

Costillas y esternón	Intensidad (*) ----- Extensión (**) -----
Pelvis	Intensidad (*) ----- Extensión (**) -----
Miembros inferiores	Intensidad (*) ----- Extensión (**) -----
Miembros superiores	Intensidad (*) ----- Extensión (**) -----

(*) Intensidad

- 0 = Ausente
- 1 = posible o dudosa
- 2 = Débil
- 3 = Fuerte

(**) Extensión

- 0 = No
- 1 = Cualquier lesión
- 2 = Más de una lesión o difusa

Si hay más de una lesión en una zona anatómica, medir el foco de mayor extensión/intensidad.

Calidad: Excelente Aceptable Pobre

Comentarios:.....
...

2.1.2. ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN MÉDULA ÓSEA MEDIANTE MARCADORES GENÉTICOS.

Se evaluó la expresión de los genes TH y DCX como marcadores moleculares específicos de la presencia de células neuroblásticas, en médula ósea, sangre periférica y tumores con el fin de valorar su utilidad para el estudio de enfermedad mínima residual.

En cuanto a la extensión medular, se evaluó según las recomendaciones de la Conferencia Internacional para el Estadaje del Neuroblastoma, mediante la realización de dos biopsias y dos aspirados (en ambas crestas ilíacas), ya que los últimos estudios sugieren que la biopsia medular es más sensible que el simple aspirado. La positividad de uno de ellos sirvió para documentar la infiltración, por el contrario, para descartarla fue necesario que todas las muestras fueran negativas.

Se han utilizado gran variedad de parámetros para valorar la respuesta al tratamiento de los pacientes con neuroblastoma. Es importante considerar que el nivel global de respuesta incluye al tumor primario y a las metástasis. Por ejemplo, la remisión completa (RC) requiere que, tanto el tumor primario como las metástasis, cumplan criterios. Una RC de las metástasis y RP (respuesta parcial) del primario debe considerarse como una RP. Se recomienda realizar la evaluación de respuesta al final de la inducción (generalmente a los 3-4 meses), al final del tratamiento (8-12 meses), antes y

después de los procedimientos quirúrgicos, antes del trasplante de médula ósea y en caso de que exista indicación clínica.

2.2. ESTADÍSTICA:

2.2.1. VARIABLES CLINICAS:

2.2.1.1. Epidemiológicas: edad de los pacientes en el momento del diagnóstico, sexo y protocolo de tratamiento utilizado.

2.2.1.2. Localización del tumor primitivo:

Se ha recogido información sobre la localización del tumor primario, diferenciando claramente las siguientes localizaciones:

Cervical.

Mediastino.

Abdominal: Suprarrenal
 Paravertebral
 Celíaco

Pélvico

2.2.1.3. Localización de las metástasis:

También la localización de las metástasis se ha recogido, haciendo especial hincapié en diferenciar si son metástasis óseas o en médula ósea.

2.2.1.4. Estadio:

Se ha aplicado el sistema INSS de estadificación, que define los siguientes estadios: 1, 2, 3, 4, 5 o 4S. Estos estadios, actualmente se definen según el INRGSS en L1, L2, M, Ms. Los pacientes incluidos son estadios 4 o

metastásicos, que son los que actualmente entrarían dentro del grupo M. Además, se ha estudiado la distribución de las metástasis.

2.2.1.5. Situación actual del paciente:

Se ha recogido información sobre la situación actual de los pacientes:

a/ vivos y libres de enfermedad: VLE.

b/ vivos con enfermedad: VCET

c/ fallecidos (bien por enfermedad y / o complicaciones).

Se ha realizado un seguimiento temporal de los enfermos, considerado en meses desde el momento del diagnóstico hasta el momento de la revisión.

2.2.1.6. Recaída:

Se ha recogido información sobre la existencia de recaídas, tanto locales como diseminadas, anotando la fecha y localización de las mismas.

2.2.1.7. Fallecimiento:

Se ha estudiado la causa de fallecimiento y su fecha, en los casos en los que se ha producido.

2.2.2. VARIABLES SERICAS

2.2.2.1. ENOLASA:

Para la determinación de ENE, realizada en el servicio de Medicina Nuclear, se emplea la técnica de análisis radioinmunométrico (proporcionado por una casa comercial: DRG- NSE RIA) que utiliza dos anticuerpos monoclonales (uno de ellos con I^{125} como trazador).

El procedimiento analítico consiste en una radioinmunometría sobre fase sólida con dos anticuerpos monoclonales que actúan en "sándwich" sobre dos lugares diferentes de la subunidad gamma, permitiendo el reconocimiento de los dímeros alfa-gamma y gamma-gamma. Las precisiones intra e inter-ensayo (para concentraciones entre 7 y 104 ng/ml) están calculadas para el "Kit-" que utilizamos de ENE, siendo entre 1,7-2% y 3,1-4,5% respectivamente. La prueba de recuperación de ENE abarca desde el 92% al 103%, siendo el límite de sensibilidad de la técnica de 0,5 ng/ml. Se ha considerado normal hasta 14 ug/ml.

2.2.2.2. LDH:

Los valores están tipificados en UI/L. Las cifras normales en la infancia superan 1 a 2 veces las de la edad adulta (100 - 190 Units/L a 37° C).

2.2.2.3. FERRITINA:

La determinación de ferritina sérica se realizó por enzimoimmunoanálisis utilizando un anticuerpo frente a la ferritina sérica.

Sus cifras de normalidad están influidas por la edad del paciente, considerándose dentro de rango de normalidad los siguientes resultados:

Recien nacidos-12 meses:	< 350 ng/ml
> 12 meses:	<150 ng/ml

2.2.3. VARIABLES TISULARES:

2.2.3.1.HISTOLOGIA:

En el laboratorio de anatomía patológica, se realiza el estudio histológico de la pieza recibida después de fijarla en formaldehído e incluirla en parafina. Se tiñe con hematoxilina - eosina, según la técnica convencional.

Se han clasificado las piezas recibidas según 3 tipos patológicos diferentes, siguiendo los criterios generales recomendados por el INPC, descrito en la Introducción:

1.- Ganglioneuroma: Tumor neuroblástico formado por células ganglionares maduras con prolongaciones neuríticas en un estroma con un predominio de células de Schwann y sin neuroblastos.

2.- Ganglioneuroblastoma: Son aquellos tumores neuroblásticos con dos componentes diferenciados:

A) uno rico en estroma con células de Schwann maduras rodeadas por escasas células gangliónicas diferenciadas.

B) un componente pobre en estroma con células neuroblásticas.

La proporción de ambos componentes en la muestra estudiada puede ser variable.

3.- Neuroblastoma: Se definen como tumores neuroblásticos pobres en estroma Schwanniano, aunque se pueden encontrar células de Schwann en los septos fibrovasculares entre lóbulos tumorales. Abundan los neuroblastos malignos.

2.2.3.2. CLASIFICACION DE SHIMADA:

Los tumores se han clasificado según los criterios descritos por Shimada¹⁶⁷ expuestos en la Introducción.

Para el análisis estadístico se han separado en:

1- De histología favorable: Estroma rico bien diferenciado, estroma rico intermedio, pobre en estroma por debajo de 18 meses de edad y pobre en estroma entre 18 meses y 5 años, en diferenciación y con un índice mitosis-cariorexis inferior a 100.

2.- De histología desfavorable: Estroma rico nodular, estroma pobre por encima de 5 años de edad, estroma pobre entre 18 meses y 5 años, indiferenciado, con un índice mitosis-cariorexis superior a 100.

2.2.4. VARIABLES GENETICAS:

2.2.4.1. Aislamiento de DNA genómico:

Para el estudio genético es necesario extraer el DNA de las muestras recibidas según el método de separación con fenol descrito por Sambrook¹⁶⁸

2.2.4.2. Amplificación del oncogén N-Myc y delección 1p:

La **amplificación del oncogén N-Myc** se ha analizado inicialmente por PCR (a partir del año 1995 de forma obligatoria como parte del protocolo NII92) y se ha identificado el número de copias mediante Southern Blot. Excepto los pacientes tratados con el protocolo de HRNBL en los que se realizó por FISH (a partir del año 2000).

Las improntas celulares con más de 200 células neuroblásticas fueron utilizadas para detectar amplificación de MYCN y para conocer la delección de la región 1p36 por FISH. Las sondas utilizadas y las condiciones de hibridación, lavados, detección han sido previamente descritas ^{4,5}. Brevemente, se utilizaron sondas QBIOgene N-Myc (2p24)/ 2 a-satélite y 1p36 midisatélite/ 1 alfasatélite de doble color. La hibridación se realizó en cámara húmeda a 37° C durante 16 horas. Los lavados posteriores se hicieron con 50% formamida/2X SSC y 2X SSC. Las preparaciones fueron contrateñidas con Dapi/antifade. Se analizaron de 200 a 500 núcleos por caso con un microscopio epifluorescente Zeiss axioplan2.

La amplificación de MYCN fue considerada cuando existía incrementado más de 4 veces el número de señales de N-Myc en relación con el número de señales de cromosoma 2 alfa-satélite. La ganancia de MYCN fue reconocida cuando aparecía de 1 a 4 veces incrementado el número de señales de N-Myc en relación con el número de señales de cromosoma 2 alfa-

satélite. La amplificación de N-Myc también se estudió con PCR diferencial con el gen de la beta-globina.

Para la detección de secuencias de ADN N-Myc en suero se extrajo ADN a partir de 200 microlitros de plasma o suero utilizando el QI Ampl. Blood KIT (Quiagen), seguido de amplificación por PCR y Real Time PCR cuantitativa usando el sistema Taqman detection y el ABI Prism 7700 sequence detection system (Applied Biosystems), utilizando como gen de referencia el Prol1beta localizado en 2q13-24.

- PCR: La amplificación del oncogén N-myc se identificó por comparación visual con las intensidades relativas de las bandas de los productos de N-myc y globina:

a) Cuando la banda de la β -globina era de intensidad similar a la del N-myc, se consideró que la muestra poseía una copia única del oncogén.

b) Cuando la intensidad de señal del N-myc era mayor a la de la globina, la muestra se consideró amplificada y se procedió a identificar el número de copias mediante Southern Blot.

- Southern Blot: Para realizar el Southern Blot se utilizó la técnica descrita por Brodeur y cols⁶¹ en 1984, utilizando la sonda pNB-1, de 1 kilobase, de Oncor.

Se han considerado 3 situaciones diferentes según el número de copias del oncogén:

A/ Entre 0 y 3 copias: No existe amplificación.

B/ Entre 3 - 10 copias: Se trata de una amplificación del oncogén de significado pronóstico dudoso o no bien conocido hasta la actualidad.

C/ Superior a 10 copias: Amplificación clara del oncogén, con un valor pronóstico muy negativo.

- FISH⁵⁹: En este caso, es necesario que existan al menos 500 células tumorales adecuadas para su análisis (en el caso de la PCR, el contenido de células tumorales debe ser al menos del 60%).

Las sondas que pueden utilizarse son: Oncor (o Vysis), pNb9, pNb101, o una sonda específica para el centrómero (D2Z, Oncor), que evita la malinterpretación de las asociaciones centroméricas.

Si existen más de 3 señales Nmyc, se debe utilizar la sonda de referencia específica para el cromosoma 2, para discriminar ganancias de polisomías de este cromosoma. De este modo, el número de copias de Nmyc se informa siempre en relación al número de cromosomas 2.

La delección de 1p36 fue detectada por la presencia única de una región subtelomérica del brazo corto del cromosoma 1 (p36 midisatélite). Consideramos como desequilibrio de 1p36 cuando existía una desproporción entre el número de centrómeros del cromosoma 1 y la región 1p36, siempre con la existencia de más de una región subtelomérica del brazo corto del cromosoma 1.

Utilizamos la técnica de CGH descrita por Kallioniemi y colaboradores⁶ con algunas modificaciones.

Se analizaron entre 10 y 20 metafases por caso con un microscopio epifluorescente Zeiss axioplan2 con video cámara CCD S31. El análisis de las imágenes se hizo usando el software ISIS v.3.1. Considerando los ratios verde/rojo $>1,2$ y $>1,5$ como número de copias de ADN con ganancia y amplificación, respectivamente, y ratios $<0,8$ como pérdidas del número de copias de ADN.

2.2.4.3. Índice de ADN:

Se mide por citometría de flujo¹⁶⁹ sobre el tejido tumoral o médula ósea en fresco. Las suspensiones celulares se tiñen con yoduro de propidio y se analizan en el citómetro de flujo.

El índice de DNA se determina calculando la relación entre el contenido de DNA de las células tumorales en fase G0 / G1 y el de las células diploides normales. Simultáneamente las extensiones se tiñen con la técnica de Wright para ver el tanto por cien de células tumorales y de leucocitos sanguíneos contaminantes.

Se considera que una línea celular tiene un índice de DNA indistinguible de las células diploides normales (Índice de DNA = 1) cuando el tanto por ciento de células en el pico diploide del histograma es, al menos, 20% mayor que el tanto por ciento de leucocitos sanguíneos determinados en el análisis morfológico. Cuando hay varias líneas celulares diferentes, se da valor sólo al índice de DNA de la línea de menor ploidía. Por tanto:

Consideremos en el caso de los neuroblastoma que aquellos tumores con:

Índice de DNA = 1 (Euploide) tienen mal pronóstico

Índice de DNA < 1 (Hipoploide) tienen mal pronóstico

Índice de DNA > 1.6 (Hiperploide) tienen buen pronóstico

Índice de DNA > 2 (Tetraploide) tienen mal pronóstico.

Los tumores fueron analizados genéticamente usando la técnica de citometría estática, de FISH y de CGH. Para ello se realizaron secciones de las piezas incluidas en parafina, improntas celulares y se extrajo ADN de la misma pieza tumoral utilizada para el estudio histopatológico.

Para interpretar los resultados de todas estas técnicas genéticas fue imprescindible conocer el porcentaje de células neuroblásticas en las secciones tumorales.

Para la medición del índice de ADN por citometría estática se utilizaron secciones de material incluido en parafina de 6 micras de grosor teñidas con el reactivo de Feulgen (hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 30-50 minutos y Schiff 1 hora) y el sistema de análisis de imagen Olympus CUE-2. Se midió la densidad óptica integrada de 250-500 núcleos de células tumorales y 25-50 núcleos linfocitarios (referencia interna) por caso y los resultados se basaron en el Consenso Europeo ³.

2. 5. – ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se realizó con la ayuda del programa informático SPSS 15.0 para Windows.

Se creó una base de datos con todos los pacientes estudiados durante el periodo descrito, recogiendo las variables descritas.

Para el cálculo del tiempo de supervivencia, se ha utilizado el tiempo transcurrido entre la fecha de fin del tratamiento de inducción y la fecha de fallecimiento o de última revisión en caso de estar vivo. De este modo, se evita el sesgo que podría aparecer debido a que los pacientes han recibido tratamientos similares, pero en base a 2 protocolos en los que el tiempo de administración del tratamiento de inducción fueron diferentes.

Hemos definido EVENTO como fallecimiento o recaída en nuestra base de datos.

Variables codificadas:

<i>Fecha de nacimiento</i>	<i>Fecha</i>	
Fecha de diagnóstico	Fecha	
Fecha fin de tratamiento de inducción	Fecha	
Edad	Numérica	
Protocolo de Tratamiento	Categoría	1: N292, NAR99
		2: HRNBL-1
Localización	De cadena	C: Cervical
		M: Mediastínica
		S: Suprarrenal
		Ot: Otros

		P: Pelvis
		V: Paravertebral
		A: Abdominal
Localización tumor primario otros	Cadena	
Localización metástasis	De cadena	MO: Médula ósea
		O: Ósea
		H: Hígado
		G: Ganglios a distancia
		X: Otros
Metástasis médula ósea	Categorica	0: No
		1: Si
Metástasis óseas	Categorica	0: No
		1: Si
Fecha fin inducción	Fecha	
Respuesta al tratamiento de inducción	De cadena	RC: Remisión completa
		PR: Remisión parcial
		MBRP: Muy buena Remisión parcial
		NR: No respuesta

		PE: Progresión de la enferm
Tratamiento adicional		
Pre-TAMO	Categoría	0: No
		1: Si
Detalle tto adicional	De cadena	
TAMO	Categoría	0: No
		1: Si
Radioterapia	Categoría	0: No
		1: Si
MO morfol pre-TAMO	Categoría	0: No
		1: Si
Recaída	Categoría	0: No
		1: Si
Fecha Recaída	Fecha	
Recaída local	Categoría	0: No
		1: Si
Recaída M Ósea	Categoría	0: No
		1: Si

Recaída Ósea	Categorica	0: No
		1: Si
Otro tipo recaída	De cadena	
Tratamiento recaída	De cadena	
Situación	Categorica	1: Fallecido
		2: Vivo con tumor
		3: Libre enfermedad
Tseguim	Numérica	Meses
Tseguim hasta recaída o última visita	Numérica	Meses
Fallecimiento	Categorica	0: No
		1: Si
Fecha de fallecimiento	Fecha	
Causa de fallecimiento	De cadena	1: Complicación
		2: Progresión de enfermedad
LDH	Categorica	0: Normal
		1: >500
		2: >1000
LDH	Numérica	

ENE	Categoría	0: <20
		1: 20-100
		2: >100
ENE	Numérica	
Ferritina	Categoría	0: Normal
		1: <1año: >350
		>1año: >145
Ferritina	Numérica	
Shimada/INPC	Categoría	0: Favorable
		1: Desfavorable
Indice DNA	De cadena	0: No valorable
		1: Aneuploide
		2: Diploide-tetraploide
		3: Triploide
N-myc	Categoría	0: No amplificado
		1: Amplificado
Del 1p	Categoría	0: No
		1: Si

MIBG pre	tratamiento	Numérica
Tecnecio pre tratamiento	Categórica	0: Negativo
		1: Positivo
MIBG post-inducción	Numérica	
TH	Categórica	0: Negativo
		1: Positivo débil
		2: Positivo
DCX	Categórica	0: Negativo
		1: Positivo débil
		2: Positivo
Tseguim	Numérica	Meses
Tiempo	Numérica	Meses
Tiempo recaída desde el diagnóstico TrecDx	Numérica	Meses

2.5.a. - ESTADISTICA DESCRIPTIVA:

La estadística descriptiva estudia unos determinados caracteres o aspectos referidos a un colectivo de personas, objetos y elementos de una naturaleza específica. Los caracteres estudiados reciben el nombre de variables.

Nuestro estudio estadístico se inició con el análisis descriptivo numérico de las variables, principalmente: MEDIA, MEDIANA, DESVIACIÓN TÍPICA, VARIANZA, RANGO, RANGO INTERCUARTÍLICO, CUARTILES.

Para la presentación de los datos, nos hemos apoyado en gráficos como: DIAGRAMA DE SECTORES, DE BARRAS, HISTOGRAMA, DIAGRAMA DE CAJAS, DE DISPERSIÓN.

2.5.b.- ESTADISTICA INFERENCIAL:

La Inferencia Estadística nos permite extrapolar los resultados a la población objeto del análisis, distinguiendo dos vertientes principales: la paramétrica y la no paramétrica. En el primer caso (PRUEBAS PARAMETRICAS) la población se supone que sigue una distribución normal. Sin embargo, en la mayor parte de ocasiones las hipótesis relativas al tipo de distribución de la población no siempre pueden ser comprobadas. Puede ocurrir que el tamaño de la muestra sea demasiado pequeño, o que la experiencia con datos del mismo tipo sea muy limitada, o que la información relevante disponible sea insuficiente para comprobar las hipótesis a tener en cuenta. En cualquiera de estas situaciones, para extrapolar los resultados de la muestra a la población objeto de análisis, será necesario recurrir a METODOS NO PARAMETRICOS. En nuestro caso, debido a las características de nuestra población (enfermedad poco frecuente), hemos obtenido una muestra de tamaño intermedio, por tanto, después del estudio descriptivo se aplicaron

las técnicas de estadística inferencial de tipo no paramétrico según el tipo de variables a estudiar:

- Para comparar variables categóricas, se ha utilizado el test Chi Cuadrado en Tablas de Contingencia.
- Para variables continuas, se ha optado por el test U de Mann Withney en el caso de que existieran 2 grupos, y el test de Kruskal-Wallis si eran >2 grupos.
- Los tiempos de supervivencia se estudiaron mediante el Test de Kaplan-Meier y para la comparación de curvas de supervivencia se han utilizado los test: Log Rank y Breslow según las características de la curva.
- Como un método multivariante del análisis de supervivencia, se han incluido co-variables en el análisis utilizando la Regresión de Cox.

Además del estudio de supervivencia global y libre de eventos, dado el mal pronóstico de estos pacientes, que lleva a una supervivencia muy baja, se ha estudiado el tiempo de supervivencia mediante el uso de “horizontes” de supervivencia definidos por percentiles, para poder analizar las diferencias existentes en cuanto el tiempo libre de recaídas, definiendo dos grupos en los que se han estudiado las diferentes variables expuestas anteriormente para encontrar diferencias:

- Tiempo de supervivencia ≥ 20 meses (percentil 25 del tiempo de supervivencia es 19,11 meses).
- Tiempo de supervivencia ≥ 90 meses (percentil 75 del tiempo de supervivencia).

PATIENTS AND METHODS

- Patients:

From a total of 138 patients diagnosed of Neuroblastoma at La Fe Children's Hospital (Valencia, Spain) between 1992 and 2007, we have reviewed 28 patients who were Stage 4 Neuroblastoma. They had received homogeneous treatment consisting of induction chemotherapy followed by consolidation therapy based on megatherapy and peripheral blood stem cells rescue and local radiation +/- 13-cis-retinoic acid (in patients enrolled from 1999). We restricted the current study to patients with stage 4 neuroblastoma due to their worse prognosis. Parents or guardians gave informed consent in accordance with Spanish law for their children's treatment, based on the consecutive approved Neuroblastoma Management Protocols that were sponsored by the Spanish Society of Paediatric Oncology.

Data extracted from medical records included dates of birth and diagnosis, progression, and death or last visit; evaluation of response after induction chemotherapy; MYCN copy number, lactate dehydrogenase level, 1p deletion status, ¹²³I-MIBG score at diagnosis and after induction chemotherapy and other prognosis factors (See tables in Results Chapter).

Diagnosis was based on either histologic examination of tumor tissue or by bone marrow infiltrated with tumor cells and elevated urinary catecholamine levels. MYCN copy number was analysed by fluorescence in situ hybridisation using standard techniques^{46,59}. All patients were staged

according to International Neuroblastoma Staging System (INSS) criteria²⁰, and extent of disease was evaluated by ultrasonography, computed tomography scan (or magnetic resonance imaging scan), two to four bone marrow aspirates and two biopsies. Skeletal assessment of neuroblastoma was performed with ¹²³I-MIBG or ⁹⁹Tc bone scan if negative.

Clinical monitoring of tumour markers was carried out by serial measurements of urinary excretion of catecholamine metabolites, vanilmandelic and homovanillic acids and dopamine. Response to therapy was assessed according to INRC²⁰ criteria after completion of induction regimen (70 or 90 days depending on the protocol), just before consolidation with high-dose therapy and PBSC rescue.

- Therapy

All patients received chemotherapy, according to multiagent induction chemotherapy as previously described (N292,HRNBL1). Surgical resection of all gross residual disease was then performed if resectable¹⁷⁰; tumor response was re-assessed afterwards. If they attained complete response (CR), PBSC were harvested; whereas those patients enrolled in HRNBL1 protocol who attained partial remission received an additional 1-2 cycles of TVD at least until bone marrow response was achieved for PBSC harvesting.

Patients with adequate organ function, no evidence of active infection, and no evidence of disease progression then proceeded to

consolidation therapy consisting of megatherapy¹⁷¹ and PBSC rescue followed by local radiation to the site of the primary tumour. Metastatic foci were not radiated, regardless of whether or not there was persistent MIBG positivity. Patients enrolled in HRNBL1 protocol received 13-cis-retinoic acid beginning 80 to 100 days following the last cycle of high-dose therapy and PBSC rescue. All therapy given before myeloablation is labelled induction therapy in this report.

- Hematopoietic Stem-Cell Processing

PBSCs were harvested and processed as previously described. Aliquots were removed to perform total cell count, CD34+ cell quantification, hematopoietic progenitor cell assays, minimal residual disease (TH, DCX) and bacterial and fungal cultures.

- ¹²³I-MIBG analysis

At diagnosis, the scintigrams were obtained after a slow intravenous injection of ¹²³I-MIBG (Dose: 100 µCi /kg of ¹²³I-MIBG).

Patients were pre-treated with potassium iodide (Lugols 5% solution) which was administered orally 24 hours before radiopharmaceutical administration and was continued following imaging for a total of 3 days to prevent thyroid uptake of free radioactive iodine. No breakdown of the radiopharmaceutical was documented.

Multiple anterior and posterior spot scintigrams of the entire body including the cranium were obtained 20-24 hours following radiopharmaceutical injection using a scintillation camera set to a photopeak of 159 KeV. A minimum of 250,000 counts and a maximum of 500,000 counts were obtained for each view. ^{123}I -MIBG was used in all the MIBG studies performed following induction therapy¹⁶³.

The group of MIBG scans from each patient were read in a blinded fashion by two trained clinicians without knowledge of the interpretation of the original report made by the nuclear medicine physicians with good correlation.

- Semiquantitative Scoring of ^{123}I -MIBG

In an effort to quantitatively measure metastatic disease, each image was analysed using a ^{123}I -MIBG scoring system based on SIOPEN scoring system and those published in the literature^{116,155-158}.

In brief, the skeleton was divided into 7 anatomic sectors for osteomedullary lesions: (1) skull vault; (2) base of the skull-orbit or facial bones; (3) spine; (4) ribs and sternum; (5) pelvis; (6) lower limbs; (7) upper limbs. In each region, the lesions were scored for extension as follows: 0, no pathologic localization; 1, abnormal localization in one locus; 2, abnormal localization in more than one locus or diffuse. Intensity of uptake was recorded as well in this analysis with this scoring: 0, absent; 1, possible or equivocal; 2, definite but weak; 3, definite and strong.

The primary tumour and soft tissue lesions were not scored.

A total ^{123}I -MIBG Score was then calculated by adding the individual scores of all 7 zones (maximum score 35).

- Statistical Analysis

OS and EFS of patients according to MIBG score following induction therapy were compared. The Kaplan-Meier method was used to estimate (5 year EFS) probabilities. EFS functions were compared by the log-rank test.

For statistical comparisons, continuous relative and absolute scores were transformed into categorical variables according to their median values. Correlation of scores with disease response and bone marrow response were tested with the Chi^2 test using the median score at a given time point. Survival and EFS curves were estimated by the Kaplan-Meier method and compared by the log-rank test. Correlations of MIBG response with MYCN gene amplification, chromosome 1p deletion, and serum lactate dehydrogenase were based on the Chi^2 test.

RESULTADOS

RESULTADOS:**1.- CARACTERISTICAS GENERALES DE LA MUESTRA Y ESTUDIO DE LAS VARIABLES:**

Se ha estudiado la aplicación de un score o método semicuantitativo para la evaluación de la respuesta al tratamiento quimioterápico de inducción en pacientes diagnosticados de neuroblastoma metastásico. Para ello, se han revisado de forma retrospectiva los pacientes diagnosticados de Neuroblastoma metastásico en nuestra Unidad de Oncología Pediátrica en un periodo de tiempo comprendido entre marzo de 1992 y marzo de 2007, con un seguimiento de al menos 47 meses (fecha de última revisión enero 2010). Durante dicho periodo, en nuestra Unidad se diagnosticaron 1580 niños de cáncer, siendo 138 neuroblastomas. De ellos, 28 fueron metastáticos, y han sido objeto de nuestro estudio. Sobre el total de los estudiados, 21 fueron chicos (75%) y 7 chicas (25%).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA	Media	Mediana	Rango intercuartílico (25-75)	Desviación típica
Edad	3,46 años	3,11 años	1,58-5,05 años	2,41
Tiempo de Seguimiento hasta Recaída	16,74 meses	17,5 meses	11-21,8 meses	7,98
Tiempo de Supervivencia	59,98meses	33,15 meses	19,11-91,2 meses	61,32
Score MIBG al diagnóstico	13,54	10	3-27,25	12,27
Score post-inducción	1,27	0	0-0,75	2,78
Score relativo (postinducción/diagnóstico)	0,1			
Score MIBG diagnostico *	17,6	13,5	6,5-28,75	11
Score MIBG post-inducción *	1,65	0	0-3,75	3,08
Score relativo (postinducción/diagnóstico)*	0,1			
LDH	2477	1327	908-3420	2550
ENE	118	116	29-172	100
FERR	214,5	162	68-194	269,79
Supervivencia global a 5 años Supervivencia libre de enfermedad a 5 años	28,6% 13,6%			

*Estudiando sólo a aquellos pacientes cuya MIBG al diagnóstico es >0.

Se ha realizado un análisis estadístico descriptivo de las puntuaciones de MIBG, tanto al diagnóstico como tras la inducción, diferenciando dos grupos:

- Estudio de los pacientes en los que la MIBG se realizó (26/28).
- Estudio de los pacientes en los que la MIBG fue positiva, es decir, aquellos en los que las metástasis óseas captaron MIBG al diagnóstico (20/26).

En la tabla superior, se analizan de forma separada ambos grupos, ya que la MIBG, aunque tiene una Sensibilidad muy elevada en los pacientes con NB, no siempre es positiva en ellos, dando lugar a un Falso Negativo, y por lo tanto a un sesgo. Por ello, se han analizado de forma separada aquellos pacientes con MIBG positiva al diagnóstico y aquellos en los que la MIBG fue negativa, y por lo tanto, las metástasis no fueron vistas mediante esta técnica.

CARACTERÍSTICAS ESTUDIADAS		N=28	% SOBRE DATOS COMPLETOS
Protocolo de tratamiento:	NII92, NAR991	19	67,9%
	HRNBL	9	32,1%
Sexo:	Niños	21	75%
	Niñas	7	25%
Localización tumoral:	Suprarrenal	20	71%
	Abdominal no suprarrenal	5	17,8%
	Mediastínico	3	10,7%
	Paravertebral	8	28%
Metástasis al diagnóstico:	Médula ósea	24	86%
	Óseas	23	82%
	Ambas	20	71%
	Sólo Médula ósea	4	14%
	Sólo óseas	3	11%
ENE Normal	8	31%	
ENE Patológica	18	69%	
>20	5	28%	
>100	13	72%	
No evaluados	4		
LDH Normal	3	12%	
LDH Patológica	23	88%	
>500	4	17%	
>1000	19	83%	
No Evaluados	2		

Ferritina	Normal	19	70%
	Patológica	8	30%
	No Evaluados	1	
Shimada	Favorable	9	41%
	Desfavorable	13	59%
	No Evaluados	6	
N-Myc	Amplificado	8	32%
	No Amplificado	17	68%
	No Evaluados	3	
Delección 1p valor	Presente	10	45%
	Ausente	12	55%
	No Evaluado	6	
Ploidía	Aneuploide	7	41%
	Diploide-tetraploide	7	41%
	Triploide	3	17%
	No Evaluados	11	
Evaluación post-inducción:	Respuesta completa	8	28,5%
	Muy buena respuesta parcial	8	28,5%

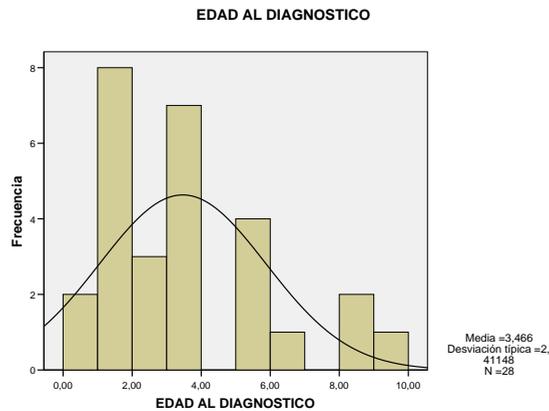
		Respuesta parcial	12	43%
Score MIBG post-inducción:		=0	20	77%
		>0	6	23%
		No Evaluados	2	
No Recaídas			6	21,4%
Recaídas			22	78,6%
Tipo de recaída	Médula ósea (Sólo: 2)		10	45%
	Ósea (S)		15	68%
	Ambas		8	36%
	Local aislada		3	13,6 %
	Atípicas:	Pulmón (+local)	1	3,5%
		SNC	1	3,5%
		Hepática (+ósea)	1	3,5%
Fallecidos:			20	71%
Supervivencia global a 5 años:			8	29%

DIFERENCIAS SEGÚN PROTOCOLO DE TRATAMIENTO (Prueba Chi-Cuadrado, excepto en la comparación de edades, en la que se utiliza el Test U-Mann-Whitney).

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	PROTOCOLO NII92-NAR99 N=19	PROTOCOLO HRNBL-1 N=9	p VALOR
Mediana de edad	2,42	3,17	0,78
Clínica al diagnóstico Asintomáticos al diagnóstico	13 3	6 2	0,88
Metástasis óseas No metástasis óseas	16 3	7 2	0,68
Metástasis en médula ósea No metástasis en médula ósea	16 3	8 1	0,74
Respuesta tras inducción Remisión Completa Buena Remisión Parcial Remisión Parcial	7 6 6	1 2 6	0,18
Recaída No Recaída Tipo de Recaída: Local Ósea Médula ósea Ambas Otras	13 6 2 2 2 4 3	9 0 1 4 0 4 0	0,057 0,085
Fallecimiento a 5 años	13	7	0,004
Aumento LDH LDH normal	14 3	9 0	0,18
Aumento ENE ENE normal	13 6	5 2	0,88
Aumento Ferritina Ferritina normal	5 14	3 5	0,56
MIBG pre-inducción			0,33
MIBG post-inducción >0 ≤0	3 15	3 5	0,25
Shimada desfavorable Shimada favorable	8 6	5 3	0,8

Indice ADN			
Aneuploide	7	0	0,04
Di-tetraploide	5	2	
Triploide	0	3	
Amplificación N-Myc	3	5	0,046
No amplificación N-Myc	14	4	
Delección 1p	6	4	0,94
No delección 1p	7	5	

- La media de edad de los pacientes analizados es de 3,46 años (41,5 meses), con un rango entre 0,48 y 9,28 años. La mediana de edad al diagnóstico es 3,11 años (37,3 meses). Dos pacientes (6,9 %) son menores de un año.



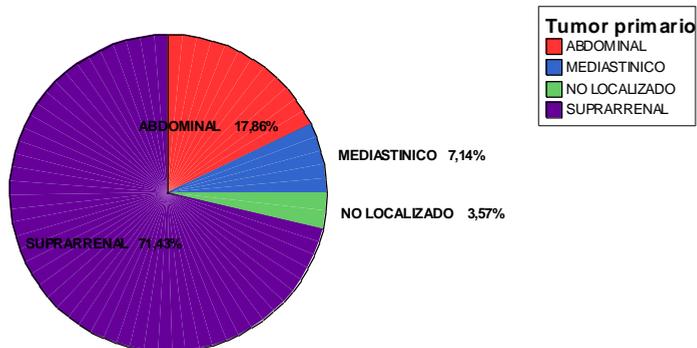
- Protocolo de tratamiento:
 - N-I-92 y NAR-99: 19 pacientes (67%).
 - HRNBL-1: 9 pacientes (32,1%).
- Sexo: Veintiuno son niños y 7 niñas.
- En todos ellos, el estadio de la enfermedad al diagnóstico, según criterios INSS, fue enfermedad metastásica o estadio 4, lo que con la nueva clasificación INRGSS correspondería a I estadio M.
- En 19 de 24 pacientes evaluados, había sintomatología clínica al diagnóstico (21%). La sintomatología dependía de la compresión e

infiltración de órganos vecinos, de las metástasis y en ocasiones de síndromes paraneoplásicos como el síndrome de “malestar maligno” caracterizado por palidez, anemia, dolor de extremidades y febrícula que se vió en 12 pacientes. En los tumores paraespinales, el cuadro de compresión medular por invasión del canal a través de los agujeros de conjunción fue lo más frecuente (8 casos).

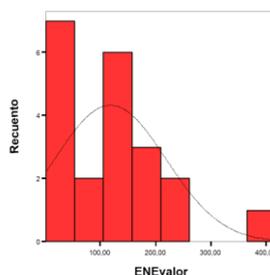
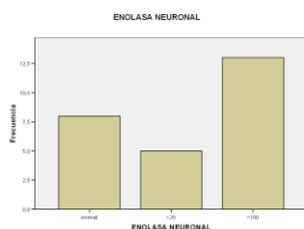
- Localización del tumor primario: Predominan los tumores de localización abdominal, como puede verse en la tabla, siendo la mayoría suprarrenales. Hubo un caso en el que no se encontró tumor primario. En general, está descrito que en el 1% de los casos no se identifica un tumor primario.

Hubo dos casos de localizaciones atípicas de tumores neuroblásticos: próstata y riñón.

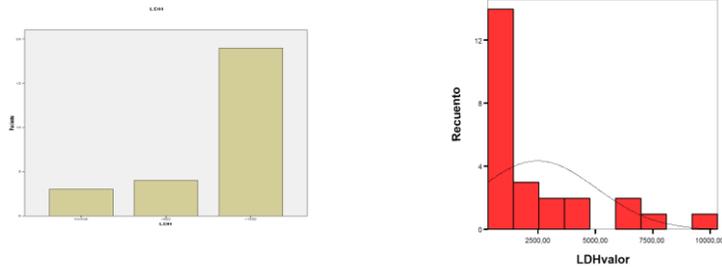
LOCALIZACIÓN	N=28	%
Suprarrenal	20	71,4%
Abdominal No suprarrenal	5	17,8%
Mediastínico	3	10,7%
*Afectación paravertebral	8	28%



- El 86% de los pacientes (n=24) tenían metástasis en médula ósea al diagnóstico, utilizando los métodos convencionales.
- Veintitrés pacientes presentaban metástasis óseas al diagnóstico (todas ellas diagnosticadas según los criterios marcados en el protocolo de tratamiento utilizado).
- El 71% de los pacientes estudiados (20/28) presentaban metástasis en médula ósea y óseas al diagnóstico, 4 pacientes las presentaron sólo en médula ósea y 3 sólo en hueso. Tres pacientes asociaban metástasis hepáticas y un paciente metástasis intracraneales extraparenquimatosas.
- Los valores de enolasa neuronal específica estaban elevados en el 69% de los pacientes(18/26 casos en los que se estudió); además, en 13 de ellos era superior a 100.

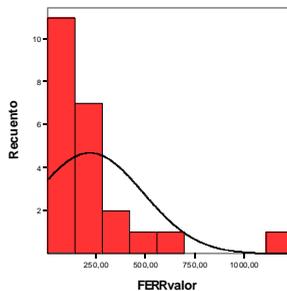


- La LDH estaba aumentada (>500) en el 88% de los pacientes en los que se estudió (23/26), siendo >1000 en 19 pacientes (73 %).



- La determinación de la ferritina al diagnóstico se realizó en 26 pacientes, estando aumentada en 8 (29%).

FERRITINA	n	%
FERRITINA normal	19	70%
>145 (>1 a) o > 350 (< 1a)	8	30%
Total	27	100%

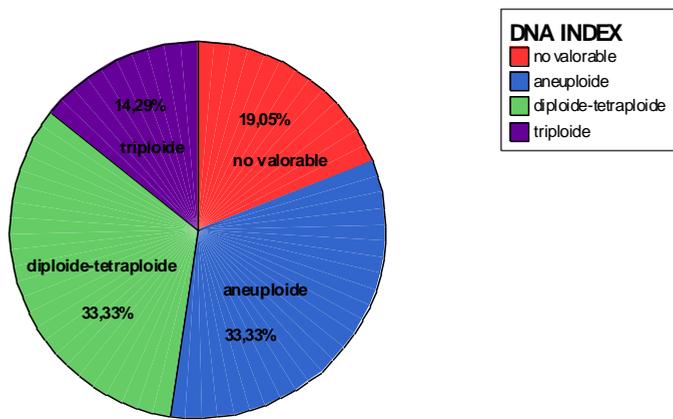


- El diagnóstico histopatológico de la mayoría de los tumores fue neuroblastoma, excepto en 3 casos que fueron ganglioneuroblastomas.
- El 59% de los casos (13/22) fueron desfavorables según la Clasificación de Shimada.

- Se estudió la amplificación N-Myc en 26 tumores, detectándose 8 amplificaciones, lo que supone un porcentaje superior a lo esperable, del 30 % (en general, la amplificación N-Myc se encuentra en un 20% de los tumores metastásicos según la literatura². En el protocolo de tratamiento NII92 no fue obligatoria la determinación de N-Myc hasta el año 1995, y en los casos en los que se hizo fue sólo por PCR.

N-Myc	PACIENTES	PORCENTAJE
No amplificado	18	70%
Amplificado	8	30%
Total	26	100%

- En 22 pacientes se estudió la delección 1p, estando presente en 10 de ellos (43%), lo que también supone un porcentaje importante, ya que en las series publicadas se encuentra en un 35% de los casos², aunque en nuestra serie se trata de tumores metastásicos, y ello podría aumentar su %.
- El índice de DNA o ploidía se estudió en 21 pacientes, siendo: no valorable en 4 casos, aneuploide en 7, triploide en 3 y diploide-tetraploide en 7 casos (41%).



PLOIDIA	N	%
ANEUPLOIDE	7	33,0%
DIPLOIDE-TETRAPLOIDE	7	33,0%
TRIPLOIDE	3	14,3%
NO VALORABLE	4	19,0%
TOTAL	21	100,0%

		Índice de ADN				Total
		No valorable	Aneuploide	Diploide-tetraploide	Triplóide	
PROTOCOLO	NII92, NAR99	4	7	5	0	16
	HRNBL-1	0	0	2	3	5
Total		4	7	7	3	21

- De los 28 pacientes, 25 recibieron consolidación del tratamiento mediante megaterapia y rescate autólogo con progenitores hematopoyéticos, lo que supone un 89,3%), los otros 3 fueron intervenidos para realizar una cirugía diferida y se consolidaron con quimioterapia convencional.
- La respuesta al tratamiento de inducción, previo al trasplante, se evaluó mediante: pruebas de imagen (incluida MIBG), y médula ósea (aspirados y biopsias), diferenciándose: Respuesta completa (RC 8), muy buena respuesta parcial (MBRP 8), respuesta parcial (RP 12).

RESPUESTA A LA INDUCCIÓN	PACIENTES	PORCENTAJE
RESPUESTA COMPLETA	8	28,6 %
BUENA RESPUESTA PARCIAL	8	28,6 %
RESPUESTA PARCIAL	12	43,0 %
Total	28	100,0 %

- Tras el tratamiento de inducción, se realizó una 2ª cirugía en 23 pacientes, (como estaba previsto por protocolo en caso de persistir tumor primario resecable), en siete pacientes fue necesaria quimioterapia adicional previo a la consolidación y en 1 caso se aplicó radioterapia local previa.
- La aplicación del score semicuantitativo de la MIBG, se realizó en 26 pacientes. Al diagnóstico, la puntuación media fue de 13,54 (rango= 0-35) y la mediana de 10. Tras la inducción, la puntuación media fue de 1,27 (rango= 0-2,8).
- En la evaluación tras la inducción, la mayoría de los pacientes (77%) presentaban un valor de score de MIBG de 0 (n=20); pero en 6 pacientes el score fue > 0, es decir, todavía quedaban zonas captantes en la MIBG. En estos pacientes, los scores al diagnóstico fueron de 29, 14, 25, 4, 8, 35; lo que supone una media de 19,2 (superior a la media general, que es de 13,54). El score post-inducción fue de 12, 13, 5, 4, 4, 5; lo que supone una media de 7,2. El score relativo fue de 0,4; 0,9; 0,2; 1; 0,5; 0,14; con una

media de score relativo de 0,5. Todos ellos recayeron y han fallecido (100%). En un apartado posterior, se estudian detalladamente.

- De los 28 pacientes estudiados, 22 recayeron posteriormente (78,6%) y de ellos, 19 han fallecido a pesar de diversos tratamientos de segunda línea. Ocho pacientes siguen vivos, 2 de ellos con enfermedad estable.
- La evaluación tras tratamiento de inducción de los 6 pacientes que no han recaído fue: Remisión completa (2), Muy buena respuesta parcial (1), Respuesta parcial (3); en todos ellos, la médula ósea fue negativa. Sólo requirieron tratamiento local pre-TPH, ya que las metástasis habían desaparecido. Por tanto, se realizó cirugía diferida y en un caso se añadió radioterapia local pre-TPH.
- Recaídas: En 22/28 pacientes (78,6%)
- Las localizaciones iniciales de las recaídas fueron:
 - Recaída inicialmente local: 3 casos (13,6%).
 - Médula ósea: 10 casos (45%). (Aislada: 2).
 - Recaída ósea: 15 casos (68%). (Aislada: 5. +SNC: 1 +Local: 1).
 - Recaída ósea y médula ósea: 8 casos (36%). + Local: 2.
 - Otras localizaciones: Local+pulmón (1), sistema nervioso central (1), hepática + ósea (1).

RECAÍDA	LOCAL	METASTÁSICA	LOCAL+METASTÁSICA
N	3	15	4

RECTIPO

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	NO	6	21,4
	SOLO LOCAL	3	10,7
	MTX OSEA	6	21,4
	MTX MO	2	7,1
	MTX OSEA Y MO	8	28,6
	OTRAS	3	10,7
	Total	28	100,0

- La supervivencia global a 5 años ha sido del 28,6%. La media del tiempo de supervivencia global a 5 años fue de 55,12 meses (rango intercuartílico 25-75 de 19,11-76,15 meses), con una mediana de 31,83 meses. La supervivencia libre de eventos a 5 años fue de 13,6%, con una media de 16,74 y una mediana de 17,5 (rango intercuartílico 25-75 de 11-21,88 meses).

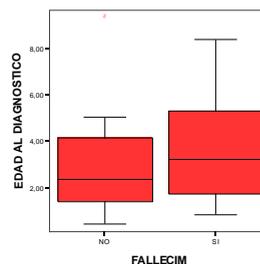
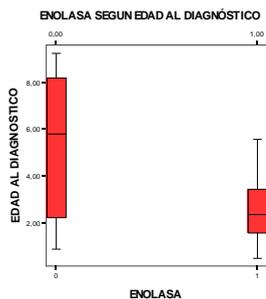
1.1.- **EDAD**(Test de Mann-Whitney; excepto cuando se comparan >2 grupos en el que se utiliza Kruskal-Wallis)

COMPARACIÓN DE MEDIANAS:	N	MEDIANA DE EDAD AL DIAGNÓSTICO (AÑOS)	p VALOR
Metástasis óseas al diagnóstico	No 5 Si 23	1,74 3,28	0,15
Metástasis en médula ósea al diagnóstico	No 4 Si 24	3,58 3,11	1
Recaída	No 6 Si 22	1,64 3,22	0,42
Recaída ósea	No 13 Si 15	1,69 3,28	0,20

Recaída en médula ósea	No 18 Si 10	1,77 3,53	0,01
Fallecimiento a 5 años	No 8 Si 20	2,4 3,24	0,47
Enolasa alterada	No 8 Si 18	5,8 2,3	0,08
Amplif N-Myc	No 18 Si 8	3,29 2	0,29
LDH alterada	No 3 Si 23	5,58 2,43	0,54
Ferritina alterada	No 19 Si 8	3,17 2,8	0,96
MIBG post-inducción*	=0 20 >0 6	2,8 4,5	0,14
Shimada	Fav 9 Desfav 13	2,43 3,17	0,87
Ploidía	Aneupl 7 Dipl-tetrapl 7 Triploide 3	2,43 1,81 3,28	0,76
Del 1p	No 12 Si 10	2,74 2,84	0,74

- Si se analiza el grupo de pacientes con MIBG positiva al diagnóstico (n=20):

MIBG post-inducción*	=0 14 >0 6	3,3 4,5	0,45
----------------------	---------------	------------	------



1.2.- AMPLIFICACIÓN N-Myc .

La presencia de amplificación N-Myc ha sido uno de los factores que han condicionado peor pronóstico en nuestros pacientes y en otras series revisadas en la literatura (junto al estadio, es considerado uno de los factores de mayor riesgo de recurrencia y fallecimiento), por ello, se ha analizado detalladamente.

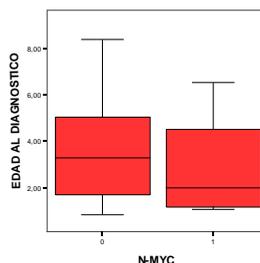
Ocho de los 26 pacientes en los que se realizó la determinación presentaban amplificación N-Myc.

Se utiliza el Test Chi-Cuadrado, excepto al comparar las medianas de edad, en el que se utiliza el test de Mann-Whitney).

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	N-Myc NO AMPLIFICADO n=18	N-Myc AMPLIFICADO n=8	p VALOR
Mediana de edad	3,29	2	0,29
Edad >1 año	17	8	0,49
Edad >18 meses	16	5	0,11
Clinica al diagnóstico Asintomáticos	12 4	6 1	0,84
Metástasis óseas No metástasis óseas	15 3	7 1	0,78
Metástasis en médula ósea No metástasis en médula ósea	16 2	7 18	0,78
Respuesta tras inducción Remisión Completa Buena Remisión Parcial Remisión Parcial	6 4 8	2 4 2	0,36
No Recaída Recaída Tipo de Recaída: Local	4 14 1	0 8 2	0,15

Osea	4	2	
Médula ósea	2	0	
Ambas	6	2	
Otras	1	2	
Fallecimiento a 5 años	12	8	0,063
No Fallecimiento	6	0	
LDH Normal	2	0	0,31
Aumento LDH	15	8	
>500	2	2	
>1000	13	6	
ENE normal	5	2	0,96
Aumento ENE	12	5	
>20	3	1	
>100	9	4	
Aumento Ferritina	5	2	0,82
Ferritina Normal	12	6	
MIBG post-inducción >0	13	5	0,79
MIBG post-inducción ≤0	4	2	
Shimada desfavorable	6	7	0,04
Shimada favorable	8	1	
Índice ADN			0,42
Triploide	2	1	
Di-tetraploide	4	3	
No evaluado	12	4	
Delección 1p	3	7	0,003
No delección 1p	11	1	

- La media de edad al diagnóstico fue diferente para ambos grupos, siendo de 2,89 años (rango 1,10-6,55 años), mediana de 2 años, para el grupo amplificado y de 3,56 (rango 0,86-8,39 años), mediana de 3,29 años, para los que no lo estaban.



- La localización del tumor primario en los casos con amplificación N-Myc fue abdominal, siendo 7 suprarrenales y uno paravertebral.
El paciente en el que no se identificó tumor primario no tenía amplificado el gen N-Myc (medido en las metástasis).
- El 86% de los pacientes con amplificación N-Myc (6/7) en los que se recogió el dato tenían sintomatología clínica al diagnóstico, comparado con un 75 % de los no amplificados (12/16).
- La existencia de metástasis óseas al diagnóstico según amplificación o no de N-Myc fue de 7/8 (87%) y 15/18 (83%) respectivamente y la de metástasis en médula ósea de 7/8 y 16/18 (88,8%).
- La respuesta al tratamiento de inducción, previo al trasplante de progenitores hematopoyéticos, fue de: RC 6, MBRP 4 y RP 8 en los 18 pacientes no amplificados; RC 2, MBRP 4 y RP 2 entre los 8 pacientes amplificados. Chi cuadrado: p valor 0,36.
- **La co-existencia de delección del cromosoma 1 se observó en 7 de 8 pacientes amplificados (87,5%), comparado con 3/14 estudiados no amplificados (21,4%). Chi cuadrado: p valor 0,003.**
- Las cifras de LDH al diagnóstico en el grupo amplificado fueron: entre 500 y 1000 en 2 casos y > 1000 en 6 casos. En el grupo no amplificado, en 2 casos se consideraron normales, entre 500 y 1000 en 2 casos y > 1000 en 13 casos. Chi cuadrado: p valor 0,31. Test exacto de Fisher (LDH alterada según grupo): p valor 0,46.

- Las cifras de ENE al diagnóstico en el grupo amplificado fueron: > 20 en 1 caso y > 100 en 4 casos. En el grupo no amplificado, en 5 casos se consideraron normales, > 20 en 3 casos y > 100 en 9 casos. Chi cuadrado: p valor 0,96. Test exacto de Fisher (ENE alterada según grupo): p valor 0,97.
- Las cifras de Ferritina al diagnóstico estaban incrementadas en 2 casos de los 8 totales, y en el grupo no amplificado en 5 casos de 17 totales. Chi cuadrado: p valor 0,82.
- **La media del score MIBG al diagnóstico es mayor en el grupo de los no amplificados; de 16,59 (0-35), con una mediana de 14; en el grupo de los amplificados la media es de 10 (0-30) con una mediana de 8.**
- **También la media del score de MIBG post-tratamiento de inducción fue mayor en el grupo de los no amplificados: 1,47 (0-12) vs 1,14 (0-4); aunque en el grupo de los no amplificados, la respuesta de las metástasis óseas fue mayor, con un cociente (score al diagnóstico/score tras inducción) de 11,25 comparado con 8,77 en los amplificados. Cuatro de los 17 pacientes no amplificados evaluados tenían un Score >0, mientras que en los amplificados, 2/7 lo tenían.**

AMPLIFICACIÓN N-Myc		NO AMPLIFICADO	AMPLIFICADO
Diagnóstico	Media	16,59	10
	Mediana	14	8
Post-inducción Media		1,4	1,14
Cociente de medias		11,25	8,77

- **En el grupo de los amplificados, 7/8 (87%) se consideraron Shimada desfavorable; en el grupo de los no amplificados, 6/14 lo fueron (43%). P valor 0,014.**
- Entre los pacientes con amplificación N-Myc, el índice DNA fue diploide-tetraploide en 3/8 (37%) casos valorables vs 4/18 (22%) valorables no amplificados. P valor 0,42.
- **El riesgo de recaída en los pacientes amplificados fue mayor que en los que no lo eran: 8/8 vs 14/18 (p valor 0.15); siendo el más importante el riesgo de recaída inicialmente local (2/8 vs 1/18 p valor 0.15). El riesgo de fallecimiento a 5 años también fue mayor en estos pacientes (p valor 0.06).**

1.3.- METÁSTASIS ÓSEAS AL DIAGNÓSTICO.

Se utiliza el Test Chi-Cuadrado, excepto al comparar las medianas de edad, en el que se utiliza el test de Mann-Whitney)

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	NO METÁSTASIS ÓSEAS AL DIAGNÓSTICO n=5	METÁSTASIS ÓSEAS n=23	p valor
Mediana de edad	1,74 años	3,28 años	0,15
Edad > 1 año= Edad >18 meses	3	19	0,26
Clínica al diagnóstico	3 1	16 4	0,9
Metástasis en médula ósea	4 1	20 3	0,68
Fallecimiento a 5 años	2 3	18 5	0,08
LDH normal Aumento LDH >500 >1000	1 3 0 3	2 20 4 16	0,36
ENE normal Aumento ENE >20 >100	0 5 2 3	8 13 3 10	0,097
Aumento Ferritina Ferritina normal	1 3	7 16	0,82
Shimada desfavorable Shimada favorable	3 1	10 8	0,47
Índice ADN Di-tetraploide Triploide No valorado	1 1 3	6 2 15	0,77 0,46
Amplificación N-Myc No amplificación	1 3	7 15	0,78
Delección 1p No delección 1p	2 1	8 11	0,43

- La edad media al diagnóstico en los pacientes que tenían metástasis óseas fue mayor, siendo de 3,72 años (0,86-9,28), con una mediana de 3,28 años. En aquellos pacientes sin metástasis óseas fue de 2,28 años (0,48-5,02) con una mediana de 1,74 años.
- No hubo diferencias en cuanto a la existencia de clínica al diagnóstico ni en cuanto a las cifras de LDH.
- De los 6 pacientes que no recayeron, 4 tenían metástasis óseas al diagnóstico.

RECTIPO

MTX OSEA			Frecuencia	Porcentaje
0	Válidos	NO	2	40,0
		SOLO LOCAL	2	40,0
		MTX OSEA Y MO	1	20,0
		Total	5	100,0
1	Válidos	NO	4	17,4
		SOLO LOCAL	1	4,3
		MTX OSEA Y MO	7	30,4
		MTX OSEA	6	26,1
		MTX MO	2	8,7
		OTRAS	3	13,0
		Total	23	100,0

- De los 23 pacientes con metástasis óseas al diagnóstico, 18 fallecieron (78%), comparado con 2 pacientes fallecidos de 5 que no las presentaban (40%).p valor 0,08.
- La ENE se encuentra alterada en mayor proporción en los que no tenían MTX óseas al diagnóstico (todos) y en 13/21 de los que sí las tenían. p valor 0,097.

ENOLASA NEURONAL

MTX OSEA			Frecuencia	Porcentaje
0	Válidos	>20	2	40,0
		>100	3	60,0
		Total	5	100,0
1	Válidos	normal	8	34,8
		>20	3	13,0
		>100	10	43,5
		Total	21	91,3
	Perdidos	Sistema	2	8,7
	Total		23	100,0

- En el 30,4% de los pacientes que presentaban metástasis óseas al diagnóstico frente al 25% de los pacientes que no las tenían, se apreciaban unos niveles de ferritina por encima de los parámetros normales.
- El 55,6% de los tumores que habían metastatizado en hueso, frente al 75% de los que no, fueron clasificados como desfavorables según los criterios de Shimada/INPC. p valor 0,47.
- No hubo diferencias en cuanto a la ploidía en ambos grupos.
- La delección 1p fue más frecuente en el grupo de pacientes que no tenía metástasis óseas (66,7% vs 42% de los que sí las tenían). p valor 0,43.
- Además de la evaluación de metástasis óseas, por captación a nivel cortical, la MIBG puede medir afectación de médula ósea, pero existe discusión acerca de si es el método idóneo para ello. En nuestra muestra, existen 3 casos en los que existía infiltración masiva de médula ósea según métodos tradicionales (aspirados y/o biopsias), asociado a una MIBG en la

que se aprecia un patrón homogéneo sugestivo de captación medular. **En 2 de estos pacientes, el resultado del score de MIBG post-inducción de "0" se correlacionó con el resultado de la valoración de médula ósea no infiltrada. Sin embargo, el otro paciente tenía una valoración de MIBG de 5, siendo la valoración morfológica de la médula ósea persistentemente positiva.**

1.4.- METÁSTASIS EN MÉDULA ÓSEA AL DIAGNÓSTICO.

Se utiliza el Test Chi-Cuadrado, excepto al comparar las medianas de edad, en el que se utiliza el Test de Mann-Whitney.

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	NO METÁSTASIS MÉDULA ÓSEA n=4	METÁSTASIS MÉDULA ÓSEA n=24	p VALOR
Mediana de edad	14,5 meses	14,5 meses	0,13
Clínica al diagnóstico	2 0	17 5	0,074
Metástasis óseas	3 1	20 4	0,68
Respuesta tras inducción			0,34
Remisión Completa	2	6	
Buena Remisión Parcial	0	10	
Remisión Parcial	2	8	
Recaída	2	20	0,13
Tipo de Recaída:			0,21
Ósea	1	14	
Médula ósea	1	9	
En general:			0,63
Local	0	3	
Ósea	1	5	
Médula ósea	1	1	
Ósea+Médula Ósea	0	8	
Otras	0	3	
Fallecimiento a 5 años	2	18	0,3
No fallecimiento a 5 años	2	6	
Aumento LDH	3	20	0,36
LDH normal	1	2	
Aumento ENE	2	16	0,9
ENE normal	1	7	
Aumento Ferritina	0	8	0,16
Ferritina normal	4	5	
MIBG post-inducción >0	1	5	0,92
MIBG post-inducción 0	3	15	

Shimada desfavorable	2	11	0,77
Shimada favorable	1	8	
Indice ADN			0,56
Di-tetraploide	1	6	0,54
Triploide	0	3	
No evaluado	3	15	
Amplificación N-Myc	1	7	0,9
No amplificación N-Myc	2	16	
Delección 1p	1	9	0,65
No delección 1p	2	10	

- Los pacientes que presentaban metástasis de médula ósea al diagnóstico tienen mayor tendencia a la recaída (20/24 vs 2/4; p valor 0.13); siendo las recaídas más frecuentes en hueso (p valor 0.21).
- La ferritina estaba elevada en mayor medida en los pacientes que tenían metástasis en médula ósea (p valor 0,16).
- No hubo diferencias en cuanto al resto de las variables estudiadas (Ver tabla).

1.5- RECAIDA A 5 AÑOS.

Se utiliza el Test Chi-Cuadrado, excepto al comparar las medianas de edad, en el que se utiliza el test de Mann-Whitney.

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	NO RECAÍDA n= 6	RECAÍDA n= 22	p VALOR
Mediana de edad	12,08 meses	15,16 meses	0,42
Edad >1 año	5	21	0,30
Clínica al diagnóstico Asintomáticos	3 1	16 4	0,31
Metástasis óseas No metástasis óseas	4 2	10 12	0,26
Metástasis en médula ósea No metástasis en médula ósea	4 2	20 2	0,13
Respuesta tras inducción Remisión Completa Buena Remisión Parcial Remisión Parcial	2 1 3	6 7 9	0,76
LDH normal Aumento LDH >500 >1000	1 4 1 3	2 19 3 16	0,51
ENE normal Aumento ENE >20 >100	2 4 2 2	6 14 3 11	0,87
Aumento Ferritina Ferritina normal	1 5	7 14	0,43
MIBG post-inducción >0 MIBG post-inducción ≤0	0 6	6 14	0,12
Shimada desfavorable Shimada favorable	2 1	11 8	0,77
Índice ADN Triploide Di-tetraploide No evaluados	0 2 4	3 5 14	0,34 0,48
Delección 1p No delección 1p	1 2	9 10	0,65
N-Myc No amplificación N-Myc	0 4	8 14	0,15
TH+ TH normal	1 0	6 7	0,29

- Si analizamos el grupo que tenía MIBG positiva al diagnóstico (n=20):

MIBG post-inducción >0	0	6	0,47
MIBG post-inducción ≤0	2	12	

- El 90,9% de los pacientes que recayeron han fallecido a pesar de la administración de tratamientos de segunda línea o de recaída. Existen 2 pacientes estables, recibiendo tratamiento adicional.
- El 80% de los pacientes que recayeron tenían síntomas al diagnóstico, comparado con un 75% de los que no recayeron.
- **El 90,9% de los que recayeron tenían metástasis en médula ósea al diagnóstico, comparado con un 66,7% de los que no recayeron. p valor 0,13.**
- El 27,9% de los pacientes que recayeron habían conseguido una remisión completa tras el tratamiento de inducción comparado con el 33,3% de los que no recayeron.
- El 90,5% de los pacientes que recayeron habían tenido una LDH patológica al diagnóstico (siendo en la mayoría, 75%, mayor de 1000). En el caso de los que no recayeron, la LDH había sido patológica en el 80%, siendo mayor de 1000 en el 75% de éstos. P valor 0,51.
- La ENE estaba alterada en el 66,7% de los casos que no recayeron (siendo en la mitad de los casos mayor de 100) y en el 70% de los que recayeron (siendo en el 78,6% de ellos mayor de 100). p valor 0,87.
- La ferritina estaba alterada en el momento del diagnóstico en el 16,7% de los que no recayeron respecto al 33,3% de los que recayeron.p valor 0,43.

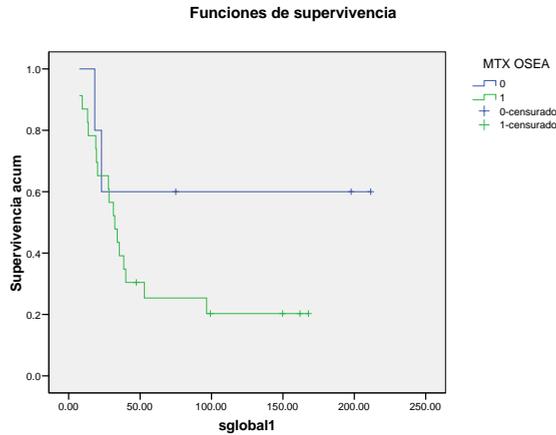
- El score post-inducción fue =0 en todos los pacientes que no recayeron, frente al 30% de los que recayeron. p valor 0,12.
- Once pacientes de 19 estudiados fueron clasificados como Shimada desfavorable en el grupo de los que recayeron, comparado con 2 de 3 pacientes del grupo que no ha recaído. pvalor 0,77.
- Todos los pacientes con N-Myc amplificado recayeron. p valor 0,15.

N-MYC				
RECAIDA			Frecuencia	Porcentaje
NO	Válidos	0	4	66,7
	Perdidos	Sistema	2	33,3
	Total		6	100,0
SI	Válidos	0	14	63,6
		1	8	36,4
	Total		22	100,0

- El 47,4% de los que recayeron tenían la delección del cromosoma 1p, comparado con un 33,7% de los que no recayeron. p valor 0,65.
- De los 20 pacientes que no tenían amplificación N-Myc, 14 tenían del 1p. De ellos, 11/20 recayeron, presentando la del 1p en 3/11 casos vs 1/3 que no habían recaído. p valor 0,57.

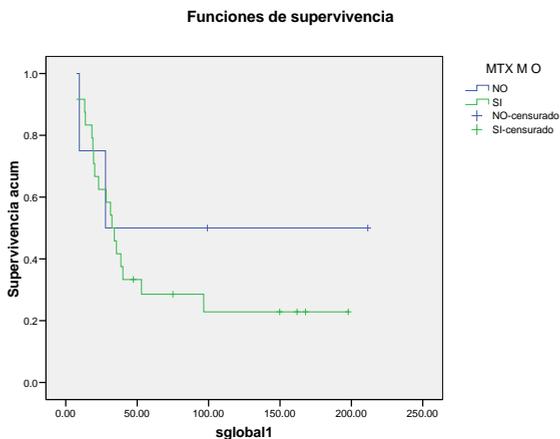
1.6.- SUPERVIVENCIA LIBRE DE EVENTOS Y SUPERVIVENCIA GLOBAL EN RELACIÓN A LOS DIFERENTES FACTORES PRONÓSTICOS

- METÁSTASIS ÓSEAS = Test Log-Rank. P valor =0,21



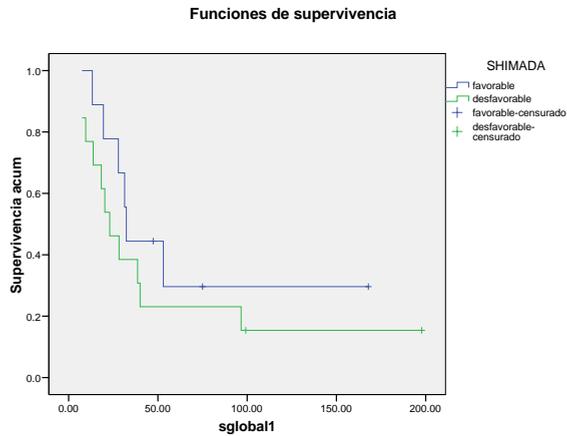
METÁSTASIS ÓSEAS	Media de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
0	135,160	41,818	53,196	217,124
1	58,095	12,401	33,789	82,401
Global	79,015	15,922	47,807	110,222
METÁSTASIS ÓSEAS	Mediana de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
0
1	32,300	4,608	23,269	41,331
Global	32,300	4,809	22,875	41,725

- METÁSTASIS MÉDULA ÓSEA: Test Log-Rank. P valor =0,49



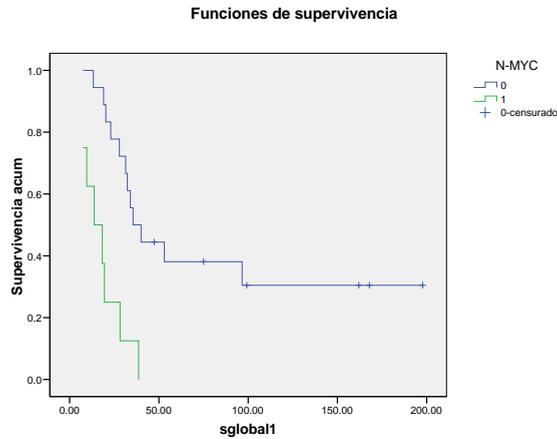
METÁSTASIS MÉDULA ÓSEA	Media de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
NO	115,098	48,310	20,410	209,785
SI	69,173	15,193	39,394	98,953
Global	79,015	15,922	47,807	110,222
METÁSTASIS MÉDULA ÓSEA	Mediana de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
NO	27,850	.	.	.
SI	32,300	4,452	23,574	41,026
Global	32,300	4,809	22,875	41,725

- SHIMADA: Test Log-Rank. P valor =0,35



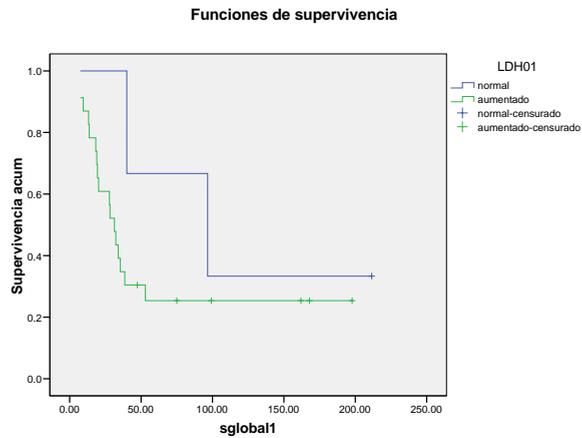
SHIMADA	Media de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Favorable	71,408	22,305	27,690	115,126
Desfavorable	53,758	18,133	18,219	89,298
Global	63,591	15,445	33,320	93,863
SHIMADA	Mediana de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Favorable	32,300	1,401	29,554	35,046
Desfavorable	23,000	5,950	11,339	34,661
Global	28,230	5,453	17,543	38,917

- N-Myc: Test Log-Rank. P valor = **0,00**



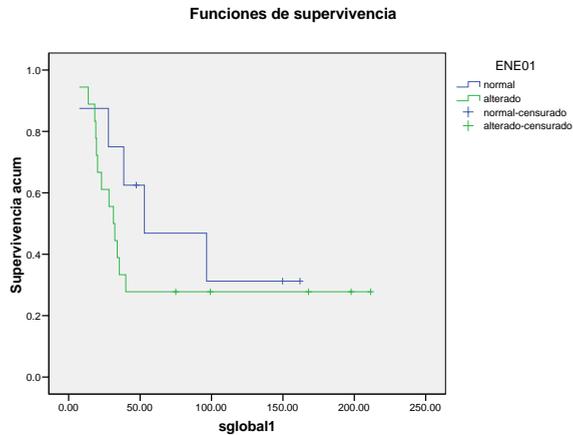
AMPLIFICACIÓN N-Myc	Media de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
No amplificado	86,372	18,509	50,094	122,649
Amplificado	17,858	3,876	10,260	25,455
Global	65,290	14,279	37,303	93,278
AMPLIFICACIÓN N-Myc	Mediana de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
No amplificado	35,500	6,375	23,006	47,994
Amplificado	13,730	6,194	1,589	25,871
Global	31,360	3,920	23,677	39,043

- LDH: Test Log-Rank. P valor 0,32



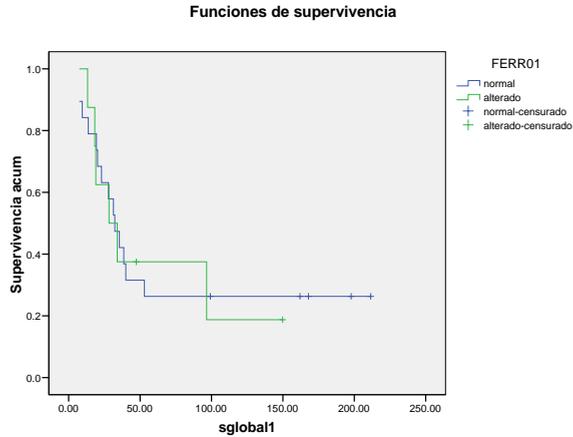
LDH	Media de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Normal (<500)	116,037	41,192	35,300	196,773
Aumentada	68,351	16,093	36,808	99,894
Global	75,800	16,210	44,028	107,573
LDH	Mediana de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Normal (<500)	96,600	46,206	6,037	187,163
Aumentada	31,360	3,554	24,395	38,325
Global	32,300	4,634	23,218	41,382

- ENOLASA NEURONAL ESPECÍFICA = Se utiliza el Test Breslow porque las curvas de supervivencia se cortan entre sí. p valor 0,37.



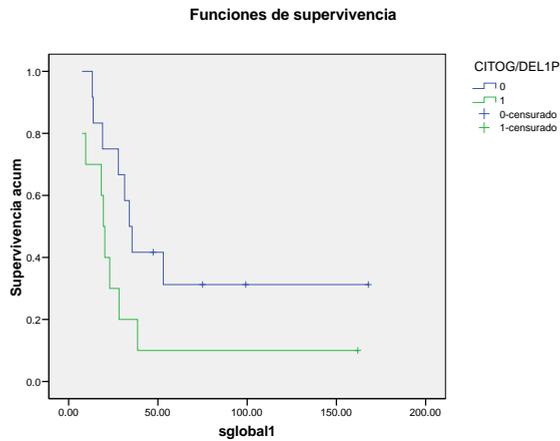
ENOLASA NEURONAL ESPECÍFICA	Media de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Normal	83,248	21,773	40,573	125,924
alterado	76,674	19,794	37,879	115,470
Global	84,216	16,717	51,451	116,980
ENOLASA NEURONAL ESPECÍFICA	Mediana de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Normal	53,030	34,618	,000	120,882
alterado	31,360	4,317	22,899	39,821
Global	34,000	4,615	24,955	43,045

- FERRITINA= Test Log-Rank. P valor =0,91



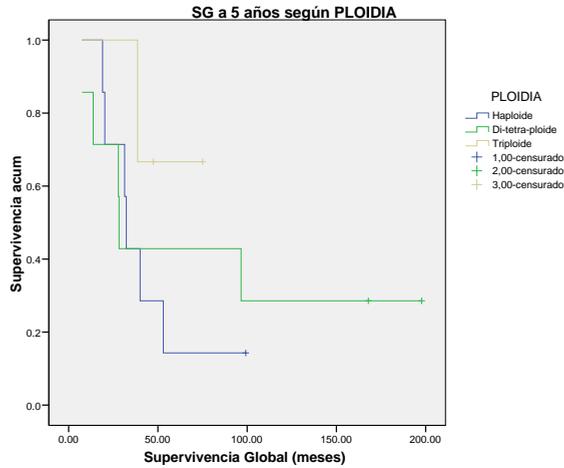
FERRITINA	Media de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Normal	74,586	18,950	37,443	111,728
Aumentada	60,299	18,732	23,585	97,013
Global	74,643	15,754	43,764	105,521
FERRITINA	Mediana de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Normal	32,300	5,550	21,422	43,178
Aumentada	28,230	10,607	7,441	49,019
Global	32,300	4,994	22,513	42,087

- DELECCIÓN 1p: Test Log-Rank. p valor 0,07



CITOG/DEL1P	Media de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Ausente	72,551	19,375	34,575	110,527
Presente	33,438	13,859	6,275	60,601
Global	55,302	13,094	29,637	80,966
CITOG/DEL1P	Mediana de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Ausente	34,000	3,585	26,973	41,027
Presente	19,460	1,542	16,438	22,482
Global	27,850	6,514	15,083	40,617

- DIPLOIDIA= Test Log-Rank. P valor 0,5



DIPLOIDIA	Media de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Aneuploide	42,164	9,696	23,160	61,168
Diploide-tetraploide	81,359	29,646	23,253	139,464
Triploide	62,867	9,907	43,449	82,284
Global	78,056	18,568	41,663	114,449

DIPLOIDIA	Mediana de tiempo de supervivencia			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Aneuploide	32,300	1,231	29,888	34,712
Diploide-tetraploide	28,230	,498	27,255	29,205
Triploide
Global	38,600	5,934	26,970	50,230

1.7.- HORIZONTES DE TIEMPO DE SUPERVIVENCIA DEFINIDOS POR PERCENTILES.

Debido a la alta mortalidad de estos pacientes, se ha ampliado el análisis de la supervivencia, mediante el estudio de horizontes de supervivencia alcanzados, es decir, puntos de corte arbitrarios que nos dividen a los pacientes en 2 grupos, según hayan alcanzado o no estos horizontes, identificándose así aquellos pacientes que, aunque han fallecido, han logrado un mayor tiempo de supervivencia.

La mediana de tiempo de supervivencia a 5 años de la muestra es de 33,15 meses.

Se ha elegido como punto de corte del análisis: 20 meses (p25 19,11 meses) y 90 meses (p75 91,2 meses).

1.7.1.- Tiempo de supervivencia \geq 20 meses (utilizando el percentil 25= tiempo de supervivencia que es superado por el 75% de los pacientes analizados).

- Todos los pacientes que tenían una LDH normal al diagnóstico sobrevivieron más de 20 meses, comparado con el 69,6% de los que tenían valores patológicos (65% de los que tenían unos valores >500). Test exacto de Fisher p valor 0,52.
- El 73% de los pacientes que tenían una ferritina normal al diagnóstico superaron los 20 meses de supervivencia, comparado con el 62% de los que tenían valores alterados. Test exacto de Fisher. p valor 0,66.

TABLA DE CONTINGENCIA		FERRITINA		TOTAL
		< 500	> 500	
SG > 20 m	No	5	3	8
	SI	14	5	19
Total		19	8	27

- El 89% de los que no estaban amplificados consiguieron una supervivencia superior a 20 meses, comparado con el 25% de los amplificados. Test exacto de Fisher. p valor **0,003**.

TABLA DE CONTINGENCIA		N-Myc		TOTAL
		No amplificado	Amplificado	
SG > 20 m	No	2	6	8
	SI	16	2	18
Total		18	8	26

1.7.2.- Tiempo de supervivencia \geq 90 meses (p 75).

- El 40% (2/5) de los pacientes sin metástasis óseas al diagnóstico alcanzaron una supervivencia \geq a 75 meses; comparado con el 21,7% (5/23) de los que las tenían. Test exacto de Fisher= 0,57.

- El 50% (2/4) de los pacientes sin metástasis en médula ósea al diagnóstico alcanzaron una supervivencia \geq a 75 meses; comparado con el 21% (5/24) de los que las tenían. Test exacto de Fisher= 0,25.
- **El 67% de los pacientes con LDH normal al diagnóstico consiguieron alcanzar un tiempo de supervivencia \geq a 75 meses, sin embargo, sólo un 17% con LDH >500 lo alcanzaron. Test exacto de Fisher= p valor 0,12.**

LDH	Media			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Normal	116,037	41,192	35,300	196,773
> 500 U/L	68,351	16,093	36,808	99,894
Global	75,800	16,210	44,028	107,573
LDH	Mediana			
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Normal	96,600	46,206	6,037	187,163
> 500 U/L	31,360	3,554	24,395	38,325
Global	32,300	4,634	23,218	41,382

LDH- TIEMPO DE SG A 5 AÑOS	MEDIA (meses)	MEDIANA (meses)
NORMAL	110,37 (38,15-182,58)	96,6 (6-187,2)
>500 U/L	61,56 (33,3-89,8)	31,36 (24,7-37,9)
GLOBAL	68,47 (39,8-97,1)	32,3 (23,7-40)

- La supervivencia a 5 años máxima de los pacientes que presentaban amplificación N-Myc fue de 49,64 meses. Sin embargo, el 37,7% de los

pacientes que no tenían amplificación N-Myc consiguieron alcanzar una supervivencia mayor de 75 meses. Test exacto de Fisher p valor 0,28

- Del 1p: Test exacto de Fisher p valor 0,32.

TABLA DE CONTINGENCIA		DEL 1p		TOTAL
		No del 1p	Del 1p	
SG > 90 m	No	4	1	5
	Si	8	9	17
Total		12	10	22

- En los pacientes que no tenían amplificación N-Myc, se estudió si la del 1p valor fue un factor predictivo de peor evolución, pero no hubo diferencias. Chi Cuadrado p valor 0,923.

TABLA DE CONTINGENCIA		PACIENTES SIN N-Myc		TOTAL
		No del 1p	Del 1p	
SG > 90 m	No	4	1	5
	Si	7	2	9
Total		11	3	14

2.- ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL TRAS QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN:

2.1.- ESTUDIO DE LOS DIFERENTES FACTORES SEGÚN SCORE MIBG.

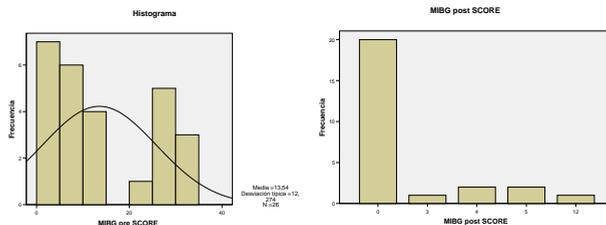
2.1.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES:

SCORE		MEDIANA	RANGO INTERCUARTÍLICO (25-75)	DESVIACIÓN TÍPICA
Score MIBG al diagnóstico	13,54	10	3,0 -27,25	12,27
Score MIBG post-inducción	1,27	0	0,0 -0,75	2,78
Score relativo postinducción/diagnóstico	0,10			
Score al diagnóstico *	17,60	13,5	6,5-28,75	11,00
Score MIBG post-inducción *	1,65	0	0,0 -3,75	3,08
Scorerelativo postinducción/diagnóstico*	0,10			

(*Grupo de pacientes con MIBG positiva al diagnóstico.)

La aplicación del score semicuantitativo de la MIBG, se realizó en 26 pacientes. Al diagnóstico, la puntuación media fue de 13,54 (rango 0-35) y la mediana de 10. Tras la inducción, la puntuación media fue de 1,27 (rango 0-2,8).

Análisis de los pacientes que tenían un Score de MIBG>0 al diagnóstico
 (aquellos cuyas metástasis óseas se vieron en MIBG): (n=20); la media del score fue de 17,6 y la mediana de 13,5.



SCORE MIBG POST-INDUCCIÓN	N=28	% SOBRE DATOS COMPLETOS
= 0	20	77%
>0	6	23%
No Evaluados	2	

Análisis de los pacientes cuyo score tras inducción fue > 0:

En la evaluación tras la inducción, la mayoría de los pacientes (77%) presentaban un valor de score de MIBG (MIBG post-Score) de 0 (n=20); pero en 6 pacientes el score fue > 0, es decir, todavía quedaban zonas captantes en la MIBG sugestivas de infiltración.

En los pacientes cuyo score tras la inducción fue >0, los **scores al diagnóstico** fueron de 29, 14, 25, 4, 8, 35; lo que supone una media **de 19,2 (superior a la media general, que es de 17,6)**. El score post-inducción fue de 12, 13, 5, 4, 4, 5; lo que supone una media de 7,2. El **score relativo** fue de 0,4; 0,9; 0,2; 1; 0,5; 0,14; con una media de score relativo **de 0,5** (siendo la media de score relativo general del 0,1). Todos ellos recayeron yhan fallecido (100%).

Análisis de los pacientes según amplificación N-Myc:

La media del score absoluto de MIBG al diagnóstico es mayor en el grupo de los no amplificados; de 16,59 (0-35), con una mediana de 14; en el grupo de los amplificados la media es de 10 (0-30) con una mediana de 8.

También la media del score absoluto de MIBG post-tratamiento de inducción fue mayor en el grupo de los no amplificados: 1,47 (0-12) vs 1,14 (0-4); aunque **en el grupo de los no amplificados la respuesta de las metástasis óseas fue mayor,** con un cociente score MIBG postinducción/diagnóstico de 0,08 comparado con 0,11 en los amplificados.

Cuatro de los 17 pacientes no amplificados evaluados tenían un Score >0, mientras que en los amplificados, 2/7 lo tenían.

MIBG	N-Myc NO AMPLIFICADO	N-Myc AMPLIFICADO
Diagnóstico Media Mediana	16,59 14,00	10,00 8,00
Post-inducción Media	1,40	1,14
Cociente de medias	0,08	0,11

2.1.2.- MIBG SCORE PRE TRATAMIENTO DE INDUCCIÓN PARA EVALUACIÓN DE AFECTACIÓN BASAL SEGÚN PUNTOS DE CORTE EN SCORE AL DIAGNÓSTICO:

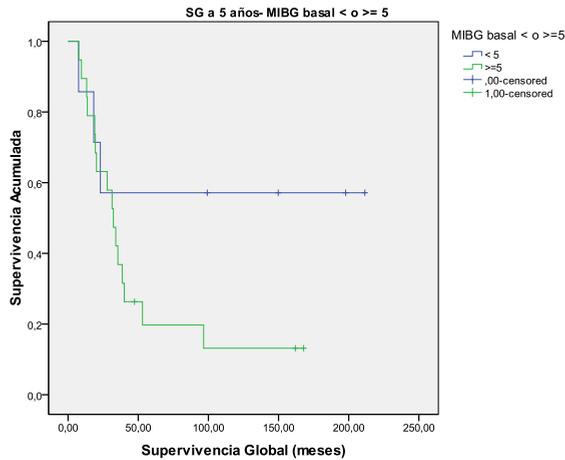
En nuestro caso, este sistema semicuantitativo no nos discierne un punto de corte en el score basal absoluto, a partir del cual el pronóstico sea peor, probablemente por el escaso tamaño muestral. Sin embargo, se han probado diferentes puntos de corte.

- SEGÚN SCORE AL DIAGNÓSTICO < vs ≥5:

MIBG AL DIAGNÓSTICO	Nº TOTAL	Nº DE EVENTOS	PORCENTAJE	MEDIA SG (MESES)
<5	7	3	57,1%	127,829 (56,2-199,5)
≥5	19	16	15,8%	49,955 (36,6-73,3)
Global	26	19	26,9%	76,43 (44,56-108,3)

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de MIBG score al diagnóstico ≥ vs < 5:

COMPARACIONES GLOBALES	CHI-CUADRADO	GL	p VALOR
Log Rank (Mantel-Cox)	2,24	1	0,134
Breslow (Generalized Wilcoxon)	0,749	1	0,387
Tarone-Ware	1,369	1	0,242



- SEGÚN SCORE AL DIAGNÓSTICO < vs ≥10 (P50):

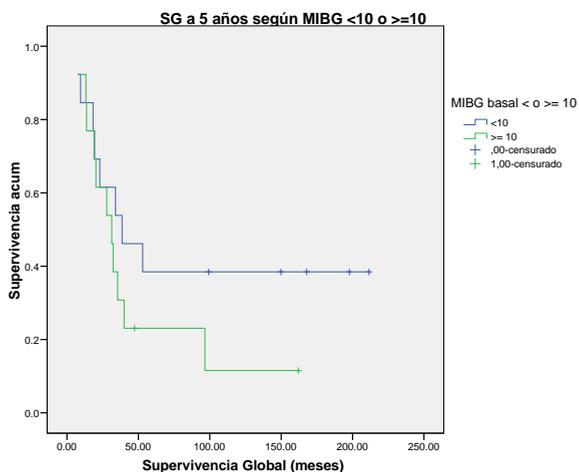
El primer punto de corte elegido fue el de 10, debido a que se trata del valor del p50 de la muestra de valores de la puntuación asignada al score de MIBG previo a tratamiento de inducción.

De un total de 26 pacientes estudiados, en el grupo de los que tenían un score de MIBG >10, la supervivencia ha sido del 15,4%, comparado con el 38,5 % en el grupo de los que tenían <10. Log Rank valor p valor 0, 24.

MIBG AL DIAGNÓSTICO (P50=10)	Nº TOTAL	Nº DE EVENTOS	PORCENTAJE	MEDIA SG (MESES)
<10	13	8	38,5%	96,96 (47,35-146,6)
≥10	13	11	15,4%	48,4 (21,7-75,11)
Global	26	19	26,9%	76,43 (44,56-108,3)

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de MIBG score al diagnóstico > vs ≤ 10:

COMPARACIONES GLOBALES	CHI-CUADRADO	GL	p VALOR
Log Rank (Mantel-Cox)	1,380	1	0,240
Breslow (Generalized Wilcoxon)	0,644	1	0,422
Tarone-Ware	0,971	1	0,324

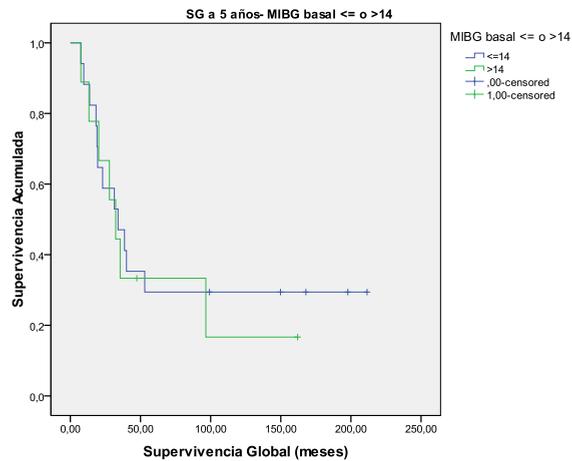


- SEGÚN SCORE AL DIAGNÓSTICO ≤ vs > 14:

MIBG AL DIAGNÓSTICO	Nº TOTAL	Nº DE EVENTOS	PORCENTAJE	MEDIA SG (MESES)
<14	17	12	29,4%	80,296(39,7-120,9)
≥14	9	7	22,2%	58,300 (21,7-94,8)
Global	26	19	26,9%	76,430 (44,56-108,3)

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de MIBG score al diagnóstico <14 vs ≥ 14 :

COMPARACIONES GLOBALES	CHI-CUADRADO	GL	p VALOR
Log Rank (Mantel-Cox)	0,117	1	0,732
Breslow (Generalized Wilcoxon)	0,036	1	0,849



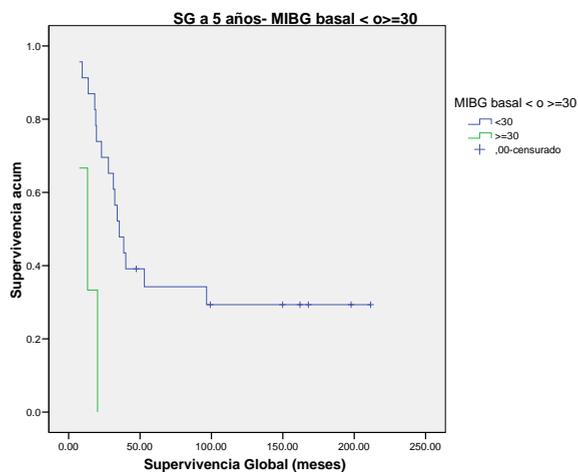
- SEGÚN SCORE AL DIAGNÓSTICO > 30 vs ≤ 30 :

En el grupo de los que tenían un score de MIBG >30 , no ha habido supervivientes, comparado con el 30,4% en el grupo de los que tenían ≤ 30 ; pero sólo hay 3 pacientes en el primer grupo. Log Rank valor p valor **0,002**.

MIBG AL DIAGNÓSTICO	Nº TOTAL	Nº DE EVENTOS	PORCENTAJE	MEDIA SG (MESES)
≤ 30	23	16	30,4%	84,61 (49,97-119,26)
>30	3	3	00,0%	13,670(6,445-20,895)
Global	26	19	26,9%	76,43 (44,56-108,3)

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de MIBG score al diagnóstico > vs ≤ 30:

COMPARACIONES GLOBALES	CHI-CUADRADO	GL	p VALOR
Log Rank (Mantel-Cox)	9,336	1	0,002
Breslow (Generalized Wilcoxon)	8,626	1	0,003
Tarone-Ware	8,986	1	0,003



2.1.3.- SCORE MIBG POST-TRATAMIENTO DE INDUCCIÓN PARA EVALUACIÓN DE RESPUESTA:

Se utiliza el Test Chi-Cuadrado, excepto al comparar las medianas de edad, en el que se utiliza el test de Mann-Whitney.

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	MIBG POST INDUCCIÓN =0 N=20	MIBG POST INDUCCIÓN >0 N=6	p VALOR
Mediana de edad	2,8 años	4,5 años	0,14
Edad < 1 año	2	0	0,4
Clínica al diagnóstico Asintomáticos	13 4	5 1	0,49
Score al diagnóstico Media Mediana	11,85 7,5	19,17 19,5	
Metástasis en médula ósea No metástasis en médula ósea	17 3	5 1	0,92
Respuesta tras inducción Remisión Completa Buena Remisión Parcial Remisión Parcial	7 5 8	1 2 3	0,69
No recaída Recaída	6 14 (70%)	0 6 (100%)	0,12
Tipo de Recaída: Ósea Médula ósea	9 (45%) 6 (30%)	5 (83%) 3 (50%)	0,09 0,36
Fallecimiento a 5 años No fallecimiento a 5 años	13 (65%) 7	6 (100%) 0	0,09
LDH normal Aumento LDH >500 >1000	1 17 2 15	2 4 2 2	0,07
ENE normal Aumento ENE >20 >100	7 13 3 10	1 3 2 1	0,7
Aumento Ferritina Ferritina normal	5 15	2 4	0,68

Shimada desfavorable	8	4	0,69
Shimada favorable	6	2	
Indice ADN			
Di-tetraploide	4	2	0,49
Triploide	2	0	0,42
No evaluado	14	4	
Amplificación N-Myc	5	2	0,79
No amplificación N-Myc	13	4	
Delección 1p	7	2	0,41
No delección 1p	10	1	

- **La edad media al diagnóstico de los pacientes con score post-tratamiento = 0 fue menor, siendo de 3,28 años, comparándola con los que tuvieron un score mayor a 0 que fue de 4,53 años. Mediana: 2,8 y 4,5 años respectivamente. P valor 0,14.**
- El tiempo de seguimiento hasta la recaída fue de 17,04 meses y 13,57 meses respectivamente. La media del tiempo de seguimiento global fue de 53,17 meses y 50 meses respectivamente.
- El 83% de los pacientes con score >0 en los que se había evaluado la existencia de clínica al diagnóstico habían sido sintomáticos. Sin embargo, en el grupo de pacientes con score = 0, sólo 13 de 17 pacientes evaluados tuvieron clínica al diagnóstico. P VALOR 0,49.
- El 85% de los pacientes con score >0 en la evaluación, habían tenido metástasis en médula ósea al diagnóstico comparado con el 83% de los que tenían un Score = 0.
- No hubo diferencias en cuanto a la evaluación de la respuesta al tratamiento de inducción en ambos grupos. P VALOR 0,69.

- Todos los pacientes que tenían un score >0 en la evaluación recayeron (p valor 0,12): 1 en médula ósea, 3 en hueso y 2 en ambas localizaciones. De los 20 pacientes con score=0, recayeron 14, siendo 3 de ellos recaídas locales aisladas, 1 recayó en médula ósea, 3 en hueso, 5 en ambas y 2 en otras localizaciones (uno en SNC y otro en hueso e hígado).
- **En general, el 83% de los pacientes con score >0 post-inducción presentaron recaídas óseas vs el 45% de los que tenían un score de 0. P valor 0,09.**
- **Todos los pacientes evaluados que sobreviven tenían un score = 0 en la evaluación. P valor 0,09.**

TABLA DE CONTINGENCIA		FALLECIMIENTO		TOTAL
		No	Si	
SCORE MIBG POST-INDUCCIÓN	0	7	13	20
	>0	0	6	6
Total		7	19	26

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2,874 ^b	1	,090		
Corrección por continuidad	1,370	1	,242		
Razón de verosimilitudes	4,392	1	,036		
Estadístico exacto de Fisher				,146	,118
Asociación lineal por lineal	2,763	1	,096		
N de casos válidos	26				

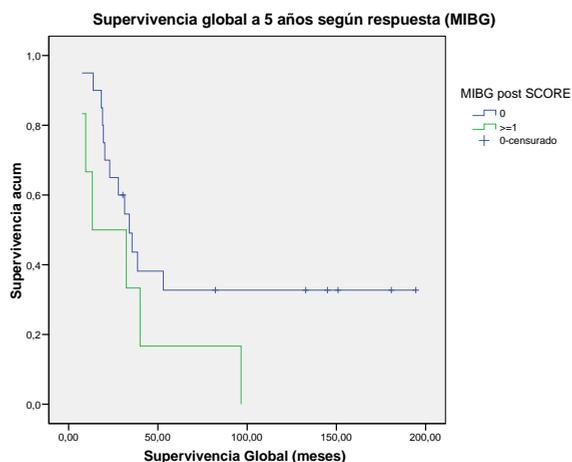
a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 2 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 1,62.

- Las cifras de LDH estaban alteradas al diagnóstico en 17/18 pacientes que tuvieron un score =0 posteriormente. Y en 4/6 de los que tuvieron un score mayor. **P valor 0,07**. Es decir, entre los pacientes con valores altos de LDH al diagnóstico hubo una tendencia a una mayor respuesta de sus metástasis óseas tras la inducción valoradas por la MIBG.
- La enolasa estaba incrementada en 13/20 pacientes con score =0 y en 3/4 con score >0. p valor 0,7.
- La ferritina estaba incrementada según rango de edad en 5/20 pacientes que tuvieron un score =0 y en 2/6 de los que tuvieron >0. p valor 0,68.
- La media del score al diagnóstico fue de 11,85 puntos (0-34 puntos) para los pacientes con un score =0 en la evaluación. En el caso de los pacientes con un score >0, la media fue de 19,17 puntos al diagnóstico (4-35). Las medianas fueron de 7,5 y 19,5 respectivamente. Los pacientes de este

segundo grupo, con peor respuesta, tenían más enfermedad cuantificada al diagnóstico.

- Se clasificaron de forma desfavorable (según Shimada) 8/14 tumores de pacientes que tuvieron un score =0 y 4/6 de los que fueron >0. p valor 0,69.
- El índice de DNA diploide-tetraploide se encontró en 4/20 estudiados entre los pacientes con score =0 y en 2/6 de los que tuvieron score >0. p valor 0,49.
- En el 33% de los pacientes que tenían un score >0 (2/6), se encontró amplificación de N-Myc, comparado con el 27,7% (5/18) que tenían score =0. p valor 0,79.
- La del 1p valor estaba presente en 2 pacientes de los 3 estudiados con score >0; y en 7 de 17 estudiados con score =0. p valor 0,41. Tres pacientes que presentaban una del 1p valor no asociada a amplificación N-Myc tuvieron un score MIBG tras la inducción del 0.
- La TH fue positiva en 5 pacientes; siendo (++) en un paciente de los 4 estudiados con un score >0 y en 4 de 9 estudiados con score 0 (3+ y 1 ++).
- **En aquellos pacientes que tenían un score de 0 en la MIBG tras la inducción, la media del tiempo de supervivencia a 5 años ha sido mayor (81,6 meses vs 33,2 meses en los que tenían score >0) pero la supervivencia global a 5 años no es significativamente estadística. P VALOR 0,13. Existe un apartado específico en el que se detallan estos datos.**



2.1.4.- TIEMPO DE SUPERVIVENCIA A 5 AÑOS: SEGÚN SUPERACIÓN O NO DE HORIZONTES DE SUPERVIVENCIA DEFINIDOS POR PERCENTILES.

Dado el mal pronóstico de los pacientes con neuroblastoma metastásico, incluidos en este estudio porque representan un reto respecto al tratamiento, así como debido al tamaño muestral, se ha optado por realizar también el estudio de supervivencia basado en superación o no de diferentes horizontes de supervivencia. Revisando la literatura, no se ha encontrado ninguna referencia a ningún estudio parecido. Sin embargo, parece interesante estudiar la “cantidad” de supervivencia de estos pacientes, puesto que hay diferencias entre los que recaen precozmente y los que lo hacen a largo plazo.

Además, dentro de cada uno de los 2 subgrupos de estudio, se han estudiado los pacientes utilizando a su vez diferentes puntos de corte de las puntuaciones del score de MIBG al diagnóstico (5, 10, 14, 27 y 30), así como puntuación post inducción de 0 ó > 0.

2.1.4.1.- Tiempo de supervivencia \geq 20 meses:

RESUMEN CARACTERÍSTICAS GENERALES S Global > 20 meses		
SCORE AL DIAGNÓSTICO	p valor	p valor *
< vs \geq 5	0,65	0,44
< vs \geq 10	1	0,47
\leq vs > 14	0,24	0,27
< vs \geq 27	0,63	0,52
< vs \geq 30	0,15	0,27
SCORE POST INDUCCIÓN	p valor	p valor *
0 vs >0	0,25	0,34

Utilizando el percentil 25= tiempo de supervivencia que es superado por el 75% de los pacientes analizados. El tiempo medio de supervivencia a 5 años de la muestra es de 19,11 meses. Se ha creado una estratificación de

los pacientes en 2 grupos, utilizando un punto de corte arbitrario que es 20 meses, dividiendo la muestra en 2 grupos: aquellos que sobreviven o superan el horizonte de más de 20 meses y los que no.

*** Excluyendo pacientes con MIBG negativa al diagnóstico.**

a) Pacientes con Score basal de MIBG ≤ 5 vs > 5 :

MIBG ≤ 5 vs > 5		MIBG BASAL		TOTAL
		< 5	≥ 5	
SGLOBAL > 20 M	NO	3	5	8
	SI	7	11	18
Total		10	16	26

b) Pacientes con Score basal de MIBG ≤ 10 vs > 10 .

MIBG ≤ 10 vs > 10		MIBG BASAL		TOTAL
		≤ 10	> 10	
SGLOBAL > 20 M	NO	4	4	8
	SI	9	9	18
Total		13	13	26

PRUEBAS DE CHI-CUADRADO	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
Chi-cuadrado de Pearson	0,000(b)	1	1,000
Razón de verosimilitudes	0,000	1	1,000
Asociación lineal por lineal	0,000	1	1,000
N de casos válidos	26		

c) Pacientes con Score basal de MIBG ≤ 14 vs > 14 :

TABLA DE CONTINGENCIA		MIBG AL DIAGNÓSTICO			TOTAL
		NEG	≤ 14	> 14	
SGLOBAL > 20 M	NO	1	5	2	8
	SI	5	5	8	18
TOTAL		6	10	10	26

PRUEBAS DE CHI-CUADRADO	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
CHI-CUADRADO DE PEARSON	2,841(A)	2	0,242
RAZÓN DE VEROSIMILITUDES	2,819	2	0,244
ASOCIACIÓN LINEAL POR LINEAL	0,016	1	0,901
N DE CASOS VÁLIDOS	26		

d) Pacientes con Score basal de MIBG ≤ 27 vs > 27 :

TABLA DE CONTINGENCIA		MIBG AL DIAGNÓSTICO		TOTAL
		≤ 27	> 27	
SGLOBAL > 20 M	NO	6	2	8
	SI	13	5	18
Total		19	7	26

PRUEBAS DE CHI-CUADRADO	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)	SIG. EXACTA (BILATERAL)	SIG. EXACTA (UNILATERAL)
Chi-cuadrado de Pearson	0,022(b)	1	0,883		
Razón de verosimilitudes	0,022	1	0,882		
Estadístico exacto de Fisher				1,000	0,639
Asociación lineal por lineal	0,021	1	0,885		
N de casos válidos	26				

PRUEBAS DE CHI-CUADRADO	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)	SIG. EXACTA (BILATERAL)	SIG. EXACTA (UNILATERAL)
Chi-cuadrado de Pearson	1,354	1	0,245		
Corrección por continuidad(a)	0,435	1	0,510		
Razón de verosimilitudes	1,285	1	0,257		
Estadístico exacto de Fisher				0,330	0,249
Asociación lineal por lineal	1,302	1	0,254		
N de casos válidos	26				

e) Pacientes con Score basal de MIBG ≤ 30 vs > 30 :

TABLA DE CONTINGENCIA		MIBG AL DIAGNÓSTICO		TOTAL
		≤ 30	> 30	
SGLOBAL > 20 M	NO	6	2	8
	SI	17	1	18
Total		23	3	26

PRUEBAS DE CHI-CUADRADO	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)
Chi-cuadrado de Pearson	2,052	1	0,152
Corrección por continuidad(a)	0,589	1	0,443
Razón de verosimilitudes	1,875	1	0,171
Asociación lineal por lineal	1,973	1	0,160
N de casos válidos	26		

f) SCORE POST QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN:

TABLA DE CONTINGENCIA		MIBG POST SCORE		TOTAL
		0	>0	
SGlobal > 20 m	NO	5	3	8
	SI	15	3	18
Total		20	6	26

2.1.4.2.- Tiempo de supervivencia ≥ 90 meses (p 75):

Utilizando el percentil 75= tiempo de supervivencia que es superado por el 25% de los pacientes analizados. Por ello, se ha creado una estratificación de los pacientes en 2 grupos, aquellos que sobreviven o superan el horizonte de los 90 meses y los que no.

RESUMEN CARACTERÍSTICAS GENERALES S GLOBAL > 90 MESES		
SCORE AL DIAGNÓSTICO	p valor	p valor
\leq vs > 5	0,23	0,49
\leq vs > 10	0,19	0,73
\leq vs > 14	0,052	0,42
< vs ≥ 27	0,47	0,27
< vs ≥ 30	No valorable	0,59
SCORE POST INDUCCIÓN		p valor
0 vs >0	0,47	0,68

a) Pacientes con Score basal de MIBG ≤ 5 vs > 5 :

TABLA DE CONTINGENCIA		MIBG AL DIAGNÓSTICO		TOTAL
		≤ 5	> 5	
SGlobal > 90 meses	NO	6	13	19
	SI	4	3	7
Total		10	16	26

PRUEBAS DE CHI-CUADRADO	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)	SIG. EXACTA (BILATERAL)	SIG. EXACTA (UNILATERAL)
Chi-cuadrado de Pearson	1,412	1	0,235		
Corrección por continuidad(a)	0,539	1	0,463		
Razón de verosimilitudes	1,387	1	0,239		
Estadístico exacto de Fisher				0,369	0,230
Asociación lineal por lineal	1,358	1	0,244		
N de casos válidos	26				

b) Pacientes con Score basal de MIBG ≤ 10 vs > 10 :

TABLA DE CONTINGENCIA		MIBG AL DIAGNÓSTICO		TOTAL
		≤ 10	> 10	,00
SGlobal > 90 meses	NO	8	11	19
	SI	5	2	7
Total		13	13	26

PRUEBAS DE CHI-CUADRADO	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)	SIG. EXACTA (BILATERAL)	SIG. EXACTA (UNILATERAL)
Chi-cuadrado de Pearson	1,759(b)	1	0,185		
Corrección por continuidad(a)	0,782	1	0,377		
Razón de verosimilitudes	1,804	1	0,179		
Estadístico exacto de Fisher				0,378	0,189
N de casos válidos	26				

c) Pacientes con Score basal de MIBG ≤ 14 vs > 14 :

- Hubo diferencias en cuanto al tiempo de supervivencia de los pacientes que habían presentado un Score de MIBG al diagnóstico ≤ 14 vs los que presentaban > 14 . Chi-cuadrado **p valor 0,052**.

TABLA DE CONTINGENCIA		MIBG AL DIAGNÓSTICO		TOTAL
		≤ 14	> 14	
SGlobal > 90 meses	0	11	8	19
	1	5	2	7
Total		16	10	26

PRUEBAS DE CHI-CUADRADO	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)	SIG. EXACTA (BILATERAL)	SIG. EXACTA (UNILATERAL)	PROBABILIDAD EN EL PUNTO
Chi-cuadrado de Pearson	6,516	2	0,038	0,050		
Razón de verosimilitudes	6,142	2	0,046	0,097		
Estadístico exacto de Fisher	5,596			0,063		
Asociación lineal por lineal	3,008	1	0,083	0,096	0,074	0,052
N de casos válidos	26					

d) SCORE POST

TABLA DE CONTINGENCIA		MIBG POST INDUCCIÓN		TOTAL
		0	>0	
SGlobal> 90 m	NO	14	5	19
	SI	6	1	7
Total		20	6	26

PRUEBAS DE CHI-CUADRADO	VALOR	GL	SIG. ASINTÓTICA (BILATERAL)	SIG. EXACTA (BILATERAL)	SIG. EXACTA (UNILATERAL)
Chi-cuadrado de Pearson	0,417	1	0,518		
Corrección por continuidad(a)	0,015	1	0,904		
Razón de verosimilitudes	0,448	1	0,503		
Estadístico exacto de Fisher				1,000	0,471
Asociación lineal por lineal	0,401	1	0,527		
N de casos válidos	26				

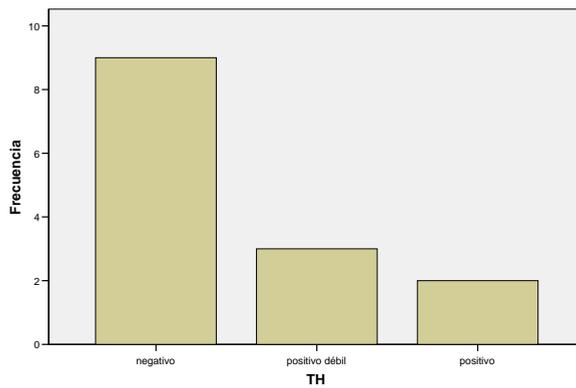
2.2- ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN MÉDULA ÓSEA TRAS QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN EN PACIENTES CON NEUROBLASTOMA METASTÁSICO: TÉCNICAS HABITUALES Y NUEVAS TÉCNICAS.

Se analizó la afectación de la médula ósea o enfermedad mínima residual mediante técnicas habituales (morfología) y otras técnicas más sensibles (TH cuantitativa y DCX). Veintisiete de 28 pacientes presentaban médulas óseas negativas morfológicamente en la evaluación previa al TPH/quimioterapia de consolidación, pero en 14 casos se estudió la afectación de médula ósea mediante técnicas más sensibles, siendo la TH positiva en 5 casos (36%) a pesar de que no se vieran células metastásicas en el aspirado o biopsia con los métodos convencionales.

De ellos, 3 fueron débilmente positivos (+), y 2 (0%) fueron intensamente positivos (++) . La DCX fue negativa en los 7 casos en los que se realizó tras la quimioterapia de inducción, siendo los resultados superponibles a la TH, excepto en un caso en el que la TH fue débilmente positiva y la DCX fue negativa. Este paciente y uno de los que tenía una TH intensamente positivas, recayeron 1,7 y 1,75 años después respectivamente.

TH		FRECUENCIA	PORCENTAJE
VÁLIDOS	negativo	9	32,1
	positivo débil	3	10,7
	positivo	2	7,1
	Total	14	50,0
PERDIDOS	Sistema	14	50,0
Total		28	100,0

TH



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

OPORTUNIDAD DEL ESTUDIO:

El neuroblastoma es la neoplasia extracraneal más frecuente en la infancia, caracterizado por su gran heterogeneidad biológica, pero en los pacientes con metástasis, que representan casi el 50% al diagnóstico, el pronóstico es infausto.

El estudio de factores clínicos, séricos, biológicos, histológicos, genéticos o de imagen, conocidos como Factores Pronósticos, es fundamental para poder predecir el comportamiento del neuroblastoma en un individuo determinado. De esta forma, se puede agrupar a los pacientes según su riesgo y adecuar la intensidad de tratamiento al mismo.

Los pacientes con neuroblastoma de alto riesgo (estadio 4 mayores de 1 año y estadios 2 y 3 con amplificación N-Myc) tienen una supervivencia que no supera el 40% en la mayor parte de las series descritas. Aproximadamente un 10-15% no llegan a alcanzar la remisión, por ser refractarios al tratamiento quimioterápico de inducción, y un 40% de los que consiguen una remisión completa o parcial, recaen a pesar de todo (incluso tras tratamientos para la enfermedad mínima residual con megaterapia, rescate de progenitores hematopoyéticos, ácido retinoico e inmunoterapia).

Para la asignación del grupo de riesgo es fundamental determinar adecuadamente la extensión o estadio de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, entre otros factores.

Actualmente, con los marcadores pronósticos clínicos y biológicos conocidos, todavía no es posible detectar a todos aquellos pacientes que van a ser refractarios o recaer precozmente, por lo que surge la necesidad del estudio de nuevos biomarcadores pronósticos que nos ayuden a diferenciar los grupos.

La posibilidad de identificar a estos pacientes de forma precoz, nos permitiría incluirlos en grupos de ultra-alto riesgo, candidatos a otros tratamientos más novedosos o experimentales que podrían mejorar su supervivencia.

Aunque muy pocos factores clínicos parecen tener significado pronóstico en niños tratados con protocolos actuales de altas dosis, lo que está claro es que el más consistente es la desaparición de toda enfermedad metastásica detectable.

Los Comités de que se encargan de medir la Enfermedad Mínima residual (Biología y Medicina Nuclear) han estado trabajando en colaboración con los otros grupos cooperativos en los últimos años para definir exactamente lo que se considera una respuesta adecuada, con biomarcadores que reflejen la situación de la enfermedad en cada fase del tratamiento. De este modo, la MIBG se está perfilando como un interesante Factor pronóstico precoz predictivo de respuesta.

Sin embargo, la falta de unos criterios uniformes y objetivos para documentar la regresión de la enfermedad del aparato locomotor (metástasis óseas) han dificultado la comparación de los datos.

Por ello, es muy importante la existencia de métodos de valoración consensuados, que permitan un análisis conjunto de pacientes con diferentes orígenes, consiguiendo de este modo muestras homogéneas, comparables entre sí, que permitan extraer conclusiones válidas que puedan ponerse en práctica y mejorar la asistencia de estos enfermos.

Tanto el COG como SIOOPEN están diseñando estudios fase I y II con nuevos fármacos, utilizando estrategias tipo “pick the winner-drop the loser”, que permiten realizar ensayos en poblaciones muy pequeñas, como sería el caso de los pacientes con NB de muy alto riesgo, con un “backbone” específico de terapia (nuevos quimioterápicos como temozolamida y camptotecinas que han demostrado respuestas en enfermedad avanzada) al que añadir nuevos fármacos “diana”: antiangiogénicos, fármacos que alteran la estabilidad de la oncoproteína N-Myc, Anti-ALK, PI3K, mTor, etc...

También la inmunoterapia ha emergido, destinada a incrementar la eficacia inmunomoduladora de los anticuerpos existentes, disminuir su toxicidad, explorar nuevas vías (inmunocitoquinas, anti-idiotipos y vacunas, combinación con el trasplante de intensidad reducida haploidéntico, etc...).

Las terapias que incorporan la ¹³¹I-MIBG a dosis terapéuticas están desarrollándose en Estados Unidos y en Europa, donde se va a incluir en un nuevo estudio para pacientes refractarios o malos respondedores, con una

aleatorización entre doble trasplante versus MIBG terapéutica y megaterapia combinada. Por este motivo, es de preveer que la determinación de la respuesta a través de biomarcadores va a ser todavía más crucial en el futuro inmediato.

FACTIBILIDAD:

Antes del año 1994, los ensayos clínicos en neuroblastoma en Europa se realizaban a nivel nacional y no en todos los países, con un reclutamiento lento de pacientes y, generalmente, ofreciendo resultados no concluyentes dado el escaso número de pacientes. Desde 1987, la Unidad de Oncología Pediátrica del H.I. La Fe coordina los datos clínicos y de seguimiento de todos los pacientes españoles con neuroblastoma, registrándolos en los estudios nacionales o europeos existentes.

Al igual que en otros campos de la Oncología Pediátrica, la existencia de grupos cooperativos nacionales e internacionales es un pilar básico para profundizar en el conocimiento de esta enfermedad, mejorando el manejo de estos tumores, consiguiendo así aumentar la tasa de supervivencia de estos niños. Los sucesivos estudios cooperativos multicéntricos nacionales del Grupo Español de Neuroblastoma de la SEHOP (N-I-87, N-II-92, N-AR-99), han tratado a la mayoría de niños españoles con neuroblastoma desde 1987 en nuestro país.

A partir del año 1994, la creación del Grupo Europeo de Neuroblastoma (ESIOP), formado por un grupo de países europeos (Italia, Francia, Gran Bretaña y España), supuso el lanzamiento del primer

estudio multicéntrico para el neuroblastoma localizado. A partir de ahí, la colaboración se intensificó y en 1998 se estableció formalmente el grupo, con unos estatutos y 12 países miembros. En la actualidad, SIOPEN consta de 20 países y se reclutan alrededor de 700 pacientes con neuroblastoma al año en los diferentes estudios, tanto para neuroblastomas localizados (LNESG1, LNESG2, INES 99.1 Y 99.2, EUNS) como metastáticos (INES 99.3, INES 99.4, HR-NBL/1) en los que los que los centros españoles han colaborado de forma eficaz e importante.

Con estos protocolos de tratamiento, se ha conseguido ir incrementado la supervivencia global de estos pacientes a lo largo de los años, probablemente debido a una mejor estratificación por grupos de riesgos, que permite aplicar la quimioterapia necesaria, llegando hasta un 63% en el último protocolo analizado (NII-92)^{159,160}.

Además de los estudios clínicos, el principal avance del Grupo Europeo de Neuroblastoma ha sido el establecimiento de Comités o Grupos de Trabajo en las diferentes disciplinas implicadas en esta enfermedad, que se han encargado de diseñar “Standard operating procedures” o procedimientos estándar con una calidad garantizada para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad, que ha aumentado enormemente la calidad de la asistencia de los niños afectados de neuroblastoma en los distintos países miembros. Los podemos clasificar en Comités Clínicos (Medicina Nuclear, Radiología, Cirugía, Farmacología, Inmunoterapia) y Comités relacionados con la biología tumoral (Biología, Inmunocitología, Patología, EMR).

Aunque existe consenso respecto al importante papel de la MIBG en la evaluación objetiva de la respuesta al tratamiento en el NB, especialmente en las metástasis óseas, en el estudio piloto retrospectivo que realizó el Subcomité de Medicina Nuclear de la SIOPEN, se identificaron algunos problemas, que coinciden con los que hemos detectado nosotros y que destacan la necesidad de llegar a un consenso respecto a la técnica de adquisición de las imágenes, interpretación y aplicación de una puntuación o score a la MIBG. Por ello se decidió preparar una “Guía para la realización e interpretación de la MIBG en los pacientes con NB”, que se ha publicado recientemente, cuya difusión y seguimiento permitirán un mejor conocimiento de la técnica, y una aplicación más homogénea; incluyéndose en el nuevo protocolo internacional cooperativo de tratamiento de Neuroblastoma de Alto Riesgo como un Factor pronóstico más. (*Criteria for evaluation of disease extent by (123)I-metaiodobenzylguanidine scans in neuroblastoma: a report for the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Task Force. Matthay KK, Shulkin B, Ladenstein R, Michon J, Giammarile F, Lewington V, Pearson AD, Cohn SL. Br J Cancer. 2010 Apr 27;102(9):1319-26. Review*).

El protocolo europeo, todavía en edición, recoge los diferentes scores que se han utilizado tanto a nivel europeo como en USA, decidiéndose por un nuevo Score que presenta más localizaciones puntuables, así como unos criterios de calidad¹⁷².

La realización de este estudio piloto, nos ha permitido conocer la factibilidad de realizar este procedimiento en nuestro medio, permitiéndonos

identificar los problemas potenciales que se deben solucionar para llevar a cabo el proyecto con éxito, permitiéndonos proponer su aplicación de forma prospectiva en el grupo español en el próximo protocolo cooperativo internacional de tratamiento de Neuroblastoma, dado que en nuestro medio existe un hábito importante de colaboración entre centros que permite una fluidez y sistemática de trabajo objetiva y de alta calidad.

El uso de un método de puntuación o score seleccionará los pacientes que deben ser candidatos a nuevas terapias, al anticipar una respuesta pobre a la quimioterapia de inducción convencional. Ya que se ha comprobado que el tratamiento de la EMR con megaterapia y rescate con progenitores hematopoyéticos es más efectivo en el caso de no existir masa residual medible¹⁷³. También el tratamiento con 13-cis-retinoico se ha mostrado más efectivo en caso de respuesta completa.

Además, este método puede ser usado como una mejor evaluación de respuesta en pacientes que se encuentran dentro de Ensayos clínicos, en los que el INRC no es suficiente como método de evaluación de respuesta. Y en los casos pertinentes, la MIBG terapéutica puede ser una opción.

SCORE:

La MIBG es un derivado de la guanetidina y análogo de la norepinefrina que suele ser captado por los tumores derivados del tejido nervioso simpático.

La persistencia del depósito óseo de MIBG tras la quimioterapia de inducción, en el momento previo al trasplante de progenitores

hematopoyéticos, ha destacado como un indicador de mal pronóstico¹⁷⁴, poniendo en evidencia la presencia de enfermedad activa por refractariedad a la quimioterapia, que puede predecir mayor riesgo de recidiva.

Esta técnica ha superado a la ^{99m}Tc-MDP-99 en la detección de metástasis óseas de neuroblastoma, demostrando una sensibilidad y especificidad cercana al 90%¹⁷⁵, el Grupo de Expertos del Neuroblastoma de la SIOPEN recomienda la aplicación de la MIBG al diagnóstico para valoración del tumor primario, afectación ósea asintomática y nodal en los pacientes con neuroblastoma^{20,176}; así como para la valoración de la respuesta al tratamiento.

Inicialmente, la valoración de las metástasis óseas en la MIBG fue cualitativa, es decir, positividad o no de captación que sugiera metástasis óseas, pero existen algunos grupos que han demostrado la utilidad de diferentes métodos semicuantitativos¹⁴⁸⁻¹⁵³ de MIBG para la medición de respuesta en neuroblastoma avanzado, incrementando la precisión y la correlación de una respuesta precoz con la supervivencia en algunos casos; estratificando a los pacientes en grupos de riesgo, y ofreciendo la posibilidad de utilizar otros tratamientos más agresivos o de segunda línea en casos de tumores refractarios, como la ¹³¹I-MIBG, inhibidores de tirosin-kinasa, agentes antiangiogénicos, u otros agentes quimioterápicos.

El uso del Score semicuantitativo en la interpretación de la MIBG, al ser un método más objetivo para la medición de la respuesta al tratamiento, también parece incrementar la concordancia inter-observador, permitiéndonos

comparar nuestros resultados con otros centros dentro de estudios cooperativos internacionales, perfilándose como una forma esencial de estratificación de los pacientes para adaptar el manejo de los mismos y conseguir así una mayor supervivencia.

Todos los procedimientos semicuantitativos utilizados para valorar los depósitos de MIBG se han basado en otorgarles una puntuación o score según la extensión y en algunos casos también la intensidad de la captación en el tumor primario y en los diferentes segmentos óseos corporales.

Ady et al¹⁷⁷ propusieron un método en el que se divide el cuerpo en 9 segmentos, puntuando cada una de ellas entre 0 y 3 según la extensión de las lesiones, obteniendo los scores absolutos al sumar la puntuación de cada región y unos scores relativos al dividir el score absoluto (al diagnóstico, a mitad y tras finalizar la quimioterapia de inducción) por el score al diagnóstico. Estudió 27 pacientes con neuroblastoma metastático, concluyendo que el score a mitad de la inducción es un buen predictor de respuesta al final de la inducción, $p < 0.0001$.

Suc et al¹⁵⁵, 1996 utilizaron una versión modificada de este score en 86 pacientes con NB metastático mayores de 1 año tratados homogéneamente. La MIBG se realizó al diagnóstico y tras la inducción, no diferenciaron entre una captación única, múltiple o difusa, simplemente puntuaron los diferentes segmentos del cuerpo como positivos o negativos. Concluyeron que el riesgo de no conseguir una remisión completa tras la inducción era mayor en aquellos pacientes que tenían una puntuación mayor

de 4 al diagnóstico. Un análisis multivariante incluyendo el resto de los factores pronósticos conocidos reveló que el score de MIBG era el causante ($p < 0.001$). No diferenciaron entre captación única o múltiple/difusa en cada segmento.

Perel 1999¹¹⁶ estudiaron 30 pacientes mayores de 1 año con NB estadio 4. Había una tendencia a tener peor pronóstico en los pacientes mayores de 1 año con scores al diagnóstico >10 ($P = 0.08$) o MIBG alterada tras la inducción ($p=0.09$). Sin embargo, hubo mucha discordancia entre los resultados de la MIBG y el Tc-99.

Matthay, en 2003¹⁷⁸, estudió MIBG al diagnóstico, tras 2 y 4 ciclos de quimioterapia y al finalizar la inducción en 75 pacientes con neuroblastoma estadio IV utilizando el score de Ady¹⁷⁷, añadiendo partes blandas. Concluyó que la probabilidad de tener una respuesta completa o una buena respuesta parcial era mayor si el score relativo era $\leq 0,5$ o $\leq 0,24$ tras 2 y 4 ciclos respectivamente, siendo la supervivencia libre de eventos también mayor ($p=0,053$ y $0,045$).

Katzenstein et al 2004¹⁷⁹ investigaron la respuesta a la quimioterapia de inducción, evaluada mediante MIBG a la que se aplicó un score semicuantitativo. Vieron que la supervivencia libre de eventos a los 4 años era menor en los casos que tenían captación osteomedular al diagnóstico y en aquellos con un score ≥ 3 tras la inducción.

Aplicando un procedimiento parecido, Howard et al 2004, estudió 29 niños con NB de alto riesgo, identificando un subgrupo de pacientes de ultra-

alto riesgo en base a la persistencia de un score ≥ 3 tras la quimioterapia de inducción, ya que presentaban periodos libres de enfermedad más cortos.

Messina 2006¹⁵⁷ aplicaron 2 sistemas de puntuación a las MIBG realizadas a 57 pacientes que iban a recibir MIBG terapéutica tras recaída de neuroblastoma. Uno de los scores dividía el cuerpo en 9 segmentos que evaluaban la existencia de lesiones osteomedulares, y además añadía un décimo segmento que evaluaba la afectación de partes blandas. El otro sistema dividía el cuerpo en 7 segmentos y no recogía la afectación de partes blandas. El primer método tuvo mayor concordancia inter-observadores, realizando un score relativo (score tras tratamiento de inducción dividido por el score al diagnóstico), encontrando una correlación significativa con la respuesta tumoral. La concordancia era mayor si el score al diagnóstico era superior a 5. Por lo tanto concluyeron que la aplicación de un score semicuantitativo de MIBG es un método de mayor valor (en comparación al método cualitativo) para evaluar la respuesta en pacientes con neuroblastoma en recaída.

A pesar de existir muchos grupos que han demostrado cierta utilidad de los diferentes scores semicuantitativos, ninguno de los numerosos métodos utilizados han demostrado tener mayor correlación con el pronóstico del paciente que los demás.

En la reunión del subcomité de Físicos y Medicina Nuclear del grupo SIOPEX que se celebró en Londres del año 2003 se consideró la necesidad de utilizar un score semicuantitativo de MIBG para valorar la respuesta al

tratamiento en los pacientes con NB metastásico, basándose en las referencias descritas anteriormente^{155,156,177,178}.

En el año 2008, este mismo subcomité, en la Reunión ANR (Advances in neuroblastoma Research) presentó los resultados preliminares de la revisión de 357 pacientes en los que se aplicó el score retrospectivamente a las MIBG realizadas al diagnóstico y tras la quimioterapia de inducción. Las conclusiones fueron que se trataba de un método sencillo, reproducible, y con poca variabilidad interobservadores, considerándose idóneo para determinar el valor pronóstico en NB de alto riesgo. Además, se relacionó la existencia de ≤ 3 captaciones óseas al diagnóstico y el score <3 tras la quimioterapia de inducción con una mayor supervivencia.

Por ello, para la realización de este trabajo, se ha elegido el Score de interpretación semicuantitativa de MIBG avalado por el Grupo de Expertos de Neuroblastoma de la SIOPEN, que tiene en cuenta la intensidad y la extensión de las lesiones, pero no la captación en el tumor primario o en partes blandas.

Dicho score se encuentra detallado en el apartado de Material y métodos, y se ha aplicado a las gammagrafías de MIBG realizadas a los niños diagnosticados y tratados en nuestro Hospital de NB metastásico, tanto al diagnóstico como tras la quimioterapia de inducción.

INCONVENIENTES/LIMITACIONES DEL ESTUDIO:

Tamaño muestral: Debido a la baja prevalencia del neuroblastoma metastásico.

Sin embargo, se ha mantenido la población diana a los pacientes con Neuroblastoma metastásico, ya que, incluso los regímenes actualmente utilizados de quimioterapia intensiva, si bien superiores a los convencionales, resultan ineficaces en más de la mitad de los casos, por su alta tasa de recaída en hueso y médula ósea o por su refractariedad al tratamiento, siendo aquellos en los que más retos plantea su tratamiento.

Por otro lado, no hemos ampliado el estudio a otros hospitales para mantener cierta homogeneidad en las muestras de las MIBG, puesto que previo a la publicación de las “Recomendaciones o Guía para la realización e interpretación de la MIBG”¹⁷⁶, no existía regulación al respecto.

Calidad/homogeneidad de las muestras de MIBG: Al igual que en la revisión llevada a cabo por el Subcomité de Medicina Nuclear del grupo Europeo de Neuroblastoma, se han identificado algunos obstáculos a la hora de aplicar el score semicuantitativo, que deberán ser salvada previo a su uso en el seno de un estudio multicéntrico: mala calidad de algunas evaluaciones o falta de homogeneidad que las hace difícilmente comparables.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Se han subdividido en tres apartados:

A.- Análisis descriptivo de las características de los pacientes (población de estudio).

B.- Estudio de los diferentes factores pronósticos conocidos.

C.- Estudio de la aplicación del score semicuantitativo.

D.- Estudio multivariante.

A.- Análisis descriptivo de las características de los pacientes.

El análisis univariante de los factores pronósticos recogidos en este estudio corrobora los conocidos en la literatura: peor pronóstico de pacientes con LDH elevada, y N-Myc amplificado. Los resultados obtenidos del análisis del resto de las variables consideradas factores pronósticos no han alcanzado significación estadística.

1.- Características de la muestra:

El análisis descriptivo de las características de la muestra nos indica que asocian factores de peor pronóstico en mayor porcentaje a lo esperado². Es decir, el 86% de los pacientes presentan metástasis en médula ósea, el 82% en hueso, y el 71% en ambas. La ENE estaba elevada en el 69% de los casos, y muy elevada en la mitad de los casos. La LDH se encuentra

aumentada en el 88% de los casos (muy elevada en el 73%). El 59% tenía una histología desfavorable. El 30% estaban amplificadas, y el 43% presentaban delección 1p.^{18,180}. En la mayoría de las series se describen los porcentajes en total, siendo difícil encontrarlos subdivididos según el estadio, pero estos incrementos podrían deberse a que los pacientes que hemos elegido para el estudio son todos metastásicos. En el caso de la Amplificación N-Myc, sí se ha constatado un incremento en los tumores metastásicos (32%), que concuerda con nuestros datos². En cuanto a la delección 1p36, se presenta en el 35% de los neuroblastomas primarios, y aunque los diferentes autores suelen constatar que es más frecuente en estadios avanzados, no existe una cifra.

Los pacientes que presentaban metástasis óseas al diagnóstico tenían más frecuentemente ENE elevada (**p valor 0,097**).

2.- Variaciones según protocolo de tratamiento utilizado:

Los pacientes que fueron tratados con el protocolo HRNBL1 (32%) presentaron una supervivencia libre de eventos menor que los que recibieron el protocolo anterior (**p valor 0.004**), con una supervivencia global 22% vs 31%; **p valor 0.001**.

Por ello, se han analizado las características de los pacientes en ambos grupos, encontrando que no son homogéneos, es decir, existen diferencias significativas en cuanto a la presencia de más factores de mal pronóstico en el grupo HRNBL1, que podrían haber influido en su peor evolución. Las diferencias más significativas son:

N-Myc amplificados (55% vs 17%; **p valor 0.046**). La amplificación N-Myc está descrita como uno de los marcadores pronósticos más importantes en neuroblastoma, después del estadio tumoral. Este último factor pronóstico no es valorable en estos pacientes puesto que todos ellos son estadio IV.

Además, en el grupo de los tratados con el protocolo HRNBL se asoció con más frecuencia una LDH aumentada (100% vs 82%; p valor 0.18) (aunque la LDH elevada no se relacionó con peor respuesta inicial al tratamiento, sí tuvieron menor supervivencia global y menor tiempo de supervivencia); mayor edad de los pacientes (3,17 vs 2,42 años; p valor 0,78); MIBG post-inducción >0 (37% vs 16%; p valor 0,25).

Los pacientes con N-Myc amplificado, presentaron una peor evolución, con mayor riesgo de recaída (especialmente local), menor supervivencia global y mayor asociación con otros factores pronósticos¹⁸¹ (histología desfavorable y delección 1p).

Es decir, existen diferencias en las características o variables de los pacientes incluidos en los diferentes protocolos de tratamiento consecutivos. Dichas diferencias explican la divergencia existente en la supervivencia de los pacientes en ambos protocolos. Es importante recalcar que los resultados generales del protocolo (no sólo de nuestros pacientes), también han sufrido un descenso aunque mínimo de la supervivencia respecto a los anteriores.

B.- Estudio de los diferentes factores pronósticos conocidos.

1.- La amplificación N-Myc:

La amplificación N-Myc es uno de los factores reconocidos como de entidad pronóstica¹⁸¹ en la valoración de los pacientes con neuroblastoma, por ello se compararon las características de los pacientes con y sin amplificación N-Myc, encontrándose las siguientes diferencias:

También estos casos con amplificación N-Myc se asociaban más frecuentemente con una delección 1p (87% vs 21%; **p valor 0,003**).

En el grupo de los amplificados, el 87% se consideraron de histología desfavorable; vs el 43% en el grupo de los no amplificados; **p valor 0,014**.

El riesgo de recaída en los pacientes amplificados fue mayor (p valor 0.15); siendo el más importante el riesgo de recaída inicialmente local (2/8 vs 1/18 p valor 0.15). El riesgo de fallecimiento a 5 años también fue mayor en estos pacientes (**p valor 0.06**).

Todos estos resultados concuerdan con lo descrito en la literatura².

2.- Edad:

Aunque no se han encontrado diferencias significativas, sí existe tendencia a que los pacientes diagnosticados con mayor edad tuvieran metástasis óseas al diagnóstico, también es más frecuente la recaída (especialmente la recaída en M ósea; **p valor 0,01**) y una MIBG post-inducción >0.

Existe una tendencia a tener valores de ENE más elevados en los pacientes menores (**p valor 0,08**).

3.- Supervivencia global:

Los pacientes que presentaban metástasis óseas al diagnóstico tenían mayor tendencia a la recaída y fallecimiento respecto a los que no las tenían (**p valor 0,08**).

Aquellos casos en los que N-Myc estaba amplificado, tuvieron una mayor incidencia de recaídas (100% vs 77%; $p=0.15$); la recaída inicialmente local ha sido especialmente más frecuente en este grupo (25% vs 5%; $p=0.15$); siendo la supervivencia global menor (12% vs 0%; **p valor 0.06**).

4.- Estudio de horizontes de supervivencia:

Se ha realizado un estudio más detallado de los factores pronósticos, basado en fijar unos "horizontes de supervivencia" o puntos de corte en la supervivencia global, que pueden ser superados o no, consiguiendo estratificar

en 2 grupos. De ese modo, se diferencian pacientes con tumores de mayor o menor agresividad por disminuir el tiempo de supervivencia o recaer antes.

Los puntos de corte elegidos han sido: 20 meses (ya que el percentil 25 del tiempo de supervivencia global es de 19,11 meses); y 90 meses (p75 91,2 meses).

El 89% de los pacientes con tumores que no estaban amplificadas consiguieron una supervivencia superior a 20 meses, comparado con el 25% de los amplificadas. Test exacto de Fisher. p **valor 0,003**.

El 67% de los pacientes con LDH normal al diagnóstico consiguieron alcanzar un tiempo de supervivencia \geq a 90 meses, sin embargo, sólo un 17% con LDH >500 lo alcanzaron. Test exacto de Fisher= p valor 0,12.

No obstante, hay que tener en cuenta que los pacientes con mala evolución reciben tratamientos de segunda línea que pueden aumentar su supervivencia.

C.- Estudio de la aplicación del score semicuantitativo

La aplicación de un Score semicuantitativo de MIBG que pueda resultar predictivo o pronóstico en los pacientes con neuroblastoma, sigue siendo un reto para la SIOPEN. Tras algunas reuniones internacionales, se han constatado los obstáculos para su uso como factor pronóstico, decidiéndose la publicación de una Guía de Recomendaciones sobre la realización e interpretación de la MIBG en el neuroblastoma, con el propósito de, aplicando estas medidas de buena práctica clínica, conseguir exploraciones de mayor calidad, más uniformes y con menor variación inter-observador, que permita su uso a nivel multicéntrico incluso en ensayos clínicos, al hacerlas comparables entre ellas. También nosotros hemos llegado a esta conclusión tras su aplicación a nuestros pacientes.

1.- ^{123}I -MIBG al diagnóstico:

Se ha objetivado en todos los casos una disminución de la puntuación del score absoluto tras la administración de la quimioterapia de inducción.

Aunque no hemos encontrado un score basal al diagnóstico a partir del cual nos defina un grupo de ultra-alto-riesgo con una supervivencia global peor y estadísticamente significativa, sí hemos visto una tendencia a empeorar el pronóstico en los casos cuya puntuación del score al diagnóstico era más elevada.

Se han estudiado diferentes puntos de corte para encontrar una puntuación que nos diferencie dos grupos de riesgo:

Posteriormente, se realizó el mismo estudio, pero considerando sólo aquellos pacientes con MIBG al diagnóstico ≥ 0 :

En este caso, en los pacientes con una **puntuación del score de MIBG ≥ 5 al diagnóstico**, la supervivencia global a 5 años ha sido del 15,8%, en comparación al 57,1% en los que tenían un score < 5 .

También la media del tiempo de supervivencia ha sido mayor en los que tenían un score < 5 (media de 127,8 meses) en comparación a 49,9 meses en los casos con puntuación de score de MIBG al diagnóstico ≥ 5 , aunque no se alcanza significación estadística pero sí una tendencia: **p valor 0,13**).

Este resultado se correlaciona con los del Grupo de Neuroblastoma (Yanik) del Children's Oncology Group, que en su última reunión, presentó un estudio similar, aunque utilizando el Score del Curie, siendo la supervivencia libre de eventos a los 3 años del 41,5% si el score al diagnóstico era < 5 y del 8,3% si el score era > 5 , observando diferencias significativas $p > 0,0001$.

Sin embargo, en el estudio de Mathay¹⁷⁸, el score absoluto al diagnóstico no se correlacionó con la previsión de mejor respuesta.

Suc et al¹⁵⁵, encontraron diferencias en cuanto a la supervivencia mayor si el score era ≤ 4 al diagnóstico, aunque su score no diferenciaba la captación única de la múltiple o de la difusa, ya que simplemente puntuaban como positivo o negativo cada uno de los segmentos del cuerpo.

Frappaz¹⁵⁶ correlacionó un score inicial más alto con una peor respuesta a la quimioterapia, con una concordancia entre observadores >0,8. Su Score diferenciaba la intensidad y la extensión (difusa o focal) de la captación de forma separada, como en nuestro caso.

Perel¹¹⁶ también confirmó una tendencia a tener peor pronóstico en los pacientes con scores al diagnóstico >10 (P = 0.08) o MIBG alterada tras la inducción (p=0.09).

También hemos encontrado diferencias, significativas estadísticamente, en los casos cuyo **score de puntuación de MIBG al diagnóstico era > 30** vs ≤ 30 , con diferencias de media de tiempo de supervivencia evidentes (13,7 meses vs 84,6 meses), siendo **p valor 0,002**. Pero en el grupo de > 30 sólo habían 3 pacientes, aunque todos ellos han fallecido.

2.- ¹²³I-MIBG tras el tratamiento de inducción:

Todos los pacientes que se encuentran vivos, presentaron una puntuación 0 en la evaluación post-inducción; y por lo tanto, entre los que tenían un score >0, había una tendencia a tener peor evolución (**p valor 0,07**).

En nuestra serie, existe una tendencia, aunque no significativa a presentar más recaídas óseas en los pacientes con MIBG post-inducción >0 (**p valor 0,09**).

La edad media al diagnóstico de los pacientes que consiguieron un score de MIBG tras inducción de 0 fue menor, p valor 0,14.

En los pacientes que tenían un score de 0 en la MIBG realizada tras la quimioterapia de inducción, la media del tiempo de supervivencia a 5 años ha sido mayor (81,6 vs 33,2 meses, con un p-valor 0,13). Además, el tiempo hasta la recaída también ha sido mayor (17 meses vs 13,6 en los que tenían un score >0), pero aquellos pacientes que no habían “respondido” completamente, recibieron tratamientos de 2º línea que podrían haber aumentado su supervivencia.

3.- Estudio de horizontes de supervivencia según Scores de ¹²³I-MIBG:

Dado el mal pronóstico de los pacientes con neuroblastoma metastásico, incluidos en este estudio porque representan un reto respecto al tratamiento, así como debido al tamaño muestral, se ha optado por realizar también el estudio de supervivencia basado en superación o no de diferentes horizontes de supervivencia. Revisando la literatura, no se ha encontrado ninguna referencia a ningún estudio parecido. Sin embargo, parece interesante estudiar la “cantidad” de supervivencia de estos pacientes, puesto que hay diferencias entre los que recaen precozmente y los que lo hacen a largo plazo.

Para ello, se han utilizado los mismos grupos que en el apartado anterior (20 y 90 meses).

Además, dentro de cada uno de los 2 subgrupos de estudio, se han estudiado los pacientes utilizando a su vez diferentes puntos de corte de las puntuaciones del score de MIBG al diagnóstico (5, 10, 14, 27 y 30), así como puntuación post inducción de 0 ó > 0.

Los pacientes con un **Score de MIBG al diagnóstico ≤ 14** alcanzaron más frecuentemente una supervivencia mayor de 90 meses que los que tenían un Score >14 . **p valor 0,052.**

4.- EMR en médula ósea.

Se analizó la afectación de la médula ósea o enfermedad mínima residual mediante técnicas habituales (morfología) y otras técnicas más sensibles (TH cuantitativa y DCX). Veintisiete de 28 pacientes presentaban médulas óseas negativas morfológicamente en la evaluación previa al TPH/quimioterapia de consolidación, pero en 14 casos se estudió la afectación de médula ósea mediante técnicas más sensibles, siendo la TH positiva en 5 casos (36%) a pesar de que no se vieran células metastásicas en el aspirado o biopsia con los métodos convencionales. De ellos, 3 fueron débilmente positivos (+), y 2 (%) fueron intensamente positivos (++) . La DCX fue negativa en los 7 casos en los que se realizó tras la quimioterapia de inducción, siendo los resultados superponibles a la TH, excepto en un caso en el que la TH fue débilmente positiva y la DCX fue negativa. Este paciente recayó a los 1,7 años. Uno de los pacientes que tenía la TH intensamente positiva, recayó 1,75 años después.

En nuestro caso, dado el tamaño muestral, no podemos extraer conclusiones respecto a la indicación o no de realizar una u otra técnica para la medición de la EMR, ni podemos correlacionar su positividad con una peor evolución, puesto que los pacientes con EMR positiva, también presentaban

afectación a otros niveles y continuaron recibiendo tratamiento. Es necesario realizar más estudios para obtener evidencia estadística.

D.- Estudio multivariante:

*Berthold y cols*¹⁸² en 1994 ya analizaron de forma multivariante los factores pronósticos en Neuroblastomas, pero se ciñeron a tumores localizados. En su estudio, el factor más informativo sobre la posible evolución de los pacientes era la LDH, seguido de la resecabilidad del tumor, la pérdida de peso y el tumor que se extiende más allá de la línea media (que por definición es un estadio 3). En nuestro caso, nos hemos dedicado al estudio de los pacientes con estadio 4, que son aquellos que requieren de nuevos enfoques en el manejo puesto que su pronóstico es infausto.

El modelo multivariante requiere un conjunto completo de datos de todos los pacientes incluidos en el análisis. El estudio de la regresión de Cox se realizó en 28 pacientes, este modelo de Cox seleccionó tan sólo la variable N-Myc y no consideró informativas las otras variables.

Por tanto, el modelo de supervivencia adecuado sólo incorpora la variable N-Myc. Como N-Myc está recodificada en dos categorías, su incorporación al modelo se ha realizado mediante un método no paramétrico (Kaplan-Meier) y mediante un método semi-paramétrico (regresión de Cox con N-Myc como covariable).

Los datos superan las pruebas de riesgos proporcionales, por lo que el modelo de Cox fue finalmente el utilizado, siendo más informativo que Kaplan-Meier.

- Así pues, en nuestra serie, el factor más importante que influye en la supervivencia de los pacientes es la amplificación del N-Myc.
- Y, por tanto, ninguno de los otros factores analizados con este método multivariante nos aporta mayor información (con relevancia estadística).

DISCUSSION

Several studies have shown that incorporation of MIBG scan results into analysis of response is critical both for determining response and survival. An objective and consistent method for interpretation of these scans is therefore critical for comparison of clinical outcomes in a multicentric setting.

1. - ^{123}I -MIBG Score at diagnosis:

We have studied different cutoffs of MIBG, trying to find a score that differentiates two risk groups, and we have not found a statistically significant cut-point score at diagnosis from which we could define a group of ultra-high-risk patients with worse prognosis. But we have seen a tendency to worsen the prognosis in cases whose score at diagnosis was higher.

Subsequently, we performed the same study, but considering only those patients with MIBG at diagnosis ≥ 0 :

In this case, patients with a MIBG score ≥ 5 at diagnosis, had a 5 years overall survival of 15.8%, compared to 57.1% in those with a score <5 .

Also the mean survival time was greater in those with a MIBG score <5 (mean of 127.8 months) compared to 49.9 months in cases with MIBG score at diagnosis ≥ 5 , although not reached statistical significance but there was a trend: p value 0.13).

These correlations are consistent with the results reported by the literature:

These results correlate with Yanik's results (Neuroblastoma Group of the Children's Oncology Group), which in their last meeting presented a similar study, using the Curie Score. They reported a 3 years event-free survival of 41.5 % if the score at diagnosis was <5 and 8.3% if the score was > 5, observing significant differences $p < 0.0001$.

However, in the study of Mathay¹⁷⁸, the absolute score at diagnosis did not correlate with better response forecasting.

Katzenstein¹⁷⁹ showed a trend associating inferior outcome with persistent osteomedullary ¹²³I-MIBG uptake following induction therapy.

Perel¹¹⁶ also confirmed a trend toward worse prognosis in patients with scores at diagnosis > 10 (p value 0.08) or MIBG still positive after induction (p value 0.09).

A retrospective study of almost 700 neuroblastoma patients in the European Bone Marrow Transplant (EBMT) Solid Tumour Registry demonstrated that one of the most important prognostic factors was the negativity MIBG bone scans at the time of bone marrow transplantation¹⁷⁴.

Other retrospective studies have also indicated that MIBG scintigraphy has prognostic value in children with high-risk NB^{155,183}.

In another study, Suc et al¹⁵⁵ evaluated the predictive value of diagnostic MIBG scans in 86 children older than 1 year of age with metastatic NB. In an effort to systematically measure MIBG positivity, these investigators devised a scoring system in which, similar to our scoring system, the skeleton was divided into seven zones, and each zone was

scored as either negative (0) or positive (1), but did not differentiate between a single focus of uptake, multiple foci or diffuse uptake. Patients with scores >4 at diagnosis had a significantly higher risk of failing to achieve a complete response to induction therapy.

Frappaz et al¹⁵⁶ examined intensity and extent (diffuse or focal) of uptake separately, showing a good concordance between higher initial MIBG score and poor response to chemotherapy, with an interobserver concordance > 0,8. Their Score differentiated intensity and extent (diffuse or focal) uptake separately, as in our case.

We also found differences statistically significant in cases where MIBG score at diagnosis was > 30 vs \leq 30, with mean differences in survival time (13.7 months vs. 84.6 months), with p value 0,002. But there were few patients in each arm.

2. - ¹²³I-MIBG after induction therapy:

All the patients who are still alive had a MIBG Score of 0 in the evaluation performed after induction therapy. Therefore, those with a score > 0, had a tendency to have worse clinical outcome (p value 0.07). Mean age at diagnosis of those patients who achieved a MIBG score of 0 after induction was lower (p value 0.14).

In our series, patients with MIBG score post-induction >0 had a tendency to have more bone relapses (p value 0.09).

The average of survival time was higher in patients who had a score of 0 in the MIBG performed after induction chemotherapy (81.6 vs. 33.2 months, p-value 0.13) . Furthermore, the time to relapse was also higher (17 months vs 13.6 in those with a score > 0).

We should take into account that those patients who were refractory received second line treatments that might have increased survival.

Matthay et al¹⁷⁸ conducted a retrospective analysis of 75 children with high-risk NB to determine if early response to therapy measured by MIBG correlated with EFS. In their study, MIBG scans were scored using a system that was originally developed at the Institute Curie. They divided the skeleton in nine zones, with a tenth zone used to score extraosseous metastases. Each zone was scored from 0 to 3 depending on the extent of involvement, with a maximum absolute total score of 30. They calculated the relative score for each patient, defined as absolute score after induction treatment/absolute diagnostic score. Similar to our results, improved EFS was seen in patients with metastatic response to induction therapy, following two or four cycles of induction therapy, respectively.

3. - Study of Survival Horizons according to ¹²³I-MIBG Scores:

Due to the poor prognosis of metastatic neuroblastoma patients included in this project, we decided to study the study also based on overcoming survival or survival of different horizons.

Reviewing the literature, we did not find any reference to any similar study. However, it seems interesting to study the "quantity" of time of survival in these patients, since there might be differences between those who relapse early and those in the long term.

For this reason, we used the same groups as in the previous section (cutoff 20 and 90 months).

Moreover, within each of the two groups of study patients, we have studied some subgroups using different cutoffs scores of MIBG: at diagnosis (5, 10, 14, 27 and 30) and post induction (0 or > 0).

Patients with a MIBG score at diagnosis ≤ 14 reached more often the time of 90 months than those with a score > 14 (p value 0.052).

In a retrospective study, there is always the possibility that variations in therapy may have affected the response and EFS analyses. However, the variations were minor because all patients received the same chemotherapy agents for induction therapy.

Taken together, the results of our study and other studies indicate that identification of early response to therapy is highly prognostic in NB. It has been previously shown that therapy for minimal residual disease for patients completing myeloablative therapy is much more effective if there is no measurable residual disease. Thus, 13-cis-retinoic acid has been shown to improve EFS after myeloablative therapy and to be most effective for patients in CR at the time of treatment¹⁷³.

Children with persistent osteomedullary uptake on MIBG scintigraphy following induction therapy represent an ultra-high risk group of NB patients. Furthermore, measuring the osteomedullary response using a scoring system appears to provide additional information that can help distinguish the patients who have a high likelihood of long-term remission with intensive, multimodality therapy from those that are destined to relapse early. Alternative therapeutic strategies such as ^{131}I -MIBG^{126,184}, biologic agents including retinoid^{185,186}, tyrosine kinase inhibitors¹⁸⁷, antiangiogenic agents¹⁸⁸, and immunotherapy^{189,190}, as well as novel chemotherapeutic drugs, should be considered for this patients.

Current cooperative high-risk neuroblastoma protocols both in Europe and North America are incorporating semiquantitative scoring by MIBG scan into their central review of response, and the International Neuroblastoma Risk Group reached a consensus on incorporation of a common scoring system into their evaluation of response for a more objective measure and to facilitate comparison between studies.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- El tratamiento del neuroblastoma de alto riesgo es un reto, ya que incluso con los tratamientos actuales, basados en regímenes de quimioterapia intensiva, sólo se consigue una supervivencia de < 50%, debido a una alta tasa de recaída en hueso y médula ósea.
- 2.- La evaluación de la respuesta al tratamiento es uno de los Factores pronósticos de mayor impacto.
- 3.- La población analizada cumple con el perfil conocido que corresponde a una población típica de pacientes con Neuroblastoma de Alto Riesgo.
- 4.- Para realizar una evaluación objetiva de la respuesta en las metástasis óseas, la interpretación de la MIBG mediante un score semicuantitativo es una forma esencial de estratificación de los pacientes para adaptar el manejo de los mismos y conseguir así una mayor supervivencia.
- 5.- Dentro de nuestro estudio, en el análisis multivariante, el único factor que ha demostrado influir en la supervivencia de forma independiente ha sido la presencia de N-Myc.
- 6.- En el análisis univariante, se confirma que la presencia de N-Myc disminuye la supervivencia, y que además, se asocia de forma significativa con la del 1p y la histología favorable. Además, se aprecian algunas tendencias en cuanto a una menor supervivencia en los casos con de delección 1p, LDH elevada al diagnóstico y mayor edad, todo ello concordante con la literatura.

7.- El estudio de la puntuación semicuantitativa o score de MIBG al diagnóstico, mediante el uso de puntos de corte, no ha alcanzado significación estadística. Excepto en el caso de aquellos pacientes con Score >30, siendo muy pocos los pacientes incluidos en cada rama. Existe una tendencia en cuanto a que el score de ^{123}I -MIBG al diagnóstico ≥ 5 y una mayor edad del paciente se asocian con menor supervivencia.

8.- La puntuación o Score de ^{123}I -MIBG tras tratamiento de inducción >0 se ha confirmado como un factor de peor evolución.

9.- El análisis basado en la “superación de horizontes de supervivencia” indica que:

- Los pacientes con NB que no presentan amplificación N-Myc consiguen más frecuentemente una supervivencia > 20 meses.

- Aquellos pacientes con Puntuaciones o Score al diagnóstico ≤ 14 alcanzan más frecuentemente de forma significativa una supervivencia > 90 meses.

10.- El tratamiento del neuroblastoma mejoraría utilizando nuevos marcadores pronósticos medidores de respuesta precoz. La evaluación semicuantitativa de la ^{123}I -MIBG de forma prospectiva, se perfila como una de las herramientas más útiles de medición de enfermedad residual, haciendo posible la estratificación de los pacientes, definiendo un grupo de ultra-alto riesgo subsidiario de ser incluido en ensayos clínicos con tratamientos más novedosos, incluso el uso de la ^{131}I -MIBG terapéutica.

11.- Es necesario realizar más estudios para poder comprobar su utilidad. La realización de este estudio piloto nos ha permitido diseñar procedimientos

normalizados de trabajo (PNP) para implementar este procedimiento de forma prospectiva en el seno del grupo español de Neuroblastoma, dentro del marco del protocolo cooperativo internacional de Neuroblastoma, siguiendo las recomendaciones del Grupo INRG para aumentar la calidad, eficiencia, homogeneidad y reproducibilidad de la prueba.

12.- Para que los resultados sean comparables, es necesario tener muestras homogéneas, derivadas de la aplicación de las recomendaciones del Subcomité de Medicina Nuclear de SIOPEN en cuanto a la realización e interpretación de la MIBG.

FINAL REMARKS:

1. - The treatment of high-risk neuroblastoma is challenging, with current treatments, based on intensive chemotherapy regimens, complete response is achieved only in <50%.
2. - Evaluation of early response to treatment is a prognostic factor.
3. - The cohort meets the known profile corresponding to a typical population of patients with high-risk neuroblastoma.
4. – The use of a semiquantitative score of MIBG to make an objective assessment of the response to treatment in bone metastases, is an essential way of stratification of patients, to adapt their treatment in order to improve their outcome.
5. - In our study, in multivariate analysis, the only factor that has been shown to influence survival independently has been the presence of N-Myc.
6. - In the univariate analysis, we have confirmed that older patients and those with N-Myc, 1p deletion or elevated LDH at diagnosis trend to have worse prognosis. N-Myc has been associated with 1p deletion and unfavourable histology also. And all of this is consistent with the literature
7. –We have not found any “cut-point” in the semiquantitative MIBG score performed at diagnosis that significantly worsen the prognosis, eExcept in the case of patients with Score> 30, with very few patients in each arm. And there is a trend towards worse outcome in patients with 123I MIBG score

at diagnosis ≥ 5 . 8. - The score of MIBG > 0 , when performed after chemotherapy, has been confirmed as a factor of poor outcome.

9. – In the analysis based on the "survival horizons" we have obtained these results:

- Patients with NB non N-Myc have survival time > 20 months more often.

- Patients with a Score of MIBG at diagnosis ≤ 14 have survival time > 90 months more often.

10.- Neuroblastoma management could be improved using new prognostic markers to predict/asses the effectiveness in the tumor and the risk of relapse in the individual.

11.- The semiquantitative evaluation of ^{123}I -MIBG, in terms of treatment response measurement is emerging as one of the most useful tool. Prospective evaluation of MIBG after induction in High Risk Neuroblastoma patients is a new promising field of clinical research, in order to find an ultra-high risk group of neuroblastoma patients who should be included in clinical trials.

12.- The completion of this pilot study has allowed us to design standard operating procedures (SOP) to implement this procedure prospectively in the next International Cooperative Neuroblastoma study, following the recommendations of the INRG Group to increase the quality, efficiency, uniformity and reproducibility of the test.

13.- More studies are still needed to verify its usefulness and it is necessary to apply a common protocol to have comparable studies.

BIBLIOGRAFÍA

1. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, et al: The International Neuroblastoma Pathology classification (the Shimada system). *Cancer* 86:364-372, 1999
2. Brodeur, Maris: Neuroblastoma, in Pizzo, Poplack (eds): *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Philadelphia, 2006, pp 933-970
3. Navalkele P, O'Dorisio MS, O'Dorisio TM, et al: Incidence, survival, and prevalence of neuroendocrine tumors versus neuroblastoma in children and young adults: nine standard SEER registries, 1975-2006. *Pediatr Blood Cancer* 56:50-7, 2011
4. Castel V, Cañete A, Noguera R, et al: [Neuroblastoma.]. *Clin Transl Oncol* 7:133-45, 2005
5. Castel, Cañete: Tumores de la cresta Neural, in Madero, Muñoz (eds): *Hematología y Oncología Pediátricas*. Madrid, 2005, pp 571-586
6. Castel V, García-Miguel P, Melero C, et al: The treatment of advanced neuroblastoma. Results of the Spanish Neuroblastoma Study Group (SNSG) studies. *Eur J Cancer* 31A:642-5, 1995
7. Canete A, Gerrard M, Rubie H, et al: Poor survival for infants with MYCN-amplified metastatic neuroblastoma despite intensified treatment: the International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Experience. *J Clin Oncol* 27:1014-9, 2009

8. Pritchard J, Cotterill S, Germond S, et al: 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* 44:348-57, 2005
9. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, et al: Neuroblastoma. *Lancet* 369:2106-2120, 2007
10. Coldman AJ, Fryer CJ, Elwood JM, et al: Neuroblastoma: influence of age at diagnosis, stage, tumor site, and sex on prognosis. *Cancer* 46:1896-1901, 1980
11. Evans A, D'Angio G: Age at diagnosis and prognosis in children with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 23:6443-4, 2005
12. Hayes A, Smith E: Neuroblastoma, in Pizzo, Poplack (eds): *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Philadelphia, 1988, pp 607-622
13. Evans AE: Staging and treatment of neuroblastoma. *Cancer* 45:1799-1802, 1980
14. Moroz V, Machin D, Faldum A, et al: 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* 47:561-71, 2011
15. Breslow N, McCann B: Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma. *Cancer Res* 31:2098-103, 1971

16. London W, Castleberry R, Matthay K, et al: Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 23:6459-65, 2005
17. Moroz V, Machin D, Faldum A, et al: 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* 47:561-71, 2011
18. Evans AE, D'Angio GJ, Randolph J: A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer study group A. *Cancer* 27:374-8, 1971
19. Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, et al: International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 6:1874-81, 1988
20. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al: Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 11:1466-77, 1993
21. Castel V, García-Miguel P, Cañete A, et al: Prospective evaluation of the International Neuroblastoma Staging System (INSS) and the International Neuroblastoma Response Criteria (INRC) in a multicentre setting. *Eur J Cancer* 35:606-11, 1999
22. Cohn SL, Pearson AD, London WB, et al: The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 27:289-97, 2009

23. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, et al: The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 27:298-303, 2009
24. Castleberry RP, Pritchard J, Ambros P, et al: The International Neuroblastoma Risk Groups (INRG): a preliminary report. *Eur J Cancer* 33:2113-6, 1997
25. Cecchetto G, Mosseri V, De Bernardi B, et al: Surgical risk factors in primary surgery for localized neuroblastoma: the LNESG1 study of the European International Society of Pediatric Oncology Neuroblastoma Group. *J Clin Oncol* 23:8483-9, 2005
26. Elimam N, Atra A, Faye A, et al: Stage 4S neuroblastoma, a disseminated tumor with excellent outcome. *Saudi Med J* 27:1734-6, 2006
27. London W, Boni L, Simon T, et al: The role of age in neuroblastoma risk stratification: the German, Italian, and children's oncology group perspectives. *Cancer Lett* 228:257-66, 2005
28. Evans AE, Albo V, D'Angio GJ, et al: Factors influencing survival of children with nonmetastatic neuroblastoma. *Cancer* 38:661-6, 1976
29. Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, et al: International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer* 100:1471-82, 2009

30. Ambros IM, Brunner B, Aigner G, et al: A multilocus technique for risk evaluation of patients with neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 17:792-804, 2011
31. London WB, Castel V, Monclair T, et al: Clinical and biologic features predictive of survival after relapse of neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *J Clin Oncol* 29:3286-92, 2011
32. Gitlow SE, Bertani LM, Rausen A, et al: Diagnosis of neuroblastoma by qualitative and quantitative determination of catecholamine metabolites in urine. *Cancer* 25:1377-83, 1970
33. Sawada T: Measurement of urinary vanillylmandelic acid (VMA) and homovanillic acid (HVA) for diagnosis of neural crest tumors. *Pediatr Hematol Oncol* 14:291-3, 1997
34. Zeltzer PM, Marangos PJ, Evans AE, et al: Serum neuron-specific enolase in children with neuroblastoma. Relationship to stage and disease course. *Cancer* 57:1230-4, 1986
35. Abdennebi M, Boussem H, Harzallah L, et al: [The use of neuron specific enolase in the prognosis and followup of neuroblastoma in children. Results of a retrospective series of 21 patients]. *Tunis Med* 78:106-8, 2000
36. Ishiguro Y, Kato K, Ito T, et al: Nervous system-specific enolase in serum as a marker for neuroblastoma. *Pediatrics* 72:696-700, 1983

37. Hann HW, Evans AE, Siegel SE, et al: Prognostic importance of serum ferritin in patients with Stages III and IV neuroblastoma: the Childrens Cancer Study Group experience. *Cancer Res* 45:2843-8, 1985
38. Shuster JJ, McWilliams NB, Castleberry R, et al: Serum lactate dehydrogenase in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group recursive partitioning study. *Am J Clin Oncol* 15:295-303, 1992
39. Joshi VV, Cantor AB, Altshuler G, et al: Recommendations for modification of terminology of neuroblastic tumors and prognostic significance of Shimada classification. A clinicopathologic study of 213 cases from the Pediatric Oncology Group. *Cancer* 69:2183-96, 1992
40. Castel V, Tovar JA, Costa E, et al: The role of surgery in stage IV neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 37:1574-8, 2002
41. Sano H, Bonadio J, Gerbing R, et al: International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age. *Eur J Cancer* 42:1113-9, 2006
42. Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, et al: Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 328:847-54, 1993
43. Joshi VV, Chatten J, Sather HN, et al: Evaluation of the Shimada classification in advanced neuroblastoma with a special reference to the mitosis-karyorrhexis index: a report from the Childrens Cancer Study Group. *Mod Pathol* 4:139-47, 1991

44. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, et al: Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 86:349-63, 1999
45. Navarro S, Amann G, Beiske K, et al: 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* 24:695-9, 2006
46. Burgues O, Navarro S, Noguera R, et al: Prognostic value of the International Neuroblastoma Pathology Classification in Neuroblastoma (Schwannian stroma-poor) and comparison with other prognostic factors: a study of 182 cases from the Spanish Neuroblastoma Registry. *Virchows Arch* 449:410-20, 2006
47. Maris J: The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Curr Opin Pediatr* 17:7-13, 2005
48. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, et al: Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 313:1111-6, 1985
49. Ladenstein R, Ambros IM, Pötschger U, et al: Prognostic significance of DNA di-tetraploidy in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 36:83-92, 2001

50. Caron H, van Sluis P, de Kraker J, et al: Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 334:225-30, 1996
51. Bown N, Lastowska M, Cotterill S, et al: 17q gain in neuroblastoma predicts adverse clinical outcome. U.K. Cancer Cytogenetics Group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol* 36:14-9, 2001
52. O'Neill S, Ekstrom L, Lastowska M, et al: MYCN amplification and 17q in neuroblastoma: evidence for structural association. *Genes Chromosomes Cancer* 30:87-90, 2001
53. Biedler JL, Helson L, Spengler BA: Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33:2643-52, 1973
54. COX D, YUNCKEN C, SPRIGGS AI: MINUTE CHROMATIN BODIES IN MALIGNANT TUMOURS OF CHILDHOOD. *Lancet* 1:55-8, 1965
55. Schwab M, Alitalo K, Klemphauer KH, et al: Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 305:245-8, 1983
56. Taylor CP, McGuckin AG, Bown NP, et al: Rapid detection of prognostic genetic factors in neuroblastoma using fluorescence in situ hybridisation on tumour imprints and bone marrow smears. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Br J Cancer* 69:445-51, 1994

57. Cohn SL, Look AT, Joshi VV, et al: Lack of correlation of N-myc gene amplification with prognosis in localized neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *Cancer Res* 55:721-6, 1995
58. Tonini GP, Boni L, Pession A, et al: MYCN oncogene amplification in neuroblastoma is associated with worse prognosis, except in stage 4s: the Italian experience with 295 children. *J Clin Oncol* 15:85-93, 1997
59. Noguera R, Cañete A, Pellín A, et al: MYCN gain and MYCN amplification in a stage 4S neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 140:157-61, 2003
60. Bagatell R, Beck-Popovic M, London WB, et al: Significance of MYCN amplification in international neuroblastoma staging system stage 1 and 2 neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group database. *J Clin Oncol* 27:365-70, 2009
61. Brodeur GM, Sekhon G, Goldstein MN: Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer* 40:2256-63, 1977
62. Maris JM, White PS, Beltinger CP, et al: Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma. *Cancer Res* 55:4664-9, 1995
63. Fong CT, Dracopoli NC, White PS, et al: Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3753-7, 1989
64. Ambros I, Benard J, Boavida M, et al: Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification. *J Clin Oncol* 21:2077-84, 2003

65. Attiyeh E, London W, Mossé Y, et al: Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* 353:2243-53, 2005
66. Carén H, Kryh H, Nethander M, et al: High-risk neuroblastoma tumors with 11q-deletion display a poor prognostic, chromosome instability phenotype with later onset. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:4323-8, 2010
67. Look AT, Hayes FA, Nitschke R, et al: Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med* 311:231-5, 1984
68. Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, et al: Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 9:581-91, 1991
69. Hayashi Y, Kanda N, Inaba T, et al: Cytogenetic findings and prognosis in neuroblastoma with emphasis on marker chromosome 1. *Cancer* 63:126-32, 1989
70. Schleiermacher G, Janoueix-Lerosey I, Ribeiro A, et al: Accumulation of segmental alterations determines progression in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 28:3122-30, 2010
71. Schleiermacher G, Rubie H, Hartmann O, et al: Treatment of stage 4s neuroblastoma--report of 10 years' experience of the French Society of Paediatric Oncology (SFOP). *Br J Cancer* 89:470-6, 2003

72. Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, et al: Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 455:930-5, 2008
73. Cheung NK, Zhang J, Lu C, et al: Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA* 307:1062-71, 2012
74. Schleiermacher G, Michon J, Huon I, et al: Chromosomal CGH identifies patients with a higher risk of relapse in neuroblastoma without MYCN amplification. *British Journal of Cancer* 97:238-246, 2007
75. Donovan MJ, Hempstead BL, Horvath C, et al: Immunohistochemical localization of Trk receptor protein in pediatric small round blue cell tumors. *Am J Pathol* 143:1560-7, 1993
76. Dominici C, Nicotra MR, Digiesi G, et al: Immunohistochemical detection of high-affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 31A:444-6, 1995
77. Tanaka T, Hiyama E, Sugimoto T, et al: trk A gene expression in neuroblastoma. The clinical significance of an immunohistochemical study. *Cancer* 76:1086-95, 1995
78. Kramer K, Cheung NK, Gerald WL, et al: Correlation of MYCN amplification, Trk-A and CD44 expression with clinical stage in 250 patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer* 33:2098-100, 1997
79. Ladisch S, Wu ZL: Detection of a tumour-associated ganglioside in plasma of patients with neuroblastoma. *Lancet* 1:136-8, 1985

80. Schilling FH, Oberrauch W, Schanz F, et al: Evaluation of a rapid and reliable method for mass screening for neuroblastoma in infants. *Prog Clin Biol Res* 366:579-83, 1991
81. Chan HS, Haddad G, Thorner PS, et al: P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N Engl J Med* 325:1608-14, 1991
82. Norris MD, Bordow SB, Marshall GM, et al: Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 334:231-8, 1996
83. Bedrnicek J, Vicha A, Jarosova M, et al: Characterization of drug-resistant neuroblastoma cell lines by comparative genomic hybridization. *Neoplasma* 52:415-9, 2005
84. Flahaut M, Mühlethaler-Mottet A, Martinet D, et al: Molecular cytogenetic characterization of doxorubicin-resistant neuroblastoma cell lines: evidence that acquired multidrug resistance results from a unique large amplification of the 7q21 region. *Genes Chromosomes Cancer* 45:495-508, 2006
85. Meitar D, Crawford SE, Rademaker AW, et al: Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 14:405-14, 1996
86. Cañete A, Navarro S, Bermúdez J, et al: Angiogenesis in neuroblastoma: relationship to survival and other prognostic factors in a cohort of neuroblastoma patients. *J Clin Oncol* 18:27-34, 2000

87. Drozynska E, Izycka-Swieszewska E, Niedzwiecki M, et al: A correlation of microvascular density and proliferative activity to clinical and histological characteristics in neuroblastoma. *Neoplasma* 53:247-52, 2006
88. Castle VP, Heidelberger KP, Bromberg J, et al: Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2, in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification. *Am J Pathol* 143:1543-50, 1993
89. Mejia MC, Navarro S, Pellin A, et al: Study of bcl-2 protein expression and the apoptosis phenomenon in neuroblastoma. *Anticancer Res* 18:801-6, 1998
90. Keim DR, Hailat N, Kuick R, et al: PCNA levels in neuroblastoma are increased in tumors with an amplified N-myc gene and in metastatic stage tumors. *Clin Exp Metastasis* 11:83-90, 1993
91. Kawasaki H, Mukai K, Yajima S, et al: Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 24:300-4, 1995
92. Rudolph P, Lappe T, Hero B, et al: Prognostic significance of the proliferative activity in neuroblastoma. *Am J Pathol* 150:133-45, 1997
93. George RE, Kenyon RM, McGuckin AG, et al: 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* 12:1583-7, 1996

94. Reynolds CP, Zuo JJ, Kim NW, et al: Telomerase expression in primary neuroblastomas. *Eur J Cancer* 33:1929-31, 1997
95. Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, et al: Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur J Cancer* 33:1932-6, 1997
96. Tweddle DA, Malcolm AJ, Cole M, et al: p53 cellular localization and function in neuroblastoma: evidence for defective G(1) arrest despite WAF1 induction in MYCN-amplified cells. *Am J Pathol* 158:2067-77, 2001
97. Castel V, Villamón E, Cañete A, et al: Neuroblastoma in adolescents: genetic and clinical characterisation. *Clin Transl Oncol* 12:49-54, 2010
98. Bouvier JF, Philip T, Chauvot P, et al: Pitfalls and solutions in neuroblastoma diagnosis using radioiodine MIBG: our experience about 50 cases. *Prog Clin Biol Res* 271:707-20, 1988
99. Brody AS, Frush DP, Huda W, et al: Radiation risk to children from computed tomography. *Pediatrics* 120:677-82, 2007
100. Siegel MJ, Jaju A: MR imaging of neuroblastic masses. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 16:499-513, vi, 2008
101. Semelka RC, Armao DM, Elias J, et al: Imaging strategies to reduce the risk of radiation in CT studies, including selective substitution with MRI. *J Magn Reson Imaging* 25:900-9, 2007

102. Sofka CM, Semelka RC, Kelekis NL, et al: Magnetic resonance imaging of neuroblastoma using current techniques. *Magn Reson Imaging* 17:193-8, 1999
103. Brisse HJ, McCarville MB, Granata C, et al: Guidelines for imaging and staging of neuroblastic tumors: consensus report from the international neuroblastoma risk group project. *Radiology* 261:243-57, 2011
104. Mehta SV, Lim-Dunham JE: Ultrasonographic appearance of pediatric abdominal neuroblastoma with inferior vena cava extension. *J Ultrasound Med* 22:1091-5, 2003
105. Rubenstein SC, Benacerraf BR, Retik AB, et al: Fetal suprarenal masses: sonographic appearance and differential diagnosis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 5:164-7, 1995
106. Hirata T, Tataru H, Zaizen Y, et al: Role of ultrasound in managing neuroblastoma detected by mass screening: a proposed ultrasonographic grading for children with neuroblastoma. *J Clin Ultrasound* 23:305-13, 1995
107. Siegel MJ, Ishwaran H, Fletcher BD, et al: Staging of neuroblastoma at imaging: report of the radiology diagnostic oncology group. *Radiology* 223:168-75, 2002
108. DuBois SG, Kalika Y, Lukens JN, et al: Metastatic sites in stage IV and IVS neuroblastoma correlate with age, tumor biology, and survival. *J Pediatr Hematol Oncol* 21:181-9, 1999

109. Mehta K, Haller J, Legasto A: Imaging neuroblastoma in children. *Crit Rev Comput Tomogr* 44:47-61, 2003
110. Kellenberger CJ, Epelman M, Miller SF, et al: Fast STIR whole-body MR imaging in children. *Radiographics* 24:1317-30, 2004
111. Kellenberger CJ, Miller SF, Khan M, et al: Initial experience with FSE STIR whole-body MR imaging for staging lymphoma in children. *Eur Radiol* 14:1829-41, 2004
112. De Bernardi B, Gerrard M, Boni L, et al: Excellent outcome with reduced treatment for infants with disseminated neuroblastoma without MYCN gene amplification. *J Clin Oncol* 27:1034-40, 2009
113. Leung A, Shapiro B, Hattner R, et al: Specificity of radioiodinated MIBG for neural crest tumors in childhood. *J Nucl Med* 38:1352-7, 1997
114. Wieland DM, Wu J, Brown LE, et al: Radiolabeled adrenergi neuron-blocking agents: adrenomedullary imaging with [¹³¹I]iodobenzylguanidine. *J Nucl Med* 21:349-53, 1980
115. Kimmig B, Brandeis WE, Eisenhut M, et al: Scintigraphy of a neuroblastoma with I-131 meta-iodobenzylguanidine. *J Nucl Med* 25:773-5, 1984
116. Perel Y, Conway J, Kletzel M, et al: Clinical impact and prognostic value of metaiodobenzylguanidine imaging in children with metastatic neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 21:13-8, 1999

117. Puig S: Procedimientos en medicina nuclear clínica. Vigo, 2000
118. Serena: Procedimientos en medicina nuclear clínica. Vigo, 2000
119. Gelfand MJ: Meta-iodobenzylguanidine in children. *Semin Nucl Med* 23:231-42, 1993
120. Frappaz D, Giammarile F, Thiesse P, et al: False positive MIBG scan. *Med Pediatr Oncol* 29:589-92, 1997
121. Lumbroso JD, Guermazi F, Hartmann O, et al: Meta-iodobenzylguanidine (mIBG) scans in neuroblastoma: sensitivity and specificity, a review of 115 scans. *Prog Clin Biol Res* 271:689-705, 1988
122. Hoefnagel CA, De Kraker J, Valdés Olmos RA, et al: [¹³¹I]MIBG as a first line treatment in advanced neuroblastoma. *Q J Nucl Med* 39:61-4, 1995
123. Howard J, Maris J, Kersun L, et al: Tumor response and toxicity with multiple infusions of high dose ¹³¹I-MIBG for refractory neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 44:232-9, 2005
124. De Kraker J, Hoefnagel CA, Caron H, et al: First line targeted radiotherapy, a new concept in the treatment of advanced stage neuroblastoma. *Eur J Cancer* 31A:600-2, 1995
125. Yanik GA, Levine JE, Matthay KK, et al: Pilot study of iodine-¹³¹-metaiodobenzylguanidine in combination with myeloablative

chemotherapy and autologous stem-cell support for the treatment of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 20:2142-9, 2002

126. Garaventa A, Bellagamba O, Lo Piccolo MS, et al: 131I-metaiodobenzylguanidine (131I-MIBG) therapy for residual neuroblastoma: a mono-institutional experience with 43 patients. *Br J Cancer* 81:1378-84, 1999

127. Gordon I, Peters AM, Gutman A, et al: Skeletal assessment in neuroblastoma--the pitfalls of iodine-123-MIBG scans. *J Nucl Med* 31:129-34, 1990

128. Rufini V, Giordano A, Di Giuda D, et al: [123I]MIBG scintigraphy in neuroblastoma: a comparison between planar and SPECT imaging. *Q J Nucl Med* 39:25-8, 1995

129. Rufini V, Fisher GA, Shulkin BL, et al: Iodine-123-MIBG imaging of neuroblastoma: utility of SPECT and delayed imaging. *J Nucl Med* 37:1464-8, 1996

130. Gelfand MJ, Elgazzar AH, Kriss VM, et al: Iodine-123-MIBG SPECT versus planar imaging in children with neural crest tumors. *J Nucl Med* 35:1753-7, 1994

131. Taggart DR, Han MM, Quach A, et al: Comparison of iodine-123 metaiodobenzylguanidine (MIBG) scan and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography to evaluate response after iodine-131 MIBG therapy for relapsed neuroblastoma. *J Clin Oncol* 27:5343-9, 2009

132. Fukuoka M, Taki J, Mochizuki T, et al: Comparison of diagnostic value of I-123 MIBG and high-dose I-131 MIBG scintigraphy

including incremental value of SPECT/CT over planar image in patients with malignant pheochromocytoma/paraganglioma and neuroblastoma. Clin Nucl Med 36:1-7, 2011

133. Fukuoka M, Taki J, Mochizuki T, et al: Comparison of diagnostic value of I-123 MIBG and high-dose I-131 MIBG scintigraphy including incremental value of SPECT/CT over planar image in patients with malignant pheochromocytoma/paraganglioma and neuroblastoma. Clin Nucl Med 36:1-7, 2011

134. Parisi MT, Sandler ED, Hattner RS: The biodistribution of metaiodobenzylguanidine. Semin Nucl Med 22:46-8, 1992

135. Freitas JE: Adrenal cortical and medullary imaging. Semin Nucl Med 25:235-30, 1995

136. Apeldoorn L, Voerman HJ, Hoefnagel CA: Interference of MIBG uptake by medication: a case report. Neth J Med 46:239-43, 1995

137. Solanki KK, Bomanji J, Moyes J, et al: A pharmacological guide to medicines which interfere with the biodistribution of radiolabelled metaiodobenzylguanidine (MIBG). Nucl Med Commun 13:513-21, 1992

138. Parisi MT, Greene MK, Dykes TM, et al: Efficacy of metaiodobenzylguanidine as a scintigraphic agent for the detection of neuroblastoma. Invest Radiol 27:768-73, 1992

139. Frappaz D, Combaret V, Desuzinges C, et al: Can MIBG scan replace the need for bone marrow assessment at diagnosis and reassessment in stage 4 neuroblastomas? Bull Cancer 91:E253-60, 2004

140. Kushner B, Yeh S, Kramer K, et al: Impact of metaiodobenzylguanidine scintigraphy on assessing response of high-risk neuroblastoma to dose-intensive induction chemotherapy. *J Clin Oncol* 21:1082-6, 2003

141. Reynolds C: Detection and treatment of minimal residual disease in high-risk neuroblastoma. *Pediatr Transplant* 8 Suppl 5:56-66, 2004

142. Beiske K, Ambros P, Burchill S, et al: Detecting minimal residual disease in neuroblastoma patients-the present state of the art. *Cancer Lett* 228:229-40, 2005

143. Cheung I, Lo Piccolo M, Kushner B, et al: Quantitation of GD2 synthase mRNA by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction: clinical utility in evaluating adjuvant therapy in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 21:1087-93, 2003

144. Swerts K, De Moerloose B, Dhooge C, et al: Detection of residual neuroblastoma cells in bone marrow: comparison of flow cytometry with immunocytochemistry. *Cytometry B Clin Cytom* 61:9-19, 2004

145. Oltra S, Martínez F, Orellana C, et al: Minimal residual disease in neuroblastoma: to GAGE or not to GAGE. *Oncol Res* 14:291-5, 2004

146. Stutterheim J, Gerritsen A, Zappeij-Kannegieter L, et al: Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: the superiority of a panel of real-time quantitative PCR markers. *Clin Chem* 55:1316-26, 2009

147. Viprey V, Corrias M, Kagedal B, et al: 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 43:341-50, 2007

148. Yáñez Y, Grau E, Oltra S, et al: Minimal disease detection in peripheral blood and bone marrow from patients with non-metastatic neuroblastoma. J Cancer Res Clin Oncol 137:1263-72, 2011

149. Wagner L, Burger R, Guichard S, et al: Pilot study to evaluate MYCN expression as a neuroblastoma cell marker to detect minimal residual disease by RT-PCR. J Pediatr Hematol Oncol 28:635-41, 2006

150. Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, et al: Cyclin D1 is a direct transcriptional target of GATA3 in neuroblastoma tumor cells. Oncogene 29:2739-45, 2010

151. Cheung IY, Feng Y, Gerald W, et al: Exploiting gene expression profiling to identify novel minimal residual disease markers of neuroblastoma. Clin Cancer Res 14:7020-7, 2008

152. Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D, et al: Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. Am J Hum Genet 75:727-30, 2004

153. Stutterheim J, Gerritsen A, Zappeij-Kannegieter L, et al: PHOX2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma. J Clin Oncol 26:5443-9, 2008

154. Ladenstein R, Hartmann O, Pinkerton CR: The role of megatherapy with autologous bone marrow rescue in solid tumours of childhood. Ann Oncol 4 Suppl 1:45-58, 1993

155. Suc A, Lumbroso J, Rubie H, et al: Metastatic neuroblastoma in children older than one year: prognostic significance of the initial metaiodobenzylguanidine scan and proposal for a scoring system. *Cancer* 77:805-11, 1996

156. Frappaz D, Bonneu A, Chauvot P, et al: Metaiodobenzylguanidine assessment of metastatic neuroblastoma: observer dependency and chemosensitivity evaluation. The SFOP Group. *Med Pediatr Oncol* 34:237-41, 2000

157. Messina JA, Cheng SC, Franc BL, et al: Evaluation of semi-quantitative scoring system for metaiodobenzylguanidine (mIBG) scans in patients with relapsed neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 47:865-74, 2006

158. Matthay KK, Edeline V, Lumbroso J, et al: Correlation of early metastatic response by 123I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy with overall response and event-free survival in stage IV neuroblastoma. *J Clin Oncol* 21:2486-91, 2003

159. Castel V, Badal MD, Bezanilla JL, et al: 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* 24:29-35, 1995

160. Castel V, Cañete A, Navarro S, et al: Outcome of high-risk neuroblastoma using a dose intensity approach: improvement in initial but not in long-term results. *Med Pediatr Oncol* 37:537-42, 2001

161. Castel V, Cañete A, Melero C, et al: Results of the cooperative protocol (N-III-95) for metastatic relapses and refractory neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 35:724-6, 2000
162. Ladenstein R, Valteau-Couanet D, Brock P, et al: Randomized Trial of prophylactic granulocyte colony-stimulating factor during rapid COJEC induction in pediatric patients with high-risk neuroblastoma: the European HR-NBL1/SIOPEN study. *J Clin Oncol* 28:3516-24, 2010
163. . WG: Adrenal Medullary Scan, in MK OC (ed): *The Mayo Clinic Manual of Nuclear Medicine*. New York, 1996, pp 251-256
164. Piepsz A, Hahn K, Roca I, et al: A radiopharmaceuticals schedule for imaging in paediatrics. Paediatric Task Group European Association Nuclear Medicine. *Eur J Nucl Med* 17:127-9, 1990
165. Stabin MG, Gelfand MJ: Dosimetry of pediatric nuclear medicine procedures. *Q J Nucl Med* 42:93-112, 1998
166. Olivier P, Colarinha P, Fettich J, et al: Guidelines for radioiodinated MIBG scintigraphy in children. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30:B45-50, 2003
167. Shimada H, Chatten J, Newton WA, et al: Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 73:405-16, 1984
168. Sambrook J, Sharp PA, Keller W: Transcription of Simian virus 40. I. Separation of the strands of SV40 DNA and hybridization of the

separated strands to RNA extracted from lytically infected and transformed cells. *J Mol Biol* 70:57-71, 1972

169. Böcking A, Giroud F, Reith A: Consensus report of the European Society for Analytical Cellular Pathology task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 17:1-7, 1995

170. Haase GM, Atkinson JB, Stram DO, et al: Surgical management and outcome of locoregional neuroblastoma: comparison of the Childrens Cancer Group and the international staging systems. *J Pediatr Surg* 30:289-94; discussion 295, 1995

171. Ladenstein R, Lasset C, Hartmann O, et al: High-dose consolidation chemotherapy in infants with stage 4 neuroblastoma. The European Group for Bone Marrow Transplantation. *Eur J Cancer* 29A:1632, 1993

172. Baker DL, Schmidt ML, Cohn SL, et al: Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma. *N Engl J Med* 363:1313-23, 2010

173. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, et al: 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* 341:1165-73, 1999

174. Ladenstein R, Philip T, Lasset C, et al: 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* 16:953-65, 1998

175. Lumbroso J, Guermazi F, Hartmann O, et al: [Sensitivity and specificity of meta-iodobenzylguanidine (mIBG) scintigraphy in the evaluation of neuroblastoma: analysis of 115 cases]. *Bull Cancer* 75:97-106, 1988

176. Matthay KK, Shulkin B, Ladenstein R, et al: Criteria for evaluation of disease extent by (123)I-metaiodobenzylguanidine scans in neuroblastoma: a report for the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Task Force. *Br J Cancer* 102:1319-26, 2010

177. Ady N, Zucker JM, Asselain B, et al: A new 123I-MIBG whole body scan scoring method--application to the prediction of the response of metastases to induction chemotherapy in stage IV neuroblastoma. *Eur J Cancer* 31A:256-61, 1995

178. Matthay K, Edeline V, Lumbroso J, et al: Correlation of early metastatic response by 123I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy with overall response and event-free survival in stage IV neuroblastoma. *J Clin Oncol* 21:2486-91, 2003

179. Katzenstein HM, Cohn SL, Shore RM, et al: Scintigraphic response by 123I-metaiodobenzylguanidine scan correlates with event-free survival in high-risk neuroblastoma. *J Clin Oncol* 22:3909-15, 2004

180. Caron H: Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 24:215-21, 1995
181. Shimada H, Stram DO, Chatten J, et al: Identification of subsets of neuroblastomas by combined histopathologic and N-myc analysis. *J Natl Cancer Inst* 87:1470-6, 1995
182. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al: Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. *Prog Clin Biol Res* 385:363-9, 1994
183. Labreuve de Cervens C, Hartmann O, Bonnin F, et al: What is the prognostic value of osteomedullary uptake on MIBG scan in neuroblastoma patients under one year of age? *Med Pediatr Oncol* 22:107-14, 1994
184. Goldberg SS, DeSantes K, Huberty JP, et al: Engraftment after myeloablative doses of 131I-metaiodobenzylguanidine followed by autologous bone marrow transplantation for treatment of refractory neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 30:339-46, 1998
185. Reynolds CP, Kane DJ, Einhorn PA, et al: Response of neuroblastoma to retinoic acid in vitro and in vivo. *Prog Clin Biol Res* 366:203-11, 1991
186. Reynolds C, Matthay K, Villablanca J, et al: Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett* 197:185-92, 2003

187. Beppu K, Jaboine J, Merchant M, et al: Effect of imatinib mesylate on neuroblastoma tumorigenesis and vascular endothelial growth factor expression. *J Natl Cancer Inst* 96:46-55, 2004
188. Williams RF, Myers AL, Sims TL, et al: Targeting multiple angiogenic pathways for the treatment of neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 45:1103-9, 2010
189. Cheung I, Lo Piccolo M, Kushner B, et al: Early molecular response of marrow disease to biologic therapy is highly prognostic in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 21:3853-8, 2003
190. Modak S, Kushner B, Kramer K, et al: Phase I study of the combination of anti-GD2 antibody 3F8 and barley-derived beta glucan for resistant neuroblastoma. *Pediatric Blood & Cancer* 49:476-476, 2007