



Instituto de
Investigación
Sanitaria La Fe



[Icon] Facultat de Medicina i Odontologia

VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Medicina.
Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología. Facultad de Medicina y Odontología.

TESIS DOCTORAL
BÚSQUEDA DE NUEVOS BIOMARCADORES
CON UTILIDAD PRONÓSTICA EN EL NEUROBLASTOMA

Yania Yáñez Peralta · Licenciada en Biología

Directoras: **Dra. María Adela Cañete Nieto**

Dra. Victoria Castel Sánchez

Valencia, 4 de julio 2016

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.

Dña. Victoria Castel Sánchez, Doctora en Medicina por la Universidad de Valencia

CERTIFICAMOS:

Que Dña. Yania Yáñez Peralta, Licenciada en Biología por la Universidad de la Habana ha realizado íntegramente y bajo nuestra supervisión el trabajo que lleva por título:

“Búsqueda de nuevos biomarcadores con utilidad pronóstica en el neuroblastoma”

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

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación en Valencia a 04 de julio del 2016



Fdo. Prof^a. Adela Cañete Nieto



Fdo. Victoria Castel Sánchez

A los niños y niñas afectados de neuroblastoma,
a sus familias.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin la ayuda directa o indirecta de un gran número de personas a las que quiero agradecer.

A Victoria y Adela, gracias por su confianza en mi trabajo, por todo lo que me han enseñado a lo largo de estos años y por darme la oportunidad de formar parte de su equipo.

A Desi y Vanessa, qué puedo escribir que no haya dicho ya, GRACIAS! por soportarme día tras día, ya sé que no es tarea fácil, por ayudarme tanto en mi trabajo diario.

A Elena i Silves, els meus antecessors en l'estudi de la malaltia mínima residual en neuroblastoma, vull agrair-los la seua ajuda per ser tan bons mestres. Elena ha estat responsable directa d'aquest treball, em va animar a seguir el camí que havia començat amb els estudis epigenètics en neuroblastoma i juntes aconseguirem bons resultats.

A Miguel Hernández, el meu patòleg favorit, amb el respecte que es mereixen la resta de patòlegs amb els qui he treballat i treballo. Vull agrair la seua amabilitat i disponibilitat. I també la seua cura en la selecció de les mostres que han servit per a aquest estudi.

A David Hervás y Ana Conesa por el análisis estadístico y bioinformático de los datos, por su compromiso con este trabajo.

A Esteban Ballestar y Virginia Rodríguez del IDIBELL, por la validación de los resultados de los estudios epigenéticos y por ayudar a sacar adelante este proyecto.

A Juan Sandoval, quiero agradecer su paciencia e interés en mi trabajo, por las correcciones y sugerencias en la redacción de la tesis.

A Jaime Font de Mora, por sus enseñanzas y correcciones, por su contagioso entusiasmo.

A Helena Olcina per la seua paciència, la seua estima i per la maquetació d'aquesta tesi.

A los médicos, enfermeras y auxiliares de la sala, hospital de día y consulta de oncología pediátrica de la Fe por facilitarme el trabajo y por su ayuda en la colección de muestras para los estudios. Me considero muy afortunada de poder contar con este maravilloso equipo.

A los médicos y personal sanitario de los hospitales colaboradores en los estudios de neuroblastoma, estos trabajos no hubieran sido posibles sin su ayuda y compromiso.

Al grupo de monitorización molecular de SIOPEN, por toda la experiencia que he adquirido y que sigo adquiriendo gracias a ellos.

A Pascual Bolufer, Gemma Pérez, Rosa Murria, Inma de Juan, Sarai Palanca y el resto de miembros del laboratorio de biología molecular de la Fe, por su implicación en los estudios de la enfermedad mínima residual en neuroblastoma.

A Rosa Noguera, Marta Piqueras, Irene Tadeo, Ana Berbegall y Samuel Navarro por su ayuda en la obtención de las muestras más adecuadas para la validación de los resultados de este trabajo.

A mis amigos, que son muchos, qué suerte!, por quererme, ayudarme y apoyarme siempre.

Y por último a mi familia querida, a mis padres, mis hermanos, sobrinos, cuñadas y cuñados, a mis tíos y tía, abuelas y abuelo, a mis suegros, gracias por tanto cariño incondicional y por hacerme tan feliz! Al meu Colonques, pel seu amor, pel camí recorregut i el que ens queda, pels nostres fills Dídac i Aina, els meus solets!

RESUMEN

BÚSQUEDA DE NUEVOS BIOMARCADORES CON UTILIDAD PRONÓSTICA EN EL NEUROBLASTOMA

YANIA YÁÑEZ PERALTA

Programa de Doctorado en Medicina,

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología,

Facultad de Medicina y Odontología,

Universidad de Valencia.

El neuroblastoma (NB) es un tumor neuroectodérmico de las células embrionarias derivadas de la cresta neural. Constituye el tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia y es altamente heterogéneo en su comportamiento clínico y biológico. Los pacientes considerados de alto riesgo presentan tasas de supervivencia a los 5 años que no superan el 40% en la mayoría de las series estudiadas pese a recibir un tratamiento multimodal de gran intensidad. El resto de pacientes no incluidos en esta categoría son un grupo muy diverso en cuanto a presentación clínica, edad y características moleculares, expuestos a ser sobretreatados o infratreatados si la asignación de riesgo no está bien definida. La individualización de la terapéutica en función del riesgo es un concepto oncológico de gran importancia en pediatría, dada la vulnerabilidad de los pacientes a la toxicidad del tratamiento. Para que se aplique de manera correcta es necesaria una evaluación adecuada de la extensión de la enfermedad y la

biología del tumor. En la patogénesis del NB están implicadas alteraciones genéticas, citogenéticas y cambios epigenéticos. Las alteraciones genéticas descritas hasta el momento no explican el comportamiento tan disímil de este tumor en los diferentes subgrupos. La identificación de biomarcadores genéticos con utilidad pronóstica y de alteraciones epigenéticas implicadas en la patogénesis del NB, sería de vital importancia para optimizar la clasificación en grupos de riesgo, evaluar adecuadamente la respuesta al tratamiento y definir nuevos enfoques terapéuticos que permitan mejorar las expectativas de curación de los pacientes.

Objetivo principal

El objetivo del presente trabajo es identificar biomarcadores genéticos y epigenéticos del comportamiento clínico y biológico del NB.

Objetivos específicos

1 Comprobar el valor pronóstico de la detección de enfermedad mínima en pacientes con NB localizado. El estudio está enfocado en: 1) Determinar el efecto de la detección de la expresión génica de *TH* (*tirosina hidroxilasa*) y *DCX* (*doblecortina*) en sangre periférica y médula ósea al diagnóstico en la supervivencia de los pacientes con NB no metastásico. Estudiar si la detección de la expresión génica de *TH* y *DCX* en sangre periférica y médula ósea al diagnóstico puede ayudar a identificar pacientes con NB no metastásico que requieren un manejo terapéutico especial.

2 Evaluar la utilidad clínica de la detección de enfermedad mínima residual (EMR) en pacientes con enfermedad metastásica, poniendo énfasis en:

1) Definir el valor pronóstico independiente de la detección de EMR mediante RT-qPCR en sangre periférica y médula ósea al diagnóstico y en distintos momentos a lo largo del proceso terapéutico. 2) Aclarar la utilidad clínica de la detección de la expresión génica de *TH* y *DCX* para monitorizar la enfermedad y evaluar la respuesta al tratamiento.

3 Identificar biomarcadores epigenéticos en NB mediante *arrays* de metilación centrándonos en: 1) Determinar la existencia de genes hipermetilados específicos de los diferentes subgrupos clínicos de NB, y establecer su valor pronóstico como biomarcadores de progresión de la enfermedad. 2) Estudiar la relación de los eventos epigenéticos encontrados con otras variables biológicas y clínicas con valor pronóstico conocido. 3) Determinar el valor pronóstico independiente de los perfiles epigenéticos encontradas.

Metodología:

El presente trabajo de tesis es un compendio de tres artículos científicos que persiguen identificar biomarcadores con utilidad pronóstica en pacientes afectados de NB. Los artículos que constituyen el compendio se detallan a continuación y la candidata a optar por el título de Doctor es primera autora en todos ellos:

Minimal disease detection in peripheral blood and bone marrow from non-metastatic Neuroblastoma patients. Yania Yáñez, Elena Grau, Silvestre Oltra, Adela Cañete, Francisco Martínez, Carmen Orellana, Rosa Noguera, Sarai Palanca, Victoria Castel. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011, 137(8):1263-72.

***TH* and *DCX* mRNAs in peripheral blood and bone marrow predict outcome in metastatic neuroblastoma patients.** Yania Yáñez, David Hervás, Elena Grau, Silves-

tre Oltra, Gema Pérez, Sarai Palanca, Mar Bermúdez, Catalina Márquez, Adela Cañete and Victoria Castel. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016, 142(3):573-80.

Two independent epigenetic biomarkers predict survival in neuroblastoma.

Yania Yáñez, Elena Grau, Virginia Rodríguez, David Hervás, Rosa Noguera, Miguel Hernández, Vanessa Segura, Adela Cañete, Ana Conesa, Jaime Font de Mora and Victoria Castel. *Clin Epigenetics* 2015, 7(1):16.

Como se explica a continuación, los artículos reúnen tres desafíos en la investigación del NB:

1 Evaluar el valor pronóstico de la detección de enfermedad mínima en pacientes con tumores localizados. Entre los neuroblastomas no metastásicos existen subgrupos clínica y biológicamente diferentes y la identificación de pacientes que requieren un tratamiento más intensivo es aún un desafío. Pese a que las tasas de supervivencia de los pacientes con tumores localizados y sin amplificación de *MYCN* suelen ser altas, algunos presentan recaídas metastásicas y fallecen a causa de la enfermedad. La detección de la expresión de *TH* y *DCX* en sangre periférica y médula ósea de pacientes con NB no metastásico al diagnóstico, podría asociarse con el pronóstico de dichos pacientes y ayudaría a identificar aquellos que requieren un seguimiento más exhaustivo y una actitud terapéutica más agresiva.

2 Aclarar la utilidad clínica de la detección de EMR en neuroblastomas metastásicos al diagnóstico y durante el proceso terapéutico. Los neuroblastomas metastásicos y fundamentalmente aquellos de alto riesgo, presentan bajas tasas de supervivencia pese a recibir un tratamiento multimodal intensivo. De-

terminar el valor pronóstico independiente de la detección de células tumorales en sangre periférica y médula ósea al diagnóstico, mediante técnicas moleculares altamente sensibles, ayudaría a identificar pacientes con pronóstico desfavorable que necesitan un tratamiento más agresivo. La monitorización de la EMR a lo largo del curso de la enfermedad, permitiría optimizar la evaluación de la respuesta al tratamiento y detectar precozmente las recaídas.

3 Identificar biomarcadores epigenéticos con valor pronóstico en el NB. El pronóstico de los pacientes con NB ha mejorado notablemente en los últimos años, las expectativas de curación globales de la enfermedad están alrededor del 65%, pero en algunos subgrupos son mucho menores. Pese a que existen anormalidades genéticas muy bien caracterizadas que se asocian al NB, éstas no explican la heterogeneidad clínica observada en los pacientes. El estudio de las alteraciones epigenéticas es un enfoque alternativo a los estudios genéticos convencionales que ha ganado relevancia en los últimos años. Sin embargo, la mayoría de los estudios epigenéticos en este tumor sólido pediátrico, se han focalizado en el análisis directo de genes candidatos, limitando el estudio de muchas regiones implicadas en la tumorigénesis del NB. El análisis de la metilación aberrante en todo el genoma, puede ser una buena herramienta para identificar biomarcadores epigenéticos del comportamiento clínico y biológico de la enfermedad, que ayuden a mejorar la estratificación de los pacientes en función del riesgo de recaídas así como el manejo del tratamiento.

Conclusiones

Los estudios presentados son de relevancia para generar nuevas estrategias de estra-

tificación de los pacientes en grupos de riesgo y definir nuevos enfoques terapéuticos que mejoren la supervivencia de los pacientes.

ÍNDICE

1.	Abreviaturas	5
2.	Introducción	9
2.1	Neuroblastoma	9
2.2	Síntomas, diagnóstico y presentación clínica	10
2.3	Histopatología	12
2.4	Alteraciones genéticas en el neuroblastoma	13
2.4.1	Aneuploidía	13
2.4.2	Amplificación del oncogén <i>MYCN</i>	14
2.4.3	Pérdida del cromosoma 11	15
2.4.4	Otras alteraciones cromosómicas típicas en neuroblastoma	15
2.4.5	Mutaciones en el neuroblastoma	16
2.5	Factores predictores del pronóstico en neuroblastoma y estratificación en grupos de riesgo	16
2.5.1	Edad al diagnóstico	17
2.5.2	Estadio clínico	17
2.6	Tratamiento	19
2.7	Detección de micrometástasis o enfermedad mínima residual	21
2.8	Mecanismos epigenéticos	25
2.8.1	Metilación del ADN	25

2.8.2	Metilación del ADN en cáncer	27
2.8.3	Modificaciones covalentes de las histonas	28
2.8.4	ARNs no codificantes	29
2.8.5	Remodelación de la cromatina y los nucleosomas	29
2.8.6	Tratamiento epigenético antineoplásico	30
2.8.7	Modificaciones epigenéticas en tumores neuroblásticos	31
3.	Hipótesis y Objetivos	35
3.1	Hipótesis	35
3.2	Objetivo principal	35
3.3	Objetivos específicos	35
4.	Justificación de la tesis como compendio de publicaciones y alcance de los resultados	37
5.	Compendio de publicaciones	41
5.1	Artículo I. Minimal disease detection in peripheral blood and bone marrow from non-metastatic Neuroblastoma patients	42
5.2	Artículo II. <i>TH</i> and <i>DCX</i> mRNAs in peripheral blood and bone marrow predict outcome in metastatic Neuroblastoma patients	53
5.3	Artículo III. Two independent epigenetic biomarkers predict survival in Neuroblastoma	62

6.	Resultados y discusión	77
6.1	Detección de la expresión de <i>TH</i> y <i>DCX</i> en sangre periférica y médula ósea de NBs no metastásicos	77
6.2	Detección de la expresión de <i>TH</i> y <i>DCX</i> en sangre periférica y médula ósea de NBs metastásicos	81
6.3	Identificación de biomarcadores epigenéticos en NB mediante <i>arrays</i> de metilación	89
6.3.1	Validación del valor pronóstico de los perfiles epigenéticos encontrados mediante pirosecuenciación	93
6.3.2	Análisis de la expresión de <i>RBI</i> y <i>TDGF1</i> en NB	93
7.	Conclusiones	103
8.	Referencias	107
9.	Anexos	129
9.1	Otras publicaciones de la autora	129
9.2	Financiación	131

1. ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALK: anaplastic lymphoma kinase

Anti-GD2: anticuerpo anti-Disialogangliosido

ARID1A: AT rich interactive domain 1A

ARID1B: AT rich interactive domain 1B

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATRX: alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked

CASP8: caspase 8

CCND1: cyclin D1

CCND2: cyclin 2

CCND2: cyclin D2

CpG: citosina que precede a una guanina

CTSZ: cathepsin Z

DCX: doublecortin

DUSP2: dual specificity phosphatase 2

ECRG4: esophageal cancer-related gene 4

FOLH1: folate hydrolase (prostate-specific membrane antigen) 1

HOXA9: homeobox A9

HPN: hepsin

INRG: International Neuroblastoma Risk Group

INSS: International Neuroblastoma Staging System

JAK2: janus kinase 2

LDH: lactato deshidrogenasa

LRRC4: leucine-rich repeat C4 protein

MAGEA2: melanoma antigen 2

MGMT: O-6-methylguanine-DNA methyltransferase

miARN: Ácido ribonucleico monocatenario de entre 21 y 25 nucleótidos (micro)

MIGB: Metaiodobencilguanidina

MLH1: MutL Homolog 1

MYCN: v-myc myelocytomatosis viral related oncogene neuroblastoma derived

NNAT: neuronatin

NRAS: neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) oncogene homolog

PAX8: paired box 8

PHOX2B: paired-Like Homeobox 2b

PTPN11: protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11

RAR beta 2: retinoic acid receptor beta 2

RASSF1A: ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1

RB1: retinoblastoma 1

RM: Resonancia Magnética

RT-qPCR: Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction

RUNX3: runt-related transcription factor 3

SIOPEN: International Society of Paediatric Oncology Europe Neuroblastoma

TAC: Tomografía Axial Computarizada

Tc-99: Tecnecio 99

TDGF1: teratocarcinoma-derived growth factor 1

TH: tyrosine hydroxylase

THBS-1: thrombospondin 1

TIAM1: T-cell lymphoma invasion and metastasis 1

TMS1: PYD and CARD domain containing

TP73: tumor protein P73

TSPAN32: tetraspanin 32

VHL: Von Hippel-Lindau tumor suppressor

2. INTRODUCCIÓN

2.1 NEUROBLASTOMA

El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido más frecuente en la infancia después de los tumores del sistema nervioso central. Representa el 8% del total de tumores pediátricos, elevándose al 40% durante el primer año de vida. La prevalencia en España es de 1 caso por cada 100.000 nacimientos y se diagnostica con mayor frecuencia en niños de corta edad (Peris-Bonet, 2008). La mayoría de los neuroblastomas (NBs) ocurren de manera esporádica, sólo un 2% se presenta en forma de asociación familiar. Es un tumor neuroectodérmico de las células embrionarias derivadas de la cresta neural (Brodeur *et al.* 2003). Durante el desarrollo embrionario la cresta neural da lugar, entre otras, a las células nerviosas del sistema nervioso simpático formado por la médula adrenal, las cadenas laterales simpáticas y los ganglios simpáticos, que se encuen-

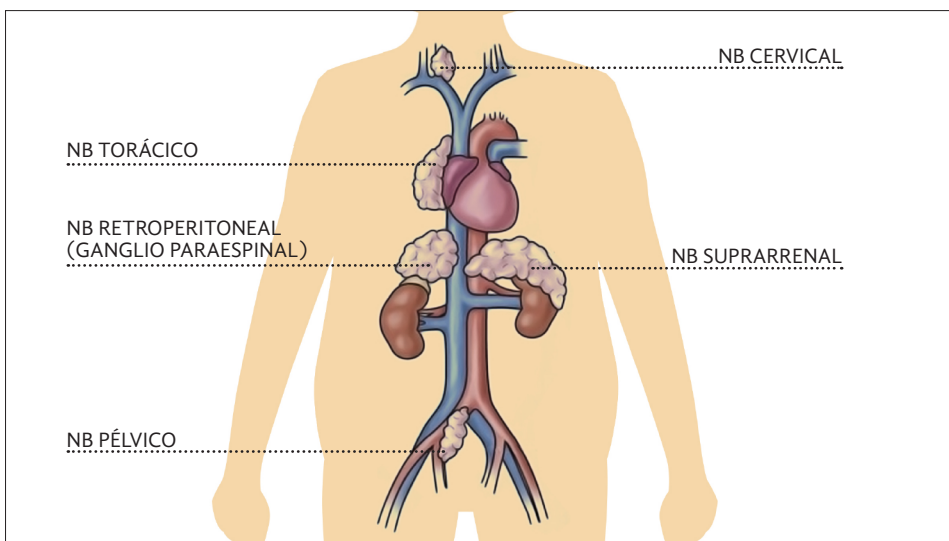


FIGURA 1. Localizaciones anatómicas del neuroblastoma.

tran a lo largo de la zona ventral de la médula espinal (Van Noesel *et al.* 2004). Por ello, el tumor primario se localiza fundamentalmente en el abdomen, especialmente en la médula adrenal. Otros sitios comunes son el cuello, el tórax y la pelvis (Brodeur *et al.* 2006) (Figura 1).

2.2 SÍNTOMAS, DIAGNÓSTICO Y PRESENTACIÓN CLÍNICA

Los síntomas más comunes del NB son dolor, fiebre y pérdida de peso dependiendo de la masa tumoral y de la extensión de las metástasis. Algunos NBs son asintomáticos y se detectan de forma accidental (Schwab *et al.* 2003). No obstante, existen algunos rasgos que aunque raros, son altamente indicativos de NB. Entre ellos están: la diarrea severa refractaria del tratamiento estándar debido a la producción del Péptido Intestinal Vasoactivo por las células tumorales; la paraplejía de los miembros debida a la extensión epidural intraespinal del tumor paraespinal primario; la encefalopatía cerebelar aguda caracterizada por ataxia cerebelar, movimientos de ojo rápidos y aleatorios (*opsoclonus*) y espasmos mioclónicos; hipertensión, sofocos y excesiva sudoración, causado en ocasiones por un incremento en la concentración de catecolaminas y el síndrome de Claudio Bernard Horner, a menudo presente en pacientes con lesiones en los ganglios simpáticos cervicales o torácicos superiores.

El diagnóstico del NB se basa en la existencia de rasgos histopatológicos característicos del tejido tumoral, o la presencia de células tumorales en aspirados y biopsias de médula ósea, acompañado de elevadas concentraciones de catecolaminas urinarias (Brodeur *et al.* 1988 y Maris *et al.* 2007). Frecuentemente los pacientes presentan elevadas concentraciones de lactato deshidrogenasa (LDH) sérica, ferritina o cromogranina, pero estos metabolitos no son específicos. La ecografía es una técnica muy

sensible para el estudio de los tumores abdominales, incluyendo la detección de metástasis linfáticas y hepáticas. Para estimar el volumen tumoral con más precisión debe realizarse un TAC o RM, esta última técnica es más efectiva para evaluar la invasión del canal medular e irradia menos al paciente. La gammagrafía con MIBG es una técnica comúnmente usada en el estudio de los pacientes con NB. Al diagnóstico, hay una captación positiva para el tumor y las metástasis en más del 80% de los casos (Hoefnagel CA 1999). La MIBG es un análogo estructural de la guanidina que sigue las mismas rutas metabólicas que las catecolaminas y es captada específicamente por el tumor y sus metástasis. En los casos en que no existe captación en el tumor primitivo, debe realizarse una gammagrafía con Tc-99 para descartar la presencia de metástasis óseas.

Los pacientes que debutan con enfermedad localizada pueden presentar una masa intra-adrenal o incluso tumores invasivos de gran tamaño localizados a lo largo de la cadena simpática. Entre un 5 y un 15% de los casos presentan tumores en regiones torácicas, abdominales o pélvicas, que pueden extenderse por el foramen neural generando síntomas relacionados con la compresión de las raíces nerviosas y la médula espinal (De Bernardi *et al.* 2005). El síndrome paraneoplásico más frecuentemente asociado al NB es el opsocerebelomioclónico y se suele dar en pacientes con NB localizado. Se caracteriza por una irritabilidad continua, junto con movimientos incontrolados en todas direcciones de los ojos (opsoclonus) y en ocasiones también ataxia cerebelosa y/o mioclonias. Alrededor del 70% de estos pacientes desarrollan déficits neurológicos a largo plazo pese a que el pronóstico con respecto a su enfermedad es bueno (Cooper *et al.* 2001).

Aproximadamente el 50% de los pacientes con NB presentan metástasis al diagnóstico, las cuales se producen por vía hematológica y linfática. Las metástasis más

frecuentes se encuentran en la médula ósea, hueso, hígado y piel, siendo más raras las cerebrales y pulmonares. Las metástasis subcutáneas se manifiestan como nódulos subcutáneos múltiples duros, no dolorosos y a veces de coloración azulada. Este tumor tiene tendencia a diseminarse hacia las cuencas orbitales, los signos clásicos de diseminación son la equimosis periorbital (“ojos de mapache”) y la proptosis. La diseminación a hueso y médula ósea pueden dar lugar a dolores óseos, flojedad e irritabilidad. La diseminación en el sistema nervioso central, pese a que no se observa con frecuencia al diagnóstico, se da en la recaída o la progresión de la enfermedad.

2.3 HISTOPATOLOGÍA

Los tumores neuroblásticos están compuestos por células neuroblásticas de estirpe neural y células estromales de tipo Schwann, de estirpe glial. Según la proporción en que se encuentran estos dos tipos celulares y del grado de diferenciación de los neuroblastos se pueden definir grupos con características histológicas específicas.

Los NB son los más indiferenciados dentro del grupo de tumores neuroblásticos al estar formados en su mayoría por neuroblastos y menos de un 50% de células Schwann. En función del grado de diferenciación de las células neuroblásticas se pueden encontrar: **NB indiferenciados**, formados por células neuroblásticas indiferenciadas, citoplasma escaso y núcleos redondos que pueden presentar varios nucléolos; **NB pobremente diferenciados**, formados por hasta un 5% de neuroblastos con algún indicio de diferenciación y presencia de neuropilo o formación de rosetas y los **NB en diferenciación**, formados por más de un 5% de neuroblastos con signos de diferenciación (citoplasma grande y nucléolo prominente) y neuropilo abundante.

Los ganglioneuroblastomas (GNB) presentan un nivel intermedio de diferencia-

ción. Están compuestos por células ganglionares, más del 50% de células de Schwann y células neuroblásticas en distintos grados de diferenciación.

Los ganglioneuromas (GN) son los tumores neuroblásticos con mayor grado de diferenciación. En esta categoría hay dos subtipos, ambos ricos en estroma schwanniano y con células ganglionares maduras. En la forma ‘en maduración’ todavía quedan neuroblastos en diferenciación o células ganglionares madurando pero no llegan a formar nidos. Por el contrario en la forma ‘madura’ el proceso madurativo es completo y hay incluso fascículos de neuritas y células satélites perineuronales.

La clasificación histopatológica actual ‘*The International Neuroblastoma Pathology Classification*’ (INPC) distingue entre tumores con pronóstico favorable o desfavorable teniendo en cuenta factores como la edad al diagnóstico, el índice de mitosis-cariorrexis (MKI), el contenido de células estromales de tipo Schwann y el grado de diferenciación neuroblástica (Shimada *et al.* 1999 y Shimada *et al.* 1999b).

2.4 ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL NEUROBLASTOMA

Las células tumorales del NB adquieren una compleja variedad de alteraciones genéticas. En la actualidad las aberraciones genéticas mejor caracterizadas en el NB son las alteraciones de la ploidía, la amplificación del oncogén *MYCN*, las deleciones o ganancias de regiones cromosómicas recurrentes y las translocaciones desequilibradas. (Ambros *et al.* 1996; Brodeur *et al.* 1984; Bown *et al.* 1999, 2000; Maris *et al.* 2007).

2.4.1 Aneuploidía

Las alteraciones en el contenido de ADN o en el número de cromosomas (aneuploidía) es un hallazgo frecuente en los NBs. Los pacientes con pronóstico favorable pre-

sentan un cariotipo hiperploide (cuasi-triploide) con un número de cromosomas en el rango de la triploidía (de 58 a 80 cromosomas) y pocas alteraciones estructurales. Por otra parte, los NBs metastásicos tienen un cariotipo cuasi-diploide (de 44 a 57 cromosomas) o cuasi-tetraploides (81 a 103 cromosomas) y cambios cromosómicos estructurales evidentes (Kaneko y Cohn 2000; Maris *et al.* 2007). La ploidía ha sido incluida como factor pronóstico en el sistema de clasificación del Grupo Internacional de Riesgo en Neuroblastoma (*INRG*) (Ambros *et al.* 2009; Maris, 2010).

2.4.2 Amplificación del oncogén *MYCN*

El oncogén *MYCN* (*v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived*, siglas en inglés), se localiza en el cromosoma 2p24. La amplificación de *MYCN* está presente en un 25% de los NBs y se asocia de manera significativa con un mal pronóstico y un comportamiento agresivo de la enfermedad (Brodeur *et al.* 1984; Alaminos *et al.* 2005). Los tumores con amplificación de *MYCN* suelen presentar aberraciones estructurales adicionales como la pérdida de 1p, la ganancia de 17q y la diploidía o tetraploidía (Caron *et al.* 1996). *MYCN* codifica para un factor de transcripción que regula genes implicados en el control del ciclo celular, la apoptosis y la angiogénesis (Bell *et al.* 2010; Bowen y Chung, 2009). La técnica estándar para la determinación del estatus del oncogén *MYCN* es la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés). Teniendo en cuenta que la amplificación de *MYCN* es un marcador inequívoco de un comportamiento tumoral agresivo que se utiliza en la estratificación de pacientes para el tratamiento, se ha desarrollado una metodología estandarizada para garantizar la calidad de los estudios del estatus de dicho gen (Ambros *et al.* 2003).

2.4.3 Pérdida del cromosoma 11

Las aberraciones genéticas en el brazo largo del cromosoma 11 en pacientes con NB incluyen traslocaciones desequilibradas que implican a 11q21 y 11q22, deleciones de 11q23, inversión de 11q21-q23, y más frecuentemente pérdida alélica. La región más común de deleción se ha definido en 11q23 y está presente en más de un 35% de los tumores neuroblásticos (Ora y Eggert, 2011). La pérdida de 11q se correlaciona inversamente con la amplificación de *MYCN* y se asocia con NBs agresivos de mal pronóstico, particularmente en pacientes con tumores con *MYCN* no amplificado (Spitz *et al.* 2003).

2.4.4 Otras alteraciones cromosómicas típicas en neuroblastoma

La ganancia del brazo largo del cromosoma 17 es la aberración cromosómica más frecuente en NB, presentándose en el 70% de todos los tumores y casi en el 100% de los NBs considerados de alto riesgo (Mosse *et al.* 2007; Schleiermacher *et al.* 2007 y Stallings *et al.* 2006). Esta ganancia puede consistir en un cromosoma 17 entero (tetrasomía), ganancias aisladas del segmento distal del brazo largo 17q21-qter o traslocaciones desequilibradas entre 17q y otros cromosomas como el 1p o el 11q. El valor pronóstico independiente de la ganancia del 17q continúa siendo un tema de debate (Bown *et al.* 1999; Spitz *et al.* 2003; Theissen *et al.* 2014 y Buckley *et al.* 2011).

La pérdida parcial del brazo corto del cromosoma 1 (1p) es una deleción que comprende desde la región 1p32 hasta 1p terminal (Brodeur *et al.* 1981), siendo la pérdida de 1p36 la alteración más común (Schwab *et al.* 2003). La región 1p36.31 es la deleción más pequeña descrita (Okawa *et al.* 2008). En el brazo distal del cromosoma 1 se han identificado genes supresores tumorales, sin embargo, no se ha demostrado

que ninguno de estos genes sea suficiente para desencadenar la tumorigénesis en NB (White *et al.* 2005).

Otras alteraciones cromosómicas frecuentemente descritas en NB son la ganancia del brazo largo del cromosoma 1, la delección del brazo corto de los cromosomas 3, 4, 9 y 12 así como la delección del brazo largo del cromosoma 14 (Mosse *et al.* 2007; Michels *et al.* 2007 y Janoueix *et al.* 2009).

2.4.5 Mutaciones en el neuroblastoma

Las mutaciones somáticas en el NB son poco frecuentes. Estudios recientes utilizando técnicas de secuenciación masiva han identificado algunas mutaciones somáticas recurrentes en genes como: *ARID1A* y *ARID1B* (11%), *ALK* (7-9.2%), *TIAM1* (3-10%), *PTPN11* (2.9%), *ATRX* (2.5%), *MYCN* (1.7%) y *NRAS* (0.83%) (Pugh *et al.* 2013; Molenaar *et al.* 2012).

En el 90% de los NB familiares se detectan mutaciones de *ALK* o de *PHOX2B* (Janoueix-Lerosey *et al.* 2008 y Trochet *et al.* 2004). El gen *ALK* codifica para un receptor tirosin quinasa y juega un papel fundamental en la diferenciación neuronal, la proliferación y supervivencia celular. Las mutaciones de *ALK* en NB esporádicos son menos frecuentes pero se pueden identificar tanto al diagnóstico (8-10%) como en las recaídas (17%) (Capasso y Deskin, 2010; Schleiermacher *et al.* 2014). Actualmente existen ensayos clínicos en fases tempranas con fármacos inhibidores de *ALK*.

2.5 FACTORES CON VALOR PRONÓSTICO EN NEUROBLASTOMA Y ESTRATIFICACIÓN EN GRUPOS DE RIESGO

Aunque existen multitud de factores con valor pronóstico en NB, muchos de ellos

no tienen un valor independiente y se presentan asociados con otros de mayor peso. La edad, el estadio de la enfermedad y la amplificación del oncogén *MYCN* son los factores admitidos por todos los grupos cooperativos. A ellos se añaden la clasificación histológica de Shimada, la ploidía y aberraciones en el brazo largo del cromosoma 11.

2.5.1 Edad al diagnóstico

Los lactantes menores de dieciocho meses, tanto con tumores loco-regionales como con tumores diseminados, tienen mejor pronóstico que los niños mayores de esta edad. Por otro lado, los pacientes mayores de 5 años con enfermedad metastásica al diagnóstico tienen mal pronóstico pero la enfermedad cursa de manera más lenta comparado con los mismos tumores diagnosticados en niños entre año y medio y 5 años de edad (Maris 2010; Evans y D'Angio, 2005).

2.5.2 Estadio clínico

En la década de los 90 se propuso un sistema de estadiaje basado en una evaluación clínica, radiológica y quirúrgica, conocido como *INSS (International Neuroblastoma Staging System* por sus siglas en inglés) (Brodeur *et al.* 1993). Según este sistema, los pacientes podían agruparse en los siguientes estadios:

Estadio 1: Tumor localizado con escisión macroscópica completa, con o sin enfermedad residual microscópica. Ganglios ipsilaterales representativos, negativos para el tumor microscópicamente, ya que los nódulos adheridos al tumor primario y extirpados junto con éste, pueden ser positivos.

Estadio 2A: Tumor localizado con escisión macroscópica incompleta. Ganglios

linfáticos ipsilaterales representativos, negativos para el tumor microscópicamente.

Estadio 2B: Tumor localizado con o sin escisión macroscópica completa. Ganglios linfáticos ipsilaterales no adherentes, positivos para el tumor. Los ganglios linfáticos contralaterales agrandados deben ser negativos microscópicamente.

Estadio 3: Tumor irreseccable, infiltrante más allá de la línea media, con o sin afectación de los ganglios linfáticos regionales; 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 de ganglios linfáticos. La línea media está determinada por la columna vertebral. Los tumores que se originan a un lado y cruzan la línea media deben infiltrarse sobre ésta, o hacia el lado opuesto de la columna vertebral.

Estadio 4: Todo tumor primario con diseminación a ganglios linfáticos distantes, huesos, médula ósea, hígado, piel u otros órganos, con excepción de lo definido para el estadio 4S.

Estadio 4S: Tumor primario localizado como se define en los estadios 1 y 2, con diseminación limitada a piel, hígado o médula ósea, en lactantes menores de un año de edad. La afectación medular debe ser mínima, un 10% de células nucleadas totales identificadas como malignas mediante biopsia de hueso o aspirados de médula ósea como máximo. Una afectación más extensa de la médula ósea se consideraría como enfermedad en estadio 4. Los resultados de la gammagrafía con MIBG, en caso de efectuarse, han de ser negativos para la médula ósea.

El INSS tiene en cuenta factores post-quirúrgicos para el estadiaje de los pacientes y no es un sistema adecuado para la estratificación de los pacientes antes del tratamiento (Monclair *et al.* 2009). Por tal motivo, más recientemente se desarrolló

un sistema de estadiaje conocido como *INRGSS* en el que la extensión de la enfermedad se determina por la presencia o ausencia de factores de riesgo valorados por imagen y la presencia o no de enfermedad metastásica (Monclair *et al.* 2009). Basados en este sistema, los tumores loco-regionales se estadían como L1 (localizados 1) o L2 (localizados 2) en función de la presencia o ausencia de factores de riesgo definidos por imagen. Los tumores metastásicos se definen como estadios M (metastásicos), excepto aquellos definidos como MS (metastásicos especiales), en los que las metástasis están confinadas a la piel, el hígado y/o la médula ósea en niños menores de 18 meses.

El actual sistema de estratificación de pacientes en grupos de riesgo tiene en cuenta factores de comprobada relevancia clínica (Cohn, 2009):

Clínicos: edad al diagnóstico y estadio tumoral (de acuerdo al *INRGSS*).

Histopatológicos: categoría histológica y grado de diferenciación tumoral.

Biológicos: estatus del oncogén *MYCN*; presencia o no de aberraciones genéticas en el brazo largo del cromosoma 11 y ploidía.

Utilizando este sistema, se definen 5 grupos de riesgo con diferentes tasas de supervivencia a 5 años (Tabla 1): pacientes de muy bajo riesgo (tasas de supervivencia superiores al 85%), pacientes de bajo riesgo (tasas de supervivencia entre el 75-85%), pacientes de riesgo intermedio (tasas de supervivencia entre el 50 y el 75%) y pacientes de alto riesgo (tasas de supervivencia inferiores al 50%).

2.6 TRATAMIENTO

El tratamiento del NB puede incluir: cirugía, quimioterapia, autotrasplante de progenitores hematopoyéticos, radioterapia y modificadores de la respuesta biológica y/o

Estadio INRG	Edad (meses)	Categoría Histológica	Diferenciación del tumor	MYCN	Delección de 11 q	Ploidía	Grupos de riesgo pretratamiento	
L1/L2		GN en maduración; GNB entremezclado					A-Muy bajo	
L1		cualquiera excepto GN en maduración; GNB entremezclado		No Amplificado			B-Muy bajo	
				Amplificado			K-Alto	
L2	< 18	cualquiera excepto GN en maduración; GNB entremezclado		No Amplificado	no		D-Bajo	
					si		G-Intermedio	
	≥ 18		GNB nodular; neuroblastoma	En diferenciación	No Amplificado	si		E-Bajo
				Pobremente diferenciado o indiferenciado	No Amplificado			H-Intermedio
				Amplificado		N-Alto		
M	< 18			No Amplificado		Hiperdiploide	F-Bajo	
	< 12			No Amplificado		Diploide	I-Intermedio	
	12 a < 18			No Amplificado		Diploide	J-Intermedio	
	< 18			Amplificado			O-Alto	
	≥ 18			Amplificado			P-Alto	
MS	< 18			No Amplificado	no		C-Muy bajo	
				Amplificado	si		Q-Alto	
				Amplificado			R-Alto	

TABLA 1. Clasificación de los neuroblastomas en grupos de riesgo pretratamiento (Cohn *et al.* 2009). GN: Ganglioneuroma; GNB: Ganglioneuroblastoma.

inmunoterapia. La utilización de cada uno de ellos y su mayor o menor intensidad dependen del grupo de riesgo al que se asigne el paciente.

Los pacientes con tumores localizados y sin amplificación de *MYCN* pueden tratarse sólo con cirugía, con quimioterapia de intensidad moderada y cirugía o con quimioterapia, cirugía, radioterapia local y ácido 13-cis retinoico.

Los pacientes con enfermedad metastásica, menores de un año y sin amplificación de *MYCN* se tratan con quimioterapia estándar y cirugía. Los MS con estas características y con un perfil genético normal no se operan. En algunos casos los MS no

amplificados sólo se observan, debido a que en este grupo se han descrito altas tasas de regresión espontánea.

Los pacientes con tumores localizados o metastásicos que presentan amplificación de *MYCN*, o aquellos con enfermedad metastásica mayores de un año independientemente del estatus del oncogén *MYCN*, se consideran de alto riesgo. El tratamiento de los NBs de alto riesgo incluye: quimioterapia de inducción, cirugía, autotrasplante de progenitores hematopoyéticos, radioterapia y terapia de mantenimiento basada en inmunoterapia con o sin citoquinas y ácido 13-cis retinoico. Pese a la intensidad del tratamiento que reciben estos pacientes, las tasas de supervivencia son menores de un 50% (Maris, 2010).

2.7 DETECCIÓN DE MICROMETÁSTASIS O ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

Desde que en la década de los 90 se detectaron células neuroblásticas en la sangre y médula ósea de pacientes con enfermedad diseminada, se han dedicado muchos esfuerzos a desarrollar y mejorar los métodos de detección de micrometástasis en el NB. Las técnicas más utilizadas para la detección de enfermedad mínima residual (EMR) en NB son la inmunocitología y la RT-qPCR (Figura 2). Pese a que estas técnicas parecen ser las más idóneas para la detección de micrometástasis en NB, su integración en el manejo de los pacientes sigue siendo un tema de debate.

La inmunocitología depende de la disponibilidad de anticuerpos que se unan a antígenos de membrana asociados a las células tumorales. La sensibilidad de esta técnica es de 1×10^{-6} células y está supeditada al número de células analizadas (Beiske *et al.* 2009). Considerando el origen neural del NB, se han evaluado diferentes anticuerpos

frente a proteínas neurales humanas. Los anticuerpos anti-GD2 parecen ser los más específicos y sensibles para la detección de células de NB en médula ósea (Faulkner *et al.* 1998). El disialogangliósido (GD2) es un glicoesfingolípido de membrana que se detecta en la mayoría de los NB (Cheung *et al.* 1985).

La amplificación de ARNm específicos de tejido por RT-qPCR es un método ampliamente utilizado para la detección de EMR en diferentes tipos de neoplasias inclu-

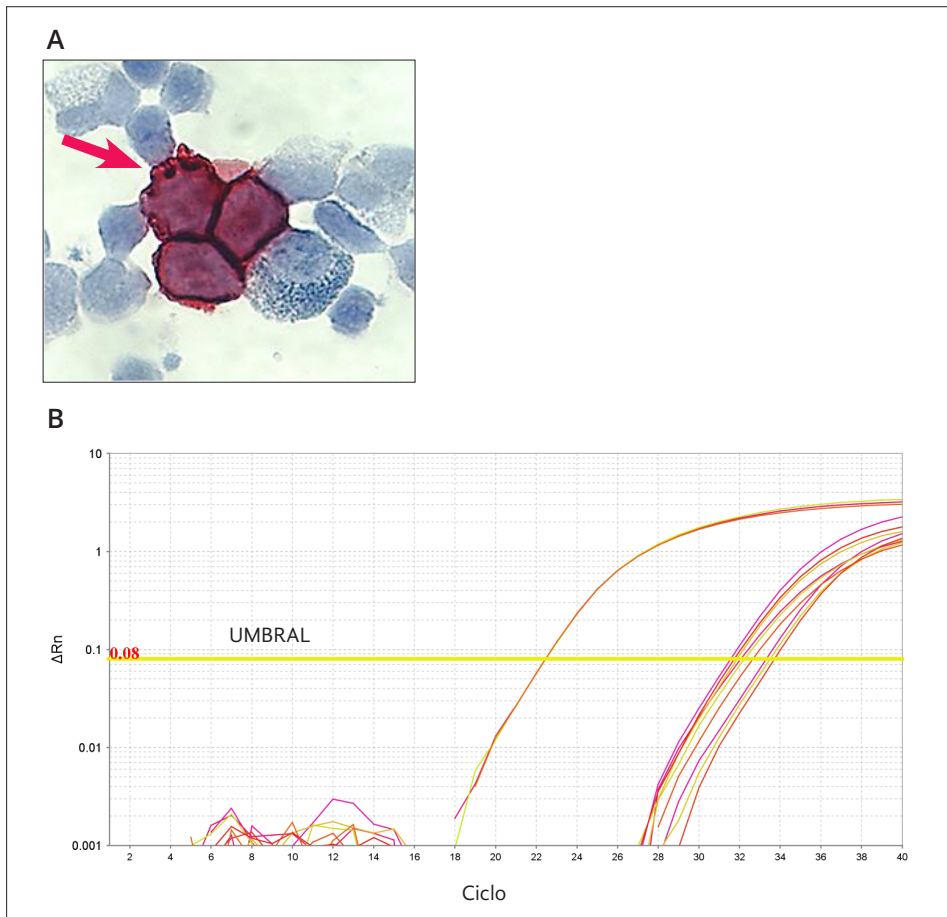


FIGURA 2. Métodos de detección de la enfermedad mínima residual en neuroblastoma. A: Detección inmunocitoquímica de células circulantes de neuroblastoma. B: Gráfico de la amplificación de la PCR cuantitativa a tiempo real.

yendo el NB (Burchill and Selby, 1990; Burchill and Selby, 2000). La RT-qPCR es una técnica altamente sensible que permite detectar una célula tumoral entre un millón de células normales. Sin embargo, la expresión de ARNm diana ha de interpretarse cuidadosamente puesto que puede estar influenciada por numerosos factores, como condiciones subóptimas de recogida y almacenamiento de las muestras, procesado inapropiado de las mismas y cambios en la transcripción de los genes utilizados como marcadores. El desarrollo de métodos semicuantitativos, comparando las cantidades de ARNm del gen candidato como biomarcador con los de un gen de expresión constitutiva, permiten una evaluación más potente y útil de los cambios en la carga de células tumorales en sangre periférica o médula ósea durante el transcurso de la enfermedad (Burchill *et al.* 2001).

Varios grupos han estudiado la especificidad y el valor pronóstico de la detección de la expresión de un gran número de genes (Oltra *et al.* 2005; Cheung *et al.* 2008; Stutterheim *et al.* 2008; Träger *et al.* 2008). Teniendo en cuenta que las catecolaminas son producidas por células de NB, el primer enzima de la ruta de las catecolaminas, la tirosín hidroxilasa ha sido el marcador más utilizado y rigurosamente evaluado para detectar células de NB mediante RT-qPCR. El gen *TH* se expresa en casi la totalidad de los tumores de NB (Ootsuka *et al.* 2007) y varios estudios previos apoyan su uso como marcador específico para diagnosticar NB y detectar EMR en muestras de médula ósea, aféresis y sangre periférica (Burchill *et al.* 2001; Oltra *et al.* 2005; Ootsuka *et al.* 2008, Viprey *et al.* 2014).

DCX es el producto del gen ligado al X “doblecortina”, está implicado en la migración de los neuroblastos durante el desarrollo del córtex cerebral y ha sido identificado como un marcador sensible y específico para la detección de EMR en NB

(Oltra *et al.* 2005; Viprey *et al.* 2014). Este gen se expresa en neuronas en migración a través del sistema nervioso central y periférico durante el desarrollo embrionario y postnatal, regula los microtúbulos del citoesqueleto y está implicado en los cambios morfológicos que sufren las células neurales en los procesos de migración (Tanaka *et al.* 2004; LoTurco *et al.* 2004).

Un biomarcador de EMR ideal es aquel que es específico del tumor y que no se expresa en tejido normal, médula ósea, sangre periférica o productos de aféresis de individuos sanos. Algunos autores han descrito la presencia, a bajos niveles, de *TH* y *DCX* en muestras de sangre periférica y médula ósea de donantes sanos (Kuçi *et al.* 2006; Corrias *et al.* 2012). Para enfrentarse al problema de la expresión ilegítima de los marcadores, los investigadores han utilizado diversas aproximaciones estadísticas (Träger *et al.* 2008; Viprey *et al.* 2014 and Cheung *et al.* 2015).

Stutterheim y colaboradores en el 2008 describieron a *PHOX2B* como un biomarcador 100% específico para la detección de células neuroblásticas. Este gen, también conocido como neuroblastoma *PHOX* está implicado en la formación de neuronas durante el desarrollo neural y en la diferenciación neuronal. Teniendo en cuenta la heterogeneidad celular del NB, el uso de varios marcadores para la detección de EMR aumenta la sensibilidad y la especificidad de detección de células neuroblásticas.

Diversos estudios han revelado el valor pronóstico de la detección de EMR en NB, sin embargo éstos se han centrado en pacientes con enfermedad metastásica y de alto riesgo (Burchill *et al.* 2001; Cheung *et al.* 2003; Träger *et al.* 2008; Viprey *et al.* 2014). El significado clínico de la detección de células tumorales por métodos moleculares en los distintos subgrupos de NB, sigue siendo un tema controvertido debido al limitado número de muestras analizadas en las series estudiadas, la falta de análisis

multivariantes y de una metodología común que permita comparar los resultados de diferentes centros y países.

2.8 MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Durante muchos años la investigación en cáncer ha estado enfocada en las alteraciones genéticas, sin embargo, en la última década, numerosos estudios refuerzan la implicación de los procesos epigenéticos en la oncogénesis y la progresión tumoral. El término epigenética hace referencia al conjunto de modificaciones bioquímicas del ADN que no involucran cambios en su secuencia de nucleótidos. Las modificaciones epigenéticas incluyen: la metilación del ADN, las modificaciones de histonas, la regulación post-transcripcional mediante ARNs no codificantes y la remodelación de la cromatina y los nucleosomas (Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011; Sandoval y Esteller, 2012; Dawson y Kouzarides, 2012) (Figura 3).

2.8.1 Metilación del ADN

La metilación del ADN es una modificación covalente mediante la cual se incorpora un grupo metilo (CH₃) en la posición 5' del anillo de pirimidina de una citosina, generando la 5-metilcitosina (mC) durante la fase S del ciclo celular. Esta reacción está mediada por la familia de enzimas denominadas ADN-metiltransferasas (DNMT, del inglés, Mammalian DNA methyltransferases) e incluyen: la DNMT1, cuya función es copiar y mantener el patrón de metilación durante la replicación del ADN uniéndose a cadenas de ADN parcialmente metiladas; la DNMT2, que presenta capacidad para unirse a secuencias de ADN independientemente del estado de metilación de las mismas aunque su función exacta todavía es desconocida; y la DNMT3, que puede actuar

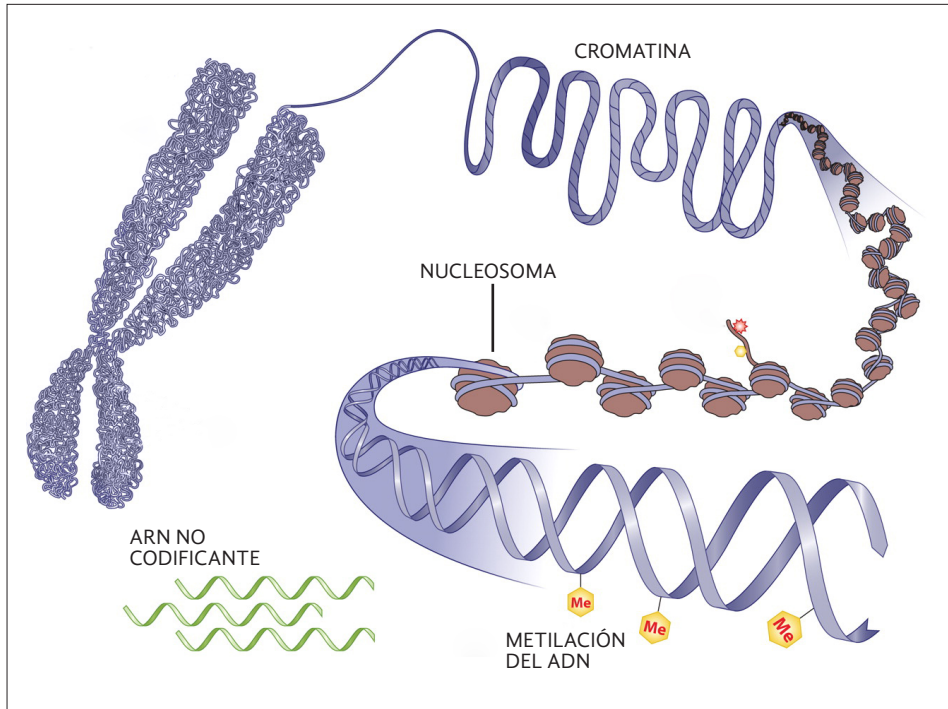


FIGURA 3. Mecanismos epigenéticos. Adaptada de Zaidi *et al.* 2010.

sobre cadenas de ADN semi-metiladas o no metiladas y cuya función es establecer *de novo* el patrón de metilación del ADN en células embrionarias y células no diferenciadas (Espada y Esteller 2010; Dawson y Kouzarides, 2012). La metilación del ADN contribuye a la inactivación de genes durante el desarrollo embrionario, en los procesos de diferenciación de los tejidos, en la inactivación del cromosoma X y en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica (revisado en Lawor and Thiele, 2012).

La metilación de citosinas localizadas en los dinucleótidos CpG constituye la principal modificación epigenética en los seres humanos. Un 3-4% de todas las moléculas de citosina están metiladas, y las 5-metilcitosinas resultantes forman el 0.75-1% de todos los nucleótidos del ADN de un tejido humano. Los dinucleótidos CpG se concentran en regiones denominadas islas CpG, las cuales están generalmente no metiladas.

Estos motivos se concentran en el extremo 5' de muchos genes, incluyendo la región promotora, regiones no codificantes y el exón 1, lo cual los convierte en excelentes marcadores del comienzo de un gen (Bird 1986). Para ser reconocida como isla CpG, una secuencia debe cumplir los siguientes criterios: el contenido G+C ha de ser igual o mayor al 50%, una proporción observada de dinucleótidos CpG igual o mayor al 60% de la proporción esperada, y que ambas condiciones se den en secuencias de al menos 200 pb (Fazzari *et al.* 2004).

Aproximadamente el 80% de los dinucleótidos CpG del genoma que no están asociados a islas CpG están fuertemente metilados. En cambio, los dinucleótidos de las islas CpG, especialmente aquellos asociados a promotores génicos, suelen estar desmetilados (Herman *et al.* 2003). Se ha propuesto que la metilación de ADN fuera de las islas CpG es un mecanismo de defensa contra secuencias de ADN parásito adquiridas a lo largo de la historia. Estas secuencias parásitas, suman casi un 35% del genoma y probablemente la principal línea de defensa contra la expresión de las mismas sea su inactivación mediante la metilación de sus regiones promotoras (Esteller 2003).

2.8.2 Metilación del ADN en cáncer

Las células tumorales presentan una hipometilación global del genoma y una hipermetilación específica de islas CpG en las regiones promotoras de determinados genes que no están hipermetilados en tejidos no tumorales (Esteller 2007; Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011; Dawson y Kouzarides, 2012). La hipometilación ocurre predominantemente en las zonas de ADN repetitivo y se asocia a inestabilidad cromosómica, pérdida de la impronta génica y reactivación de proto-oncogenes (Esteller 2008; Baylin y Jones, 2011). Varios autores han descrito que la hipermetilación aberrante de regiones

promotoras de genes supresores de tumores juega un papel importante en el desarrollo y progresión de diferentes tipos de neoplasias (Alaminos *et al.* 2004; Hernando *et al.* 2004; Sharma *et al.* 2010). Aunque podemos encontrar distintos grados de metilación de islas CpG en las regiones promotoras, una densa hipermetilación se asocia con el silenciamiento aberrante de la transcripción, y es un mecanismo para la inactivación de genes supresores de tumores, además de las mutaciones. Entre los genes supresores tumorales modificados por hipermetilación del promotor se encuentran el *RBI*, el *VHL* en cáncer renal, el gen *p16* de control del ciclo celular en muchos tipos de tumores, y el gen *MLH1* de reparación de desemparejamientos en cáncer colorectal y otras neoplasias (Herman *et al.* 2003). Además, mediante la hipermetilación pueden ser silenciados factores de transcripción provocando el silenciamiento de sus genes diana o genes reparadores del ADN (Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011).

2.8.3 Modificaciones covalentes de las histonas

El patrón de modificaciones post-translacionales de las histonas en su cola amino-terminal contribuye a determinar la estructura de la cromatina y por tanto su nivel transcripcional. En las células eucariotas el ADN genómico se encuentra condensado en el núcleo y estructurado en forma de cromatina. Las unidades básicas de la cromatina son los nucleosomas, constituidos por un octámero de histonas (dos unidades de H2A, H2B, H3 y H4), envueltos por 146 pares de bases (pb) de ADN. A su vez, los nucleosomas se empaquetan más debido a la proteína enlazadora de histonas H1 y a proteínas no histonas que forman un complejo compacto denominado nucleoproteína (Clapier y Cairns, 2009; Baylin and Jones, 2011). La cromatina se puede encontrar en forma de eucromatina (cromatina transcripcionalmente activa) y heterocromatina

(cromatina transcripcionalmente inactiva) (Nair y Kumar, 2012; Dawson y Kouzarides, 2012).

Las modificaciones post-translacionales de las histonas en su cola amino-terminal incluyen la acetilación, metilación, ubiquitinización y fosforilación (Dawson y Kouzarides, 2012). Dichas modificaciones regulan procesos celulares claves como la transcripción, la replicación y la reparación (Sharma et al 2010). Se conoce que los enzimas que regulan los patrones de modificación de histonas y de metilación del ADN interactúan a múltiples niveles para determinar el estatus de expresión de los genes, la organización de la cromatina y la identidad celular, lo cual refleja la complejidad de la regulación epigenómica de la expresión génica (Sharma et al 2010).

2.8.4 ARNs no codificantes

Los ARNs no codificantes pueden regular la expresión génica mediante el silenciamiento post-transcripcional de genes diana. Los micro-ARNs son pequeñas moléculas de ARN no codificante que se expresan de manera específica en los distintos tejidos y controlan gran cantidad de procesos biológicos incluyendo la proliferación, la apoptosis y la diferenciación celular; los más comúnmente desregulados en cáncer. Los micro-ARNs pueden funcionar como supresores tumorales o como oncogenes dependiendo de sus genes diana (Sandoval y Esteller, 2012; Sharma *et al.* 2010).

2.8.5 Remodelación de la cromatina y los nucleosomas

Los nucleosomas regulan la expresión génica al alterar la accesibilidad de los factores de transcripción a secuencias de ADN regulador. La remodelación de los nucleosomas y el reemplazamiento de las histonas canónicas por variantes de histonas especializa-

das también juegan un papel importante en la regulación de la expresión de los genes (Sharma *et al.* 2010). Estudios recientes han sacado a la luz que el silenciamiento de genes supresores de tumores inducido por metilación del ADN, involucra cambios en el posicionamiento de los nucleosomas de manera que ocupan el sitio de inicio de la transcripción de dichos genes (Sharma *et al.* 2010).

2.8.6 Tratamiento epigenético antineoplásico

En líneas celulares tumorales, los inhibidores de las desacetilasas de histonas (HDACi) permiten restablecer parcialmente el patrón normal de acetilación consiguiendo un efecto antineoplásico. Estos fármacos se pueden clasificar en cuatro grupos según su naturaleza química: ácidos hidroxámicos (tricostatina A, ácido hidroxámico suberililida SAHA), péptidos cíclicos (romidespina), derivados de benzamidas (MS-275) y ácidos grasos de cadena corta (ácido valproico, butirato de sodio) (Esteller 2007b; Kim *et al.* 2006; Rodríguez-Paredes y Esteller 2011). Los HDACi tienen la capacidad de reactivar la expresión de distintos genes, entre ellos los genes supresores de tumores (Esteller 2007; Sharma *et al.* 2010; Dawson y Kouzarides, 2012). Además, inducen diferenciación, apoptosis, tienen efectos antiproliferativos, inhiben la angiogénesis e incrementan la sensibilidad a la quimioterapia (Sharma *et al.* 2010; Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011).

El agente desmetilante 5-aza-2'desoxicitidina (Aza) es un análogo de la citosina que durante la replicación celular se incorpora en el ADN. Actúa específicamente en la fase S y retrasa el ciclo celular favoreciendo la diferenciación y la inhibición del crecimiento celular (Kantarjian e Issa 2005). El Aza inhibe la metilación del ADN atrapando los enzimas DNMTs de manera covalente, provocando así una reactivación

de la expresión génica (Christman 2002; Cowan *et al.* 2010). Además, este fármaco incrementa la acetilación de la histona H3 en la lisina 9 a la vez que disminuye su metilación, normalizando la relación acetilación/metilación, lo cual contribuye a restaurar la expresión génica (Dawson y Kouzarides, 2012). Teniendo en cuenta que tanto la metilación aberrante de las islas CpG como las modificaciones de histonas son mecanismos reversibles de inactivación génica, se han explorado combinaciones terapéuticas de agentes desmetilantes y HDACi para valorar su efecto antitumoral. En algunos casos la re-expresión de algunos genes supresores tumorales sólo ocurre cuando se combinan ambos fármacos debido a que tienen efecto sinérgico (Zhu y Otterson, 2003; Hurtubise *et al.* 2008; Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011).

2.8.7 Modificaciones epigenéticas en tumores neuroblásticos

Los mecanismos moleculares que conllevan al desarrollo del NB no están del todo esclarecidos. En las últimas décadas se han dedicado grandes esfuerzos a determinar la implicación de los eventos epigenéticos en la tumorigénesis y la progresión del NB. En este sentido se han descrito genes cuya expresión se halla controlada, entre otros mecanismos, por eventos epigenéticos. Ejemplos de ellos son *CASP8* y *RASSF1A*, ambos se encuentran frecuentemente hipermetilados en tumores primarios de NB y su nivel de metilación se asocia de manera significativa con la supervivencia de los pacientes (Fulda *et al.*, 2001, Yang *et al.* 2004 y van Noesel and Versteeg, 2004). *CASP8* codifica para un importante enzima de la cascada apoptótica, y su patrón de metilación ha sido muy estudiado en muchos tipos de tumores. Se ha propuesto que *CASP8* está inactivada por metilación o delección en NB con *MYCN* amplificado (Teitz *et al.* 2000). Estudios funcionales sugieren que la metilación del ADN de *CASP8* re-

gula indirectamente su expresión génica a través de otros factores transcripcionales (Banelli *et al.* 2004). La hipermetilación del promotor de *RAR beta 2* es un evento que se asocia a NB menos agresivos y no se ha descrito en tumores más agresivos (Alaminos *et al.* 2004). Por otra parte la metilación de los genes *CCND2* y *TMS1* ha sido considerada como un marcador de estadios avanzados de NB. La metilación del gen *CCND2*, que actúa en la transición de fase G1 a S en el ciclo celular, puede tener efectos inhibitorios en el crecimiento celular (Alaminos *et al.* 2004). *TMS1* inhibe la supervivencia de las células tumorales y su silenciamiento puede conferir una ventaja en el crecimiento que permitiera a las células escapar de los procesos apoptóticos. Estudios en células diseminadas de NB, revelan que la hipermetilación *TMS1* es un evento estrechamente relacionado con el riesgo de recaída (Grau *et al.* 2010). Otros genes supresores tumorales como *TP73*, *HOXA9*, *THBS-1* y *FOLH1* también se han encontrado hipermetilados en este tumor (Alaminos *et al.* 2004; Banelli *et al.* 2005; Yang *et al.* 2010).

Se han descrito varios mecanismos epigenéticos a través de los cuales *MYCN* afecta a la transcripción génica. *MYCN* recluta a DNMT3, responsable de establecer *de novo* el patrón de metilación en los promotores de los genes susceptibles de ser silenciados mediante hipermetilación en NB (Hervouet *et al.* 2009; Guccione *et al.* 2006; Cotterman *et al.* 2008). Además, interacciona con el complejo de proteínas Polycomb PRC2 (del inglés *polycomb repressor complex 2*) que actúa como represor epigenético y que se asocia con tumores indiferenciados y con la inactivación de genes supresores de tumores en NB (revisado en He *et al.* 2013). Estos mecanismos podrían explicar la frecuente hipermetilación de algunos genes en tumores con amplificación de *MYCN* (He *et al.* 2013).

En NB y otras neoplasias está descrita la existencia de un fenómeno conocido como fenotipo hipermetilador de islas CpG y que consiste en la hipermetilación simultánea de determinados genes localizados en distintos puntos de genoma. Este fenómeno se asocia a peor supervivencia de los pacientes (Issa, 2004; Baylin y Jones, 2011 y Yang et al, 2010).

Hasta el momento se han encontrado alrededor de una centena de genes cuyo patrón de metilación está alterado en NB. Estos genes están implicados fundamentalmente en el control del ciclo celular, la invasión y la arquitectura celular (Decock et. al 2011). Las nuevas tecnologías han abierto la posibilidad de investigar las modificaciones epigenéticas en todo el genoma e integrar esa información con otros datos como perfiles de expresión de ARNm y miARN, datos proteómicos y clínicos. El número de biomarcadores epigenéticos clínicamente relevantes en NB es aún muy escaso de ahí la necesidad de seguir investigando en este tema para elucidar los diferentes perfiles epigenómicos asociados a los diferentes fenotipos que presenta el NB.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Los biomarcadores junto a las dianas terapéuticas son los pilares para lograr una intervención clínica personalizada y en los últimos años han cobrado especial relevancia en el manejo de los pacientes afectos de NB. Nuestra hipótesis establece que tanto la detección de marcadores genéticos con valor pronóstico, como el conocimiento de las alteraciones epigenéticas implicadas en la patogénesis del NB, ayudarán a mejorar la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo, evaluar de manera precisa el estatus del paciente durante el curso de la enfermedad así como orientar en la terapéutica tanto en la práctica clínica habitual como en relación a futuros ensayos clínicos.

3.2 OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo del presente trabajo es identificar biomarcadores genéticos y epigenéticos del comportamiento clínico y biológico del NB.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Artículo I Comprobar el valor pronóstico de la detección de enfermedad mínima en pacientes con NB localizado.

- 1 Determinar el efecto de la detección de la expresión génica de *TH* y *DCX* en sangre periférica y médula ósea al diagnóstico en la supervivencia de los pacientes con NB no metastásico.

2 Estudiar si la detección de la expresión génica de *TH* y *DCX* en sangre periférica y médula ósea al diagnóstico puede ayudar a identificar pacientes con NB no metastásico que requieren un manejo terapéutico especial.

Artículo II Evaluar la utilidad clínica de la detección de EMR en pacientes con enfermedad metastásica.

1 Definir el valor pronóstico independiente de la detección de EMR mediante RT-qPCR en muestras de sangre periférica y médula ósea al diagnóstico y en distintos momentos a lo largo del proceso terapéutico.

2 Aclarar la utilidad clínica de la detección de la expresión génica de *TH* y *DCX* para monitorizar la enfermedad y evaluar la respuesta al tratamiento.

Artículo III Identificar biomarcadores epigenéticos en NB mediante *arrays* de metilación.

1 Determinar la existencia de genes hipermetilados específicos de los diferentes subgrupos clínicos de neuroblastoma, y establecer su valor pronóstico como biomarcadores de progresión de la enfermedad.

2 Estudiar la relación de los eventos epigenéticos encontrados con otras variables biológicas y clínicas con valor pronóstico conocido.

3 Determinar el valor pronóstico independiente de los perfiles epigenéticos encontradas.

4. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS COMO COMPENDIO DE PUBLICACIONES Y ALCANCE DE LOS RESULTADOS

La presente tesis doctoral es un compendio de tres publicaciones que identifican biomarcadores con utilidad pronóstica en el NB. Los tres retos en la investigación del NB que recogen los artículos se detallan a continuación:

Evaluar el valor pronóstico de la detección de la expresión génica de *TH* y *DCX* en sangre periférica y aspirados de médula ósea de pacientes con tumores localizados al diagnóstico

Entre los NBs no metastásicos existen subgrupos clínica y biológicamente diferentes y la identificación de pacientes que requieren un tratamiento más intensivo es aún un desafío. Pese a que las tasas de supervivencia de los pacientes con tumores localizados y sin amplificación de *MYCN* suelen ser altas, algunos presentan recaídas metastásicas y fallecen a causa de la enfermedad. Se han publicado diversos estudios enfocados en determinar el valor pronóstico de la detección de EMR en NB, pero éstos están fundamentalmente centrados en pacientes con enfermedad metastásica y de alto riesgo. La detección de la expresión de *TH* y *DCX* en sangre periférica y médula ósea de pacientes con NB no metastásico al diagnóstico, podría asociarse con el pronóstico de dichos pacientes y ayudaría a identificar aquellos que requieren un seguimiento más exhaustivo y una actitud terapéutica más agresiva.

Aclarar la utilidad clínica de la detección EMR en NBs metastásicos al diagnóstico y durante el proceso terapéutico.

Los NBs metastásicos y fundamentalmente aquellos de alto riesgo, presentan bajas tasas de supervivencia pese a recibir un tratamiento multimodal intensivo. Determinar el valor pronóstico independiente de la detección de células tumorales en sangre periférica y médula ósea al diagnóstico, mediante técnicas moleculares altamente sensibles, ayudaría a identificar pacientes con pronóstico desfavorable que necesitan un tratamiento más agresivo. La monitorización de la EMR a lo largo del curso de la enfermedad permitiría optimizar la evaluación de la respuesta al tratamiento y detectar precozmente las recaídas.

Identificar biomarcadores epigenéticos con valor pronóstico en el NB

El pronóstico de los pacientes con NB ha mejorado notablemente en los últimos años, las expectativas de curación globales de la enfermedad están alrededor del 65%, pero en algunos subgrupos son mucho menores. Pese a que existen anomalías genéticas muy bien caracterizadas que se asocian al NB, éstas no explican la heterogeneidad clínica observada en los pacientes. El estudio de las alteraciones epigenéticas es un enfoque alternativo a los estudios genéticos convencionales que ha ganado relevancia en los últimos años. Sin embargo, la mayoría de los estudios epigenéticos en este tumor sólido pediátrico, se han focalizado en el análisis directo de genes candidatos, limitando el estudio de muchas regiones implicadas en la tumorigénesis del NB. El análisis de la metilación aberrante en todo el genoma, puede ser una buena herramienta para identificar biomarcadores epigenéticos del comportamiento clínico y biológico de la enfermedad que ayuden a mejorar la es-

tratificación de los pacientes en función del riesgo de recaídas así como el manejo del tratamiento.

5. COMPENDIO DE PUBLICACIONES

ARTÍCULO I

Minimal disease detection in peripheral blood and bone marrow from non-metastatic Neuroblastoma patients.

Yania Yáñez, Elena Grau, Silvestre Oltra, Adela Cañete, Francisco Martinez, Carmen Orellana, Rosa Noguera, Sarai Palanca, Victoria Castel. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011, 137(8):1263-72.

ARTÍCULO II

TH and *DCX* mRNAs in peripheral blood and bone marrow predict outcome in metastatic Neuroblastoma patients.

Yania Yáñez, David Hervás, Elena Grau, Silvestre Oltra, Gema Pérez, Sarai Palanca, Mar Bermúdez, Catalina Márquez, Adela Cañete and Victoria Castel. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016, 142(3):573-80.

ARTÍCULO III

Two independent epigenetic biomarkers predict survival in Neuroblastoma.

Yania Yáñez, Elena Grau, Virginia Rodríguez, David Hervás, Rosa Noguera, Miguel Hernández, Vanessa Segura, Adela Cañete, Ana Conesa, Jaime Font de Mora and Victoria Castel. *Clin Epigenetics* 2015, 7(1):16.

5.1 ARTÍCULO I

Minimal disease detection in peripheral blood and bone marrow from non-metastatic Neuroblastoma patients.

Yania Yáñez, Elena Grau, Silvestre Oltra, Adela Cañete, Francisco Martínez, Carmen Orellana, Rosa Noguera, Sarai Palanca, Victoria Castel.

J Cancer Res Clin Oncol 2011, 137(8):1263-72.

Impact Factor 2011: 2.558

Minimal disease detection in peripheral blood and bone marrow from patients with non-metastatic neuroblastoma

Yania Yáñez · Elena Grau · Silvestre Oltra · Adela Cañete · Francisco Martínez · Carmen Orellana · Rosa Noguera · Sarai Palanca · Victoria Castel

Received: 11 April 2011 / Accepted: 9 June 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract

Purpose In non-metastatic neuroblastoma (NB), the identification of the cases that require more intensive treatment is still difficult. Minimal disease (MD) and minimal residual disease (MRD) detection in outcome prediction seems to be important in advanced neuroblastoma, but there are not many studies focused on patients with non-metastatic disease. The aim of this study was to determine whether the presence of MD detected at diagnosis could be associated with bad prognosis.

Procedures Quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction QRT–PCR was performed on peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) samples from patients with non-metastatic NB at diagnosis for tyrosine hydroxylase (TH) and doublecortin (DCX) mRNAs detection.

Results The frequencies of detecting MD in our series of 102 patients with non-metastatic NB were as follows: 6.2% (5/81) PB samples and 10.6% (10/94) BM samples. Overall survival was similar for patients who expressed or not the MD biomarkers at diagnosis. However, patients with MD

detected in PB showed lower EFS than patients with negative PB ($P = 0.038$).

Conclusions Minimal disease detection in PB seems to be useful for predicting relapse probabilities in patients with non-metastatic NB. The stages 1 and 2 patients with neuroblastoma showed high survival rates, and MD was detected in a small number of patients probably being non-contributory for predicting patient outcome. For stage 3 patients with NB, MD detection by QRT–PCR in PB at diagnosis could be useful for predicting outcome and for early and sensitive detection of relapsing disease.

Keywords Neuroblastoma · Minimal residual disease · Quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction (QRT–PCR) · MYCN · 1p deletion

Introduction

One of the most frequent solid tumours in early childhood is neuroblastoma (NB). NB is remarkable for its clinical and genetic heterogeneity. Prognosis fundamentally depends on age at diagnosis (Brodeur and Maris 2002; London et al. 2005), histology (Shimada et al. 1999), tumour stage (Brodeur et al. 1988) and *MYCN* oncogene amplification status (Brodeur et al. 1984; Seeger et al. 1985). Other molecular parameters such as tumour cell DNA content (Look et al. 1991), gain of chromosome arm 17q (Caron 1995), deletion of chromosome arm 1p (Christiansen and Lampert 1998) and recently 11q (Cohn et al. 2009; Spitz et al. 2006) have shown to be predictive of patient outcome.

Localized NB patients with *MYCN* amplification (MY-CNA) (stages 2 and 3) are included in high-risk protocol and receive an intensive treatment schedule, including induction chemotherapy, surgery, myeloablative

Y. Yáñez (✉) · A. Cañete · V. Castel
Unidad de Oncología Pediátrica, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Bulevar Sur S/N, 46026 Valencia, Spain
e-mail: yanez_yan@gva.es

E. Grau · S. Oltra · F. Martínez · C. Orellana
Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

R. Noguera
Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

S. Palanca
Laboratorio de Biología Molecular, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain

chemotherapy followed by autologous stem cell reinfusion, radiotherapy and biological-based therapy with 13-*cis*-retinoic acid. Nevertheless, high-risk patients have frequently fatal outcome.

On the other hand, patients with localized disease and without MYCN are generally treated only with surgery (stages 1–2) or with standard-dose chemotherapy followed by surgery (stage 3) showing a good outcome. High 5-year overall survival (OS) and event-free survival (EFS) have been observed in these patients ($99 \pm 1\%$ and $90 \pm 3\%$, respectively) (Cotterill et al. 2000). Separating patients by stage, OS and EFS are around 95% for stage 1, 86% for stage 2 and 65% for stage 3 patients (Rubie et al. 2011). Despite the good prognosis, some of these patients present metastatic relapses and consequently die.

Solid tumours continuously shed cells into the circulation, and in NB, this minimal disease (MD) can be detected in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) (Moss and Sanders 1990; Swartz et al. 1999). Molecular detection of MD has been considered an important prognostic factor in metastatic NB. Quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction (QRT–PCR) technique for detecting tumour cells in PB and BM is an extremely sensitive method that makes possible the detection of one tumoral cell in 10^6 haematopoietic cells (Cheung and Cheung 2001; Lambooy et al. 2003).

Many studies have been performed to identify suitable targets for MD and minimal residual disease (MRD) detection in NB. A recent European study concluded that tyrosine hydroxylase (*TH*), doublecortin (*DCX*) and *PHOX2B* genes are the best candidates for circulating NB cell detection (Viprey et al. 2008). In our group, we routinely perform the MRD analysis in high-risk patients with NB using *TH* and *DCX* biomarkers because of their complementarities in tumoral cell detection (Oltra et al. 2005).

The *TH* gene codes for the first enzyme in the catecholamine synthesis pathway, which is produced by NB cells (Burchill et al. 2001). The *DCX* gene codes for a microtubule-associated protein that interacts with and regulates the microtubule cytoskeleton. It is expressed specifically in migrating neurons from the central and peripheral nervous system (Gleeson et al. 1999).

The aim of the present study was to analyse the *TH* and *DCX* expression at diagnosis in PB and BM from patients with non-metastatic NB to associate the MD presence with outcome.

Materials and methods

Patients and samples

The present study consists of 102 patients with NB from 34 cooperative Spanish hospitals. NB staging was

established according to International Neuroblastoma Staging System (INSS) criteria. Samples of fresh or frozen tumour were referred to the Spanish reference centre for pathology and molecular biology NB studies. Samples were centrally reviewed and classified according to the International Neuroblastoma Pathology Committee (INPC) system (Shimada et al. 1999; Burgues et al. 2006). Biological studies included status of *MYCN* and 1p, both studied by FISH according to ENQUA guidelines (Noguera et al. 2003; Ambros et al. 2003). Patients were included in different National and European studies (L NESG-I and II, INES, EUNS, HR-NBL1 and others). Two BM aspirations and 2 biopsies were performed on routine at diagnosis in all NB cases. All BM were previously analysed by cytological and histological screening and were negative at diagnosis. The MD studies were centrally performed at the Spanish NB MRD reference laboratory, and for these purpose, 2 ml of PB and 0.5 ml of BM were collected in EDTA Vacutainer tubes (BD, UK). All patients had at least one sample, and most of them had both PB and BM. Patients' samples were considered positive when both markers were detected. Informed consent for samples and data management was obtained in all cases from patients' parents.

Total RNA extraction

Ficoll gradient centrifugation was used to isolate mononuclear cells from BM and PB specimens, as recommended by the manufacturer (Lymphoprep AXIS-SHIELD PoC AS).

Once purified, mononuclear cells were lysed in RLT (RNasy kit; Qiagen) and immediately stored at -80°C . Total RNA was isolated with a RNasy kit (Qiagen), following the manufacturer's recommendations.

Retro-transcription (RT)

Total RNA was reverse transcribed in a final volume of 40 μL , following the manufacturer's guidelines (GeneAmpGold RNA PCR Core Kit, Applied Biosystems). The reaction mixture was incubated at 25°C for 15 min and at 42°C for 30 min.

Real-time quantitative PCR

Real-time quantitative PCR of *DCX*, *TH* and *GAPD* mRNA was achieved by means of the ABI Prism 7,000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). TaqMan MGB probes and primers were used to quantify the *DCX*, *TH* and *GAPDH* expression. All expression assays have FAM reporter dye at the 5' end and a non-fluorescent quencher at

the 3' end of the probe. *GAPDH* gene was used as an endogenous reference to control the difference in RNA extraction and cDNA synthesis.

In each 25 μ L 96-Well Optical Reaction Plate, 1.5 μ L of cDNA template was added to a PCR reaction mix (Applied Biosystems) containing 5 mmol/L MgCl₂; 200 mmol/L of each of dATP, dCTP, dGTP and dUTP; 0.05 U/mL AmpliTaq Gold DNA polymerase; and 0.01 U/mL AmpErase UNG to prevent the PCR product from carrying over, as well as a passive reference dye, ROX. This reference dye provides an internal reference to which the reporter dye signal can be normalized, compensating for differences between wells and experiments caused by pipetting errors or by instrument variability; 1.25 μ L of *DCX*, *TH* or *GAPD* Assays-on-Demand mixture was also included in the mixture (The TaqMan MGB probes and primers have a concentration of 18 nM for each primer and 5 nM for the probe). The assay references were as follows: Hs00167057_m1, Hs00165941_m1 and Hs99999905_m1, respectively. Each plate was covered with an Optical Adhesive Cover (Applied Biosystems). Samples were always run in duplicate PCR experiments. The initial PCR started using the ABI Prism 7,000 Sequence Detector with a 50°C, 2-minute step to optimize UNG activity, followed by a 95°C, 10-minute step to activate AmpliTaq Gold DNA polymerase and UNG deactivation. Then, 50 2-step cycles were performed, one at 95°C for 15 s and one at 60°C for 1 min. The entire PCR took 2 h and 11 min to complete, with no post-PCR handling. The amount of both *DCX* and *TH* was measured in reference to the housekeeping *GAPDH* gene, also studied in duplicate by obtaining the Δ CT values in the following way: The mean CT for the marker gene was subtracted by the mean CT of *GAPDH* (Δ CT = CT [Marker]-CT [*GAPDH*]).

Statistical analyses

Mean values comparison was performed by the Student's *t* test. For EFS analysis, time to event was defined as the time from diagnosis until the time of first occurrence of relapse, progression or death. For OS, time to event was defined as time until death or until last contact if the patient was alive. Survival analysis was performed to compare OS and EFS between groups using the Kaplan–Meier method, and differences between groups were tested using log-rank tests. These statistical analyses were run using SPSS, version 12.0.

Results

Samples from 102 NB patients with non-metastatic disease at diagnosis were classified as follows: 38 stage 1, 11 stage

2 and 53 stage 3. Stages 1–2 patients were treated only with surgery followed by a complete re-evaluation according to the LNESG-I or II protocol. Stage 3 patients also received chemotherapy according to the INES or EUNS study. Stages 2 and 3 patients with *MYCNA* received high-dose chemotherapy, myeloablative therapy with haematopoietic stem cell rescue, local radiotherapy and 13-cis retinoic therapy in conformity with the HR-NBL1 study. Clinical, biological and follow-up data are summarized in Table 1. Favourable histology was found in 54 patients (twenty-six stage 1, four stage 2 and twenty-four stage 3). Twenty-eight patients presented unfavourable histology (two stage 1, three stage 2 and twenty-three stage 3). INPC classification was not informed in 20 cases. *MYCN* amplification was detected in 16 patients (two stage 2 and fourteen stage 3). Deleted 1p chromosome was observed in 17 patients (two stage 1, one stage 2 and fourteen stage 3), while imbalanced 1p chromosome was found in 6 patients (three stage 1, one stage 2 and two stage 3). Relapses were observed in one stage 1 and three stage 2 (one local and two local and metastatic). However, all of them are currently alive. With respect to the stage 3 patients with NB, four patients presented disease progression and seven relapsed (three presented metastatic relapses, one presented local relapse and one presented local and metastatic relapse; relapse location was not informed in two patients). Thirteen stage 3 patients died, eleven of them due to disease progression, one due to surgical complications and one died 21 days after diagnosis because the patient's parents refused any treatment (Table 1).

The expression of *TH* and *DCX* was analysed in 81 PB and 94 BM samples collected at diagnosis from the 102 patients included in the study. We detected positive PB samples in 5 patients (one stage 1 (3%), none stage 2 (0%) and four stage 3 (9%)). In addition, 10 patients presented positive BM samples (two stage 1 (6%), none stage 2 (0%) and eight stage 3 patients (16%)). The number and percentages of positive PB and BM samples depending on the *TH* and *DCX* expression and separating patients according to the stage are detailed in Table 2.

OS and EFS were similar for patients expressing or not the MD markers in BM. This analysis was also done excluding the patient who died due to surgical complications and the untreated case, and the same results were obtained. When we separated patients by stage, there were no differences in OS or in EFS for stages 1–2 and stage 3 patients according to the detection of MD in BM or not (Fig 1).

Significant results were found in survival analysis when we studied MD detection in PB. The analysis shows that non-metastatic NB patients with MD detected in PB presented lower EFS than patients with negative PB ($P = 0.038$). OS was similar for patients expressing, or

Table 1 Overview of the 102 patients with non-metastatic neuroblastoma included at diagnosis in the analysis

Characteristic	INSS stage			Total
	1	2	3	
Number of patients	38	11	53	102
Age at diagnostic in months				
Median	25	17	24	23
Range	0.4–138	0.9–62	0.2–126	0.2–138
Patients over 18 months at diagnostic	16	3	25	44
Sex				
Female	22	7	21	50
Male	16	4	32	52
Primary site				
Adrenal	16	5	13	34
Abdominal	11	2	27	40
Cervical	0	0	1	1
Thorax	10	1	7	18
Cervical–thorax	0	0	2	2
Thorax–abdominal	0	0	1	1
Pelvic	0	1	1	2
Other sites	1	2	1	4
Protocol of treatment				
L NESGI	2	0	0	2
L NESGII	21	5	0	26
EUNS	0	0	19	19
INES	7	3	13	23
HR-NBL-1	0	2	14	16
Other	9	0	7	16
Histology				
Favourable histology (%)	26 (68%)	4 (36%)	24 (45%)	54 (53%)
Unfavourable histology (%)	2 (5%)	3 (27%)	23 (43%)	28 (27%)
Not informed (%)	10 (26%)	4 (36%)	6 (11%)	20 (30%)
MYCN status				
Amplified (%)	0 (0%)	2 (18%)	14 (26%)	16 (16%)
Not amplified (%)	34 (89%)	9 (82%)	37 (70%)	80 (78%)
Not determined (%)	4 (10%)	0 (0%)	2 (4%)	6 (6%)
1p status				
Normal (%)	25 (66%)	6 (54%)	25 (47%)	56 (55%)
Deleted (%)	2 (5%)	1 (9%)	14 (26%)	17 (17%)
Imbalance (%)	3 (8%)	1 (9%)	2 (4%)	6 (6%)
Not determined (%)	8 (21%)	3 (27%)	12 (23%)	23 (22%)
Relapse (months)				
Median	5.2	6.9	13.9	11.2
Range	5.2–5.2	5.3–7.1	1.5–22	1.5–22
Type of relapse				
Local	0	1	3	4
Metastatic	1	0	1	2
Local + metastatic	0	2	1	3
Not informed	0	0	2	2
Exitus (months)				
Median			11	11

Table 1 continued

Characteristic	INSS stage			Total
	1	2	3	
Range			0.4–24	0.4–24
Exitus cause				
Disease progression	0	0	11	11
Surgical complication	0	0	1	1
Other	0	0	1	1
Time of follow-up				
Median	36	28	26	30
Range	0.7–84	5.8–70	0.4–89	0.7–89

Table 2 Minimal disease detection in peripheral blood and bone marrow samples from the 102 patients with non-metastatic neuroblastoma

	Peripheral blood			Bone marrow		
	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 1	Stage 2	Stage 3
DCX+ (%)	4 (13%)	0 (0%)	9 (21%)	5 (15%)	1 (9%)	14 (29%)
TH+ (%)	5 (17%)	1 (12%)	5 (12%)	4 (12%)	1 (9%)	10 (20%)
DCX+ TH+ (%)	1 (3%)	0 (%)	4 (9%)	2 (6%)	0 (0%)	8 (16%)
Patients with positive samples	8 (27%)	1 (12%)	10 (23%)	6 (18%)	2 (18%)	6 (33%)
Total samples	30	8	43	34	11	49
Total patients	38	11	53	38	11	53

We obtain at least one sample per patient

not, the MD markers in PB. We did the analysis also separating patients by stage. Neither did we find significant differences in OS or in EFS in stages 1–2 depending on MD detection or not. In stage 3 patients, however, we found that cases with MD detected in PB showed lower EFS than patients without MD in PB (Fig. 2). These results were very close to be significant ($P = 0.057$).

We studied the prognostic impact of unfavourable histology, age at diagnosis, MYCNA and 1p deletion in our series. Except for age at diagnosis, survival analyses revealed that patients with those risk factors showed significant lower OS and EFS than patients with favourable histology, no MYCNA and undeleted 1p chromosome, as expected (Fig 3). Patients older than 18 months showed a tendency of bad outcome in EFS but the differences were not statistically significant ($P = 0.08$).

The presence of MD at diagnosis and the previously mentioned risk factors were also analysed in our series. Out of 5 patients with MD detected in PB, 3 did not have any of the studied risk factors. Two cases showed deleted 1p chromosome and MYCN amplification, and one of them, older than 18 months, presented unfavourable histology. Regarding the 10 patients with MD detected in BM, 8 were younger than 18 months and presented normal MYCN

status. MYCNA was detected in 2 patients. Also, 2 showed deleted 1p chromosome and imbalance 1p chromosome. Furthermore, five patients had unfavourable histology, and one patient presented the 4 studied risk factors. We could not establish an association between MD detection and the presence or not of the above-mentioned risk factors, due to the small number of localized NB patients with MD at diagnosis.

Discussion

Regarding localized NB, the identification of cases that require special attention is still difficult. *MYCN* amplification, deletion of chromosome arm 1p and recently 11q are well documented as recognized biological risk factors, but there are cases without such risk factors with a bad outcome. MD and MRD detection in outcome prediction seems to be important in advanced NB, but there are not many studies focused on patients with non-metastatic disease.

In the present study, we analysed the impact of the MD detection in PB and BM from localized patients with NB at diagnosis using QRT-PCR. All BM were previously

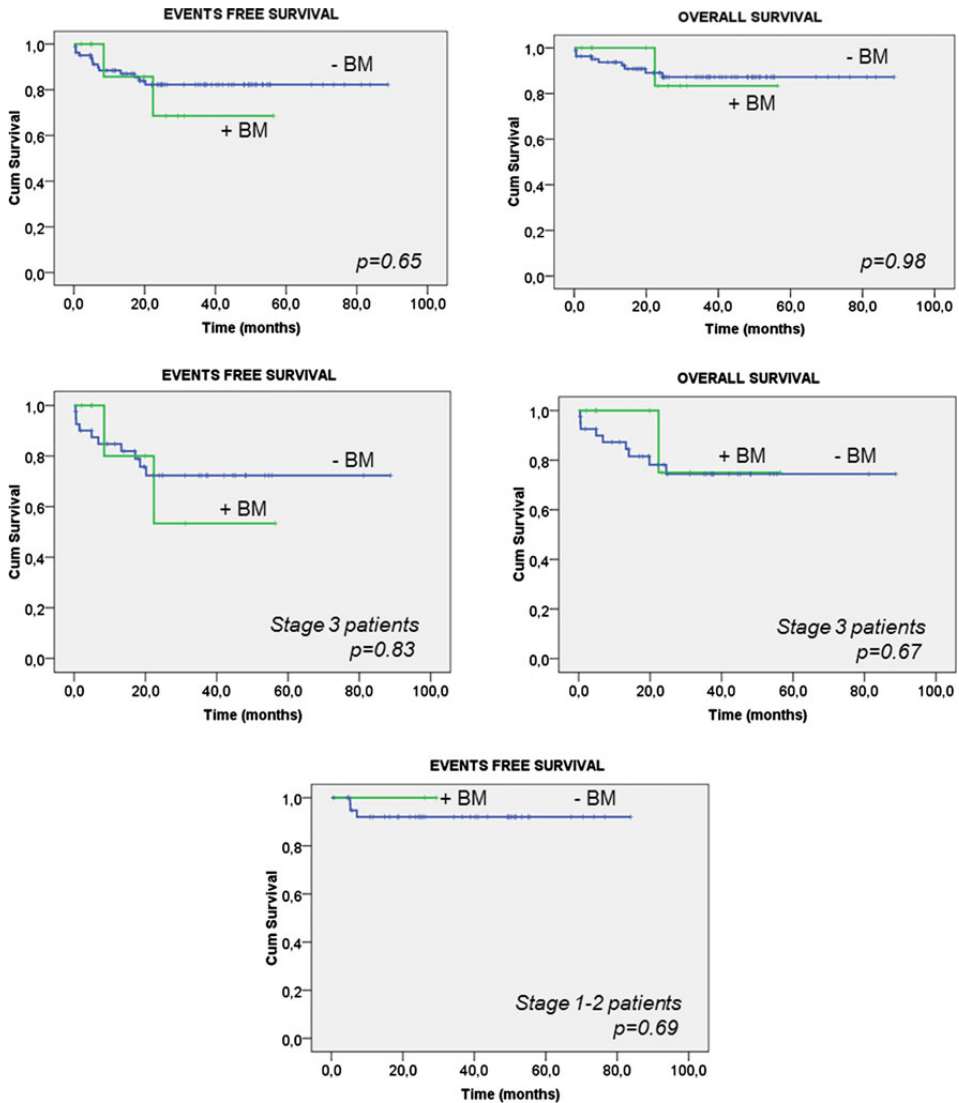


Fig. 1 Effects on survival of bone marrow status at diagnosis. *Upper panels* correspond to the analysis of the 102 patients with non-metastatic neuroblastoma and lower ones separating patients by stages

analysed by cytological screening and were negative at diagnosis. However, this technique has limited sensitivity and is unable to reliably detect MD (Cheung et al. 1997). We detected MD in PB samples from 5 patients (one stage 1 (3%), none stage 2 (0%) and four stage 3 patients (9%)). In addition, 10 patients presented positive BM samples (two stage 1 (6%), none stage 2 (0%) and eight stage 3 patients (16%)) Positive samples were considered when

both MD markers were detected, taking into account that TH may be also present in some T-lymphocytes (Cosentino et al. 2007) and lead to false positivity.

The low relapse rates observed in our series fit well with those expected in patients with localized disease (De Bernardi et al. 2008). According to our results, TH and DCX mRNA detection in PB of children with localized disease at diagnosis predicts relapse probabilities, reflecting the

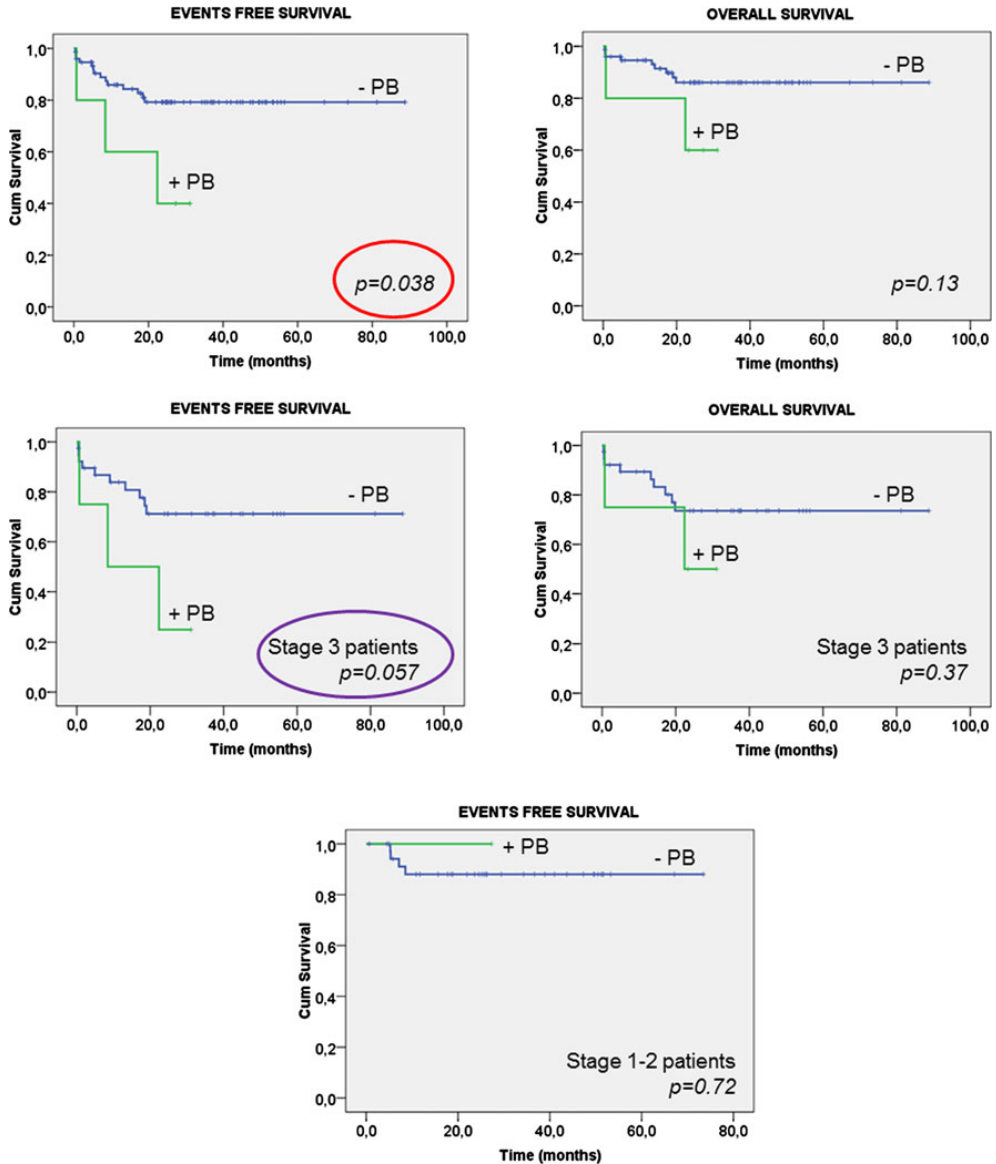


Fig. 2 Effects on survival of peripheral blood status at diagnosis. *Upper panels* correspond to the analysis of the 102 patients with non-metastatic neuroblastoma and lower ones separating patients by stages

propensity of dissemination via bloodstream. When we divided our series into stages 1–2 and stage 3 groups, there was a tendency of bad outcome in stage 3 patients with the MD biomarkers detected in PB. This situation is very close to be statistically significant, so we considered that increasing the number of analysed patients will clarify that MD detection by QRT–PCR in PB from stage 3 patients is helpful to predict patient outcome.

Concerning the stages 1–2 cases, we only studied the relapse risk based on the MD detection. Some groups have found in long-term follow-up of children with stages 1 and 2 NB high survival rates and a small proportion with local recurrence (Perez et al. 2000; De Bernardi et al. 2008). We reached the same conclusion, and even though some of them have relapsed, all are currently alive. MD was detected in a small percentage of our stages 1 and 2

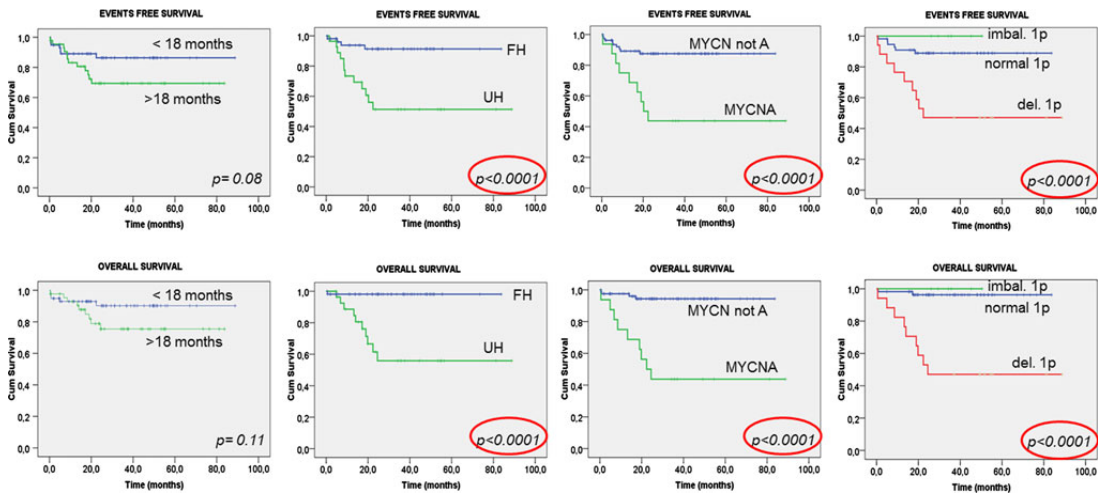


Fig. 3 Effects on survival of age at diagnosis, histology, MYCN amplification and 1p chromosome status of the 102 patients with non-metastatic neuroblastoma. <18 months: patients younger than 18 months, >18 months: patients older than 18 months, FH

favourable histology, UH unfavourable histology, MYCNA MYCN amplification, MYCN not A MYCN not amplified, normal 1p: normal 1p chromosome, imbal. 1p: imbalanced 1p chromosome, del.1p: deleted 1p chromosome

patients with NB, and no correlation between MD detection and outcome was found, suggesting that for this group MD studies are non-contributory for predicting patient outcome.

Positive results previously obtained by immunocytochemistry (IC) in BM and PB samples at diagnosis from stages 1, 2 and 3 patients correlated with unfavourable outcome (Corrias et al. 2004; Corrias et al. 2008). With respect to stage 4 patients, TH mRNA detected in PB at diagnosis has been described as a poor prognostic indicator (Gleeson et al. 1999; Reynolds 2004). In addition, high transcript concentration of TH and other MRD markers in PB and BM at diagnosis have been associated with poor prognosis in patients with NB. In particular, TH in BM above median indicated worse outcome for a homogenous cohort with HR-NB (Träger et al. 2008).

It is worth mentioning the fact that only the MD detection in PB and not in BM samples showed this putative influence on survival. The use of PB and not BM samples for the study is an additional advantage, considering that patient will not be exposed to an invasive technique. Many evidences have shown that the presence of circulating tumour cells in the PB of patients with solid tumours correlates with clinical outcome (Steen et al. 2008; Bozionellou et al. 2004). However, some results are in conflict, and for this reason, the biological significance of circulating tumour cells and the clinical relevance of their detection are still unclear. These cells may generate metastatic deposits, depending on the expression of the appropriate molecules, or die by apoptotic mechanisms. Tumours present genetically heterogeneous cell

subpopulations with different metastatic potential, so the presence of these circulating tumour cells is necessary, but not sufficient for the metastasis development (Mocellin et al. 2006).

On the other hand, we also confirm in our series that localized NB patients with unfavourable histology, MYCNA or 1p deletion showed significant lower OS and EFS than patients without those risk factors. Due to the heterogeneity of this neuroblastic tumour, only the combination of clinical and biological factors can explain the tumour behaviour.

In conclusion, MD detection in PB at diagnosis seems to be useful for predicting relapse probabilities in patients with non-metastatic NB. Stages 1 and 2 patients with NB showed high survival rates, and the MD markers were detected in a small number of patients probably being non-contributory for predicting patient outcome. For stage 3 patients with NB, MD detection by QRT-PCR in PB at diagnosis could be useful for predicting outcome and for early and sensitive detection of relapsing disease. QRT-PCR is a sensitive, easy and not expensive method for the detection of MD. However, in order to use a uniform methodology for analysis and reporting, we recommend performing the study of MD in PB from stage 3 patients with NB at diagnosis in a reference laboratory and to include this into an international study protocol. In this group of patients, the study of MD in PB at different time points of evolution/treatment could be another interesting challenge.

Acknowledgments We thank Désirée Ramal for her help in the data management and all the Spanish collaborating hospitals who register their patients. This work was supported in part by: *FIS PS09/02323*, *FIS PS02/0315* and *CancerCare Foundation*.

References

- Ambros IM, Benard J, Boavida M, Bown N, Caron H, Combaret V, Couturier J, Darnfors C, Delattre O, Freeman-Edward J, Gambini C, Gross N, Hattinger CM, Luegmayer A, Lunec J, Martinsson T, Mazzocco K, Navarro S, Noguera R, O'Neill S, Potschger U, Rumpfer S, Speleman F, Tonini GP, Valent A, Van Roy N, Amann G, De Bernardi B, Kogner P, Ladenstein R, Michon J, Pearson AD, Ambros PF (2003) Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification. *J Clin Oncol* 21(11):2077–2084
- Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M et al (2004) Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 10(24):8185–8194
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM (1984) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224:1121–1124
- Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, Berthold F, Castleberry RP, D'Angio G, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Freeman AI, Haase G, Hartmann O, Hayes FA, Helson L, Kemshead J, Lampert F, Ninane J, Ohkawa H, Philip T, Pinkerton CR, Pritchard J, Sawada T, Siegel S, Smith EI, Tsuchida Y, Voute PA (1988) International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 6:1874–1881
- Brodeur GM, Maris JM (2002) Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG (eds) Principles and practice of paediatric oncology, 4th edn. JB. Lippincott Co., Philadelphia, pp 895–938
- Burchill SA, Lewis IJ, Abrams KR et al (2001) Circulating neuroblastoma cells detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA are an independent poor prognostic indicator in stage 4 neuroblastoma in children over 1 year. *J Clin Oncol* 19:1795–1801
- Burgues O, Navarro S, Noguera R, Pellin A, Ruiz A, Castel V, Llombart-Bosch A (2006) 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(4):410–420
- Caron H (1995) Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 24:215–222
- Cheung IY, Cheung NK (2001) Quantitation of marrow disease in neuroblastoma by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Cancer Res* 7:1698–1705
- Cheung NKV, Heller G, Kushner BH et al (1997) Detection of metastatic neuroblastoma in bone marrow: when is routine histology intensive? *J Clin Oncol* 15(8):2807–2817
- Christiansen H, Lampert F (1998) Tumour karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma. *Br J Cancer* 57:121–126
- Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK (2009) The international neuroblastoma risk group (INRG) classification system: an INRG task force report. *J Clin Oncol* 27:289–297
- Corrias MV, Faulkner LB, Pistorio A, Rosanda C, Callea F, Lo Piccolo MS, Scaruffi P, Marchi C, Lacitignola L, Occhino M, Gambini C, Tonini GP, Haupt R, De Bernardi B, Pistoia V, Garaventa A (2004) Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood by different techniques: accuracy and relationship with clinical features of patients. *Clin Cancer Res* 10:7978–7985
- Corrias MV, Parodi S, Haupt R, Lacitignola L, Negri F, Sementa AR, Dau D, Scuderi F, Carlini B, Bianchi M, Casale F, Faulkner L, Garaventa A (2008) Detection of GD2-positive cells in bone marrow samples and survival of patients with localised neuroblastoma. *Br J Cancer* 98(2):263–269
- Cosentino M, Fieta AM, Ferrari M, Rasini E, Bombelli R, Carcano E, Saporiti F, Meloni F, Marino F, Lecchini S (2007) Human CD4_CD25_ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood* 109:632–642
- Cotterill SJ, Pearson AD, Pritchard J, Foot AB, Roald B, Kohler JA, Imeson J (2000) Clinical prognostic factors in 1,277 patients with neuroblastoma: results of the European neuroblastoma study group 'survey' 1982–1992. *Eur J Cancer* 36:901–908
- De Bernardi B, Mosseri V, Rubie H, Castel V, Foot A, Ladenstein R, Laureys G, Beck-Popovic M, De Lacerda A et al (2008) Treatment of localised resectable neuroblastoma. results of the LNESG I study by the SIOP Europe neuroblastoma group. *Br J Cancer* 99:1027–1033
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA et al (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23:257–271
- Lambooy LH, Gidding CE, van den Heuvel LP, Hulsbergen-van de Kaa CA, Ligtenberg M, Bökkerink JP, De Abreu RA (2003) Real-time analysis of TH gene expression: a sensitive and semiquantitative marker for minimal residual disease detection of neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 9:812–819
- London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, Thorner P, Brodeur G, Maris JM, Reynolds CP, Cohn SL (2005) Evidence for an age cut-off greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the children's oncology group. *J Clin Oncol* 23(27):6459–6465
- Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, Smith EI, Brodeur GM (1991) Clinical relevance of tumour cells ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a paediatric oncology group study. *J Clin Oncol* 9:581–591
- Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D (2006) Circulating tumour cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med* 12:130–139
- Moss J, Sanders DG (1990) Detection of neuroblastoma cells in blood. *J Clin Oncol* 8:736–740
- Noguera R, Canete A, Pellin A, Ruiz A, Tasso M, Navarro S, Castel V, Llombart-Bosch A (2003) MYCN gain and MYCN amplification in a stage 4S neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 140(2):157–161
- Oltra S, Martinez F, Orellana C, Grau E, Fernandez JM, Canete A, Castel V (2005) The doublecortin gene, a new molecular marker to detect minimal residual disease in neuroblastoma. *Diagn Mol Pathol* 14(1):53–57
- Perez C, Matthay K, Atkinson J, Seeger R, Shimada H, Haase G, Stram D, Gerbing R, Lukens J (2000) Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a children's cancer group study. *J Clin Oncol* 18(1):18–26
- Reynolds CP (2004) Detection and treatment of minimal residual disease in high-risk neuroblastoma. *Pediatr Transplant* 8(Suppl 5):56–66

- Rubie H, De Bernardi B, Gerrard M, Canete A, Ladenstein R, Couturier J, Ambros P, Munzer C, Pearson AD, Garaventa A, Brock P, Castel V, Valteau-Couanet D, Holmes K, Di Cataldo A, Brichard B, Mosseri V, Marquez C, Plantaz D, Boni L, Michon J (2011) Excellent outcome with reduced treatment in infants with nonmetastatic and unresectable neuroblastoma without MYCN amplification: results of the prospective INES 99.1. *J Clin Oncol* 29(4):449–455
- Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D (1985) Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 313:1111–1116
- Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B (1999) Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the international neuroblastoma pathology committee. *Cancer* 86(2):349–363
- Spitz R, Hero B, Simon T, Berthold F (2006) Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 12(11):3368–3373
- Steen S, Nemunaitis J, Fisher T, Kuhn J (2008) Circulating tumor cells in melanoma: a review of the literature and description of a novel technique. *Bayl Univ Med Cent* 21(2):127–132
- Swartz MA, Kristensen CA, Melder RJ, Roberge S, Calautti E, Fukumura D et al (1999) Cells shed from tumours show reduced clonogenicity, resistance to apoptosis, and in vivo tumorigenicity. *Br J Cancer* 81:756–759
- Träger C, Vernby A, Kullman A, Ora I, Kogner P, Kågedal B (2008) mRNAs of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase but not of GD2 synthase are specific for neuroblastoma minimal disease and predicts outcome for children with high-risk disease when measured at diagnosis. *Int J Cancer* 123:2849–2855
- Viprey VF, Lastowska MA, Corrias MV, Swerts K, Jackson MS, Burchill SA (2008) Minimal disease monitoring by QRT-PCR: guidelines for identification and systematic validation of molecular markers prior to evaluation in prospective clinical trials. *J Pathol* 216:245–252

5.2 ARTÍCULO II

***TH* and *DCX* mRNAs in peripheral blood and bone marrow predict outcome in metastatic Neuroblastoma patients.**

Yania Yáñez, David Hervás, Elena Grau, Silvestre Oltra, Gema Pérez, Sarai Palanca, Mar Bermúdez, Catalina Márquez, Adela Cañete and Victoria Castel.

J Cancer Res Clin Oncol 2016, 142(3):573-80.

Impact Factor 2015: 3.081

TH and *DCX* mRNAs in peripheral blood and bone marrow predict outcome in metastatic neuroblastoma patients

Yania Yáñez¹ · David Hervás² · Elena Grau¹ · Silvestre Oltra³ · Gema Pérez⁴ · Sarai Palanca⁴ · Mar Bermúdez⁵ · Catalina Márquez⁶ · Adela Cañete¹ · Victoria Castel¹

Received: 5 June 2015 / Accepted: 9 October 2015 / Published online: 24 October 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract

Purpose In metastatic neuroblastoma (NB) patients, accurate risk stratification and disease monitoring would reduce relapse probabilities. This study aims to evaluate the independent prognostic significance of detecting tyrosine hydroxylase (*TH*) and doublecortin (*DCX*) mRNAs by reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) samples from metastatic NB patients.

Procedures RT-qPCR was performed on PB and BM samples from metastatic NB patients at diagnosis, post-induction therapy and at the end of treatment for *TH* and *DCX* mRNAs detection.

Results High levels of *TH* and *DCX* mRNAs when detected in PB and BM at diagnosis independently predicted worse outcome in a cohort of 162 metastatic NB. In the subgroup of high-risk metastatic NB, *TH* mRNA detected in PB remained as independent predictor of EFS and OS at diagnosis. After the induction therapy, high levels of *TH* mRNA in PB and *DCX* mRNA in BM independently

predicted poor EFS and OS. Furthermore *TH* mRNA when detected in BM predicted worse EFS. *TH* mRNA in PB samples at the end of treatment is an independent predictor of worse outcome.

Conclusion *TH* and *DCX* mRNAs levels in PB and BM assessed by RT-qPCR should be considered in new pre-treatment risk stratification strategies to reliably estimate outcome differences in metastatic NB patients. In those high-risk metastatic NB, *TH* and *DCX* mRNA quantification could be used for the assessment of response to treatment and for early detection of progressive disease or relapses.

Keywords Neuroblastoma · Minimal residual disease · Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) · *TH* · *DCX*

Introduction

Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumor in childhood, and it is characterized by a heterogeneous clinical presentation and outcome. Age (London et al. 2005), stage (Monclair et al. 2009), pathology (Shimada et al. 1999) and some biological tumor characteristics (Brodeur et al. 1984; Spiltz et al. 2006; Lampert et al. 1988; Look et al. 1991) are the most important prognostic factors. Nearly 50 % of all NB cases present metastatic disease and the majority of those children have dissemination in bone marrow (BM). Following the International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) guidelines, metastatic tumors are defined as stage M (defined as distant metastatic disease), except for stage MS, in which metastases are confined to the skin, liver, and/or bone marrow in children younger than

✉ Yania Yáñez
yaniez_yan@gva.es

¹ Unidad de Oncología Pediátrica, Hospital La Fe, Avda. Fernando Abril Martorell, 106, 46026 Valencia, Spain

² Unidad de Bioestadística, Hospital La Fe, Valencia, Spain

³ Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital La Fe, Valencia, Spain

⁴ Laboratorio de Biología Molecular, Hospital La Fe, Valencia, Spain

⁵ Servicio de Oncología Pediátrica, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

⁶ Servicio de Oncología Pediátrica, Hospital Virgen del Rocío, Seville, Spain

18 months of age (Monclair et al. 2009). In Spain, metastatic NB patients (either M or MS with *MYCN* amplification (*MYCNA*) and/or older than 1 year at diagnosis) are currently treated according to the SIOPEN High-Risk Protocol. The treatment schedule includes induction chemotherapy, surgery, myeloablative chemotherapy followed by autologous stem cell reinfusion, radiotherapy and biological-based therapy for minimal residual disease with 13-cis-retinoic acid and anti-GD2 immunotherapy with or without cytokines. Nevertheless, almost 50 % of these patients still have very poor outcome.

Treatment for intermediate-risk metastatic NBs (stage M, younger than 12 months and without *MYCNA*) consists in standard chemotherapy and surgery. Low-risk metastatic patients (MS without *MYCNA*) are treated with standard chemotherapy with or without surgery and in some cases are only observed since spontaneous regression is a hallmark of this subgroup. Despite high survival rates being described for both subgroups, some of these patients die of disease reinforcing thus the importance of accurate pre-treatment risk stratification strategies.

Prognostic and early response biomarkers are of particular relevance in disease assessment and clinical management of NB patients. In the last decades, many efforts have been made in order to best identify the presence of NB cells in peripheral blood (PB) and BM samples. Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) is a sensitive and widespread used technique to detect tumor-specific mRNAs as markers of circulating tumor cells (Burchill et al. 2001; Corrias et al. 2004; Viprey et al. 2014). Several groups have studied the specificity and predictive value of large number of mRNAs (Stutterheim et al. 2008; Cheung et al. 2008; Träger et al. 2008). Since catecholamines are produced by NB cells, *tyrosine hydroxylase* (*TH*), the first enzyme in the catecholamines synthesis pathway, is one of the most rigorously evaluated targets for minimal residual disease (MRD) detection in NB (Burchill et al. 2001). *Doublecortin* (*DCX*) gene is specifically expressed in migrating neurons from the central and peripheral nervous system and has been also identified as a sensitive and specific MRD biomarker (Oltra et al. 2005; Viprey et al. 2014).

Several studies have previously demonstrated the negative effect on survival of MRD detection in NB patients. However, few studies have performed multivariable analyses to confirm the independent significance of the mRNAs detection in PB and BM (Viprey et al. 2014; Cheung et al. 2015). The present study aims to evaluate the prognostic and predictive significance of *TH* and *DCX* mRNAs in PB and BM from patients with metastatic NB.

Materials and methods

Patients and samples

The present prospective study consists of 162 metastatic NB patients from the cooperating Spanish hospitals that treat children with NB. Staging and risk stratification was established according to INRGSS (Monclair et al. 2009). Samples of fresh or frozen tumor were referred to the Spanish reference center for pathology and molecular biology NB studies. Samples were centrally reviewed and classified according to the International Neuroblastoma Pathology Committee (INPC) system (Shimada et al. 1999; Burgues et al. 2006). Biological studies included status of *MYCN* and 1p, both studied by FISH according to ENQUA guidelines (Noguera et al. 2003; Ambros et al. 2003). Patients were included in national and European studies (INES, LINES, NAR99 and HR-NBL1). Two BM aspirations and two biopsies were performed on routine at diagnosis in all NB cases. All BM were previously analyzed by cytological and histological screening according to standard procedures. The MRD studies were centrally performed at the Spanish NB MRD reference laboratory and for these purpose 2 ml of PB and 0.5 ml of BM were collected in EDTA Vacutainer tubes (BD, UK). All patients had at least one sample, and most of them had both PB and BM. 35 PB and 7 BM samples from healthy donors were assessed as negative controls. Informed consent for samples and data management was obtained in all cases from patients' parents.

Total RNA extraction

Ficoll gradient centrifugation was used to isolate mononuclear cells from BM and PB specimens (Lymphoprep AXIS-SHIELD PoC AS). Once purified, mononuclear cells were lysed in a buffer containing guanidinium thiocyanate and immediately stored at -80°C . Total RNA was isolated using the RNeasy kit (Qiagen) and following the manufacturer's recommendations.

Retro-transcription (RT)

cDNA was synthesized reverse transcribing 1.2 μg RNA in 60 μL total reaction volume using random hexamers-primers and reagents contained in the TaqMan Gold RT-PCR kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA USA). RT was carried out for 30 min at 48°C , followed by RT inactivation for 5 min at 95°C .

Real-time quantitative PCR

RT qPCR for gene expression was performed using specific primers and TaqMan MGB probes for *TH* and *DCX* mRNAs. *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)* gene served as the endogenous control. Three replicates of each sample were amplified. The PCR mixtures were run in Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System instrument using universal thermal cycling parameters. The normalization was performed by obtaining the Δ CT values in the following way: the mean CT for the marker gene (*TH* or *DCX*) was subtracted by the mean CT of *GAPDH* (Δ CT = CT [Marker]-CT [*GAPDH*]). Protocol details as well as the assays references are previously described (Yáñez et al. 2011). Samples were considered positive if at least two of the three CT values for each marker were lower than 40.

Statistical analyses

Data were summarized using the median for continuous variables and relative frequencies for categorical variables. Correlations between *TH* and *DCX* mRNAs expression values were assessed using Spearman correlation. *TH* and *DCX* values were standardized for univariable and multivariable analyses. Univariable overall survival (OS) and event-free survival (EFS) analyses at diagnosis, after induction therapy and at the end of treatment were performed for each marker in both PB and BM using Cox proportional hazards regression. To assess the independent association of markers with survival, Cox proportional hazard regression models were adjusted including *MYCN* status, stage and age at diagnosis. Since the levels of *TH* and *DCX* mRNA were highly correlated, they could not be included in the same model due multicollinearity. Thus, four models were adjusted for each survival analysis performed. Akaike information criterion (AIC) (Sakamoto et al. 1986) was used to assess which model was the best in each case (lower AIC values meaning better models). Differences in AIC values among models were expressed as Δ AIC (AIC Model 1—AIC Model 2). *p* values <0.05 were considered statistically significant. All analyses and graphs were performed using R (version 3.1.2). For EFS, time to event was defined as the time from diagnosis until the time of first occurrence of relapse, progression or death. For OS, time to event was defined as time until death or until last contact if the patient was alive.

Results

Patients' characteristics

One hundred and sixty two children with metastatic NB tumors were studied, 146 stage M and 16 stage MS. The

median follow-up time was of 42.9 months. Most of the patients presented abdominal or adrenal primary tumors and 64 % had BM metastasis at diagnosis. 73 % of patients were older than 12 months at the time of diagnosis. *MYCN* status was obtained from 95 % of patients, of these, 34 % had *MYCN* amplified tumors. Clinical and biological data are summarized in Table 1.

For the analysis of *TH* and *DCX* mRNA expression at diagnosis, we included not only high-risk metastatic NB patients but also low and intermediate metastatic NB patients (MS patients without *MYCN* amplification and M patients younger than 12 months and without *MYCN* amplification). BM and PB samples were collected from 116 and 101 patients respectively at diagnosis, 81 and 57 after induction therapy, and 36 BM and 33 PB at the end of treatment.

TH and *DCX* mRNAs in PB and BM at diagnosis

The frequency of detection of *TH* and *DCX* mRNAs in PB and BM at diagnosis is detailed in Table 2. A high correlation between both markers was found; in PB the correlation was $\rho = 0.72$ (CI = 0.58–0.83) and in BM $\rho = 0.92$ (CI = 0.86–0.94). The level of *TH* and *DCX* mRNAs in PB and BM and the median expression is represented in Fig. 1a. The median level of expression was higher in BM samples than in PB samples. Univariable analyses revealed that high levels of *TH* and *DCX* mRNAs in PB significantly associated with OS and EFS ($p = 0.006$ and $p = 0.006$ for *TH*; $p = 0.017$ and 0.021 , respectively, for *DCX*). Additionally, high levels of *DCX* mRNA but not *TH* mRNA in BM samples were significantly associated with OS and EFS ($p = 0.005$ and $p = 0.004$, respectively). Further multivariable analysis taking into account age at diagnosis, *MYCN* status and stage, demonstrated that, at the time of diagnosis, high levels of *TH* and *DCX* mRNAs in PB are significant independent predictors of EFS and OS (Table 3a; Fig. 2). In BM, high levels of *DCX* mRNA but not *TH* independently predicted worse OS and EFS (Table 3a). Noteworthy, *TH* mRNA had greater predictive capacity than *DCX* mRNA when applied the AKAIKE criteria in the multivariable models (Δ AIC = 1.35). Univariable and multivariable analyses were also performed in the group of high-risk metastatic NB patient. Only *TH* mRNA in PB remained as independent predictor of poor OS and EFS (Table 3b).

TH and *DCX* mRNAs in PB and BM post induction therapy

MRD monitoring after induction therapy was performed for high-risk metastatic NB patients. Frequencies of detection of *TH* and *DCX* mRNAs as well as the

Table 1 Overview of the 162 metastatic neuroblastoma patients included in the study

Characteristics	INRG staging system		
	M	MS	Total
Number of patients	146	16	162
Pre-treatment risk group			
Low	0	14	14
Intermediate	20	0	20
High	126	2	128
Age at diagnosis in months			
Median	36.7	5.3	33.8
Range	2.0–267	0.2–13.6	0.2–267
Sex			
Female	57	9	66
Male	89	7	96
Primary site			
Adrenal	57	11	68
Abdominal	62	4	66
Cervical	2	0	2
Thoracic	9	0	9
Cervical-thoracic	2	0	2
Thoracic-abdominal	4	1	5
Cervical-thoracic-abdominal	1	0	1
Abdominal-pelvic	2	0	2
Pelvic	3	0	3
Intracranial	1	0	1
No primary tumor	2	0	2
Unknown	1	0	1
BM metastasis at diagnosis	103	2	105
MYCN status			
Amplified (%)	50 (34.2 %)	2 (12.5 %)	52 (32.1 %)
Not amplified (%)	89 (61 %)	13 (81.25 %)	102 (63 %)
Not informed	7 (4.8 %)	1 (6.25 %)	8 (4.9 %)
Patients with relapse (%)	86 (58.9%)	3 (18.75 %)	89 (54.9 %)
Dead (%)	79 (54.1 %)	1 (6.25 %)	80 (49.4 %)
Median follow-up time (months)	41.3	62.8	42.9

Table 2 Frequencies of detection of *TH* and *DCX* mRNAs in peripheral blood and bone marrow at diagnosis, after induction therapy and at the end of treatment

	Diagnosis		End of induction		End of treatment	
	PB	BM	PB	BM	PB	BM
Frequency of detection (%)						
<i>TH</i> mRNA	70.3	84.5	10.5	44.4	21.2	30.6
<i>DCX</i> mRNA	68.3	87.9	8.8	39.5	12.1	19.4

median expression levels of both markers are shown in Table 2 and Fig. 1b correspondingly. Univariable analyses showed that *TH* mRNA but not *DCX* when detected in PB predicted worse OS and EFS ($p = 0.003$ and $p = 0.04$ respectively). In BM only *DCX* mRNA but not *TH* mRNA was significantly associated with EFS ($p = 0.008$). The

multivariable model included *MYCN* status and age at diagnosis in addition to the *TH* and *DCX* mRNA presence in PB and BM. *TH* mRNA in PB and *DCX* mRNA in BM independently predicted worse OS and EFS. Furthermore, *TH* mRNA when detected in BM predicted poor EFS (Table 3c).

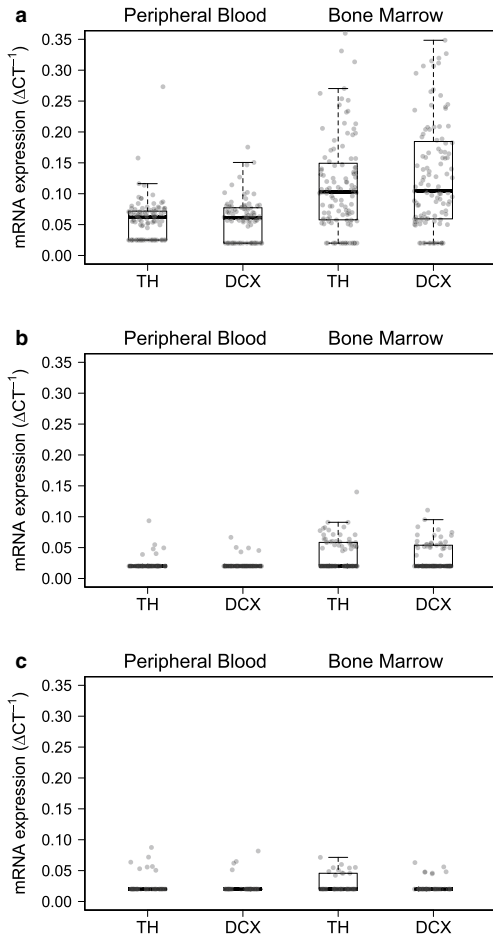


Fig. 1 Levels of *TH* and *DCX* mRNAs in peripheral blood and bone marrow aspirates of metastatic neuroblastoma children: **a** at diagnosis, **b** after induction therapy and **c** at the end of treatment

***TH* and *DCX* mRNAs in PB and BM at the end of treatment**

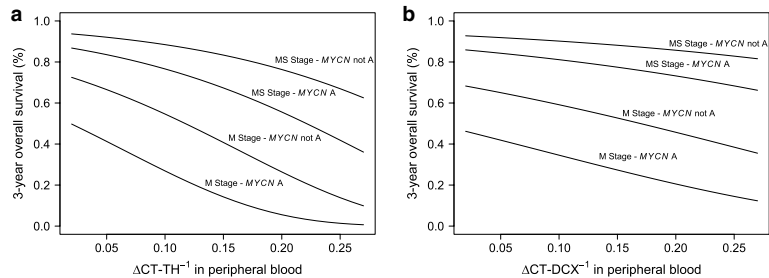
Frequencies of detection and the median expression levels for both markers in PB and BM samples at the end of treatment are detailed in Table 2 and Fig. 1c. Despite the reduced number of samples studied, univariable analyses revealed that *TH* mRNA when detected in PB and *DCX* mRNA when detected in BM associated with worse EFS and OS ($p = 0.011$ and $p = 0.004$ for *TH*, $p = 0.033$ and $p = 0.04$ for *DCX*, respectively). *DCX* mRNA in PB was also predictive of EFS ($p = 0.003$). Multivariable models

Table 3 Event-free survival and overall survival predicted by the levels of *TH* and *DCX* mRNAs in PB and BM at diagnosis, after induction therapy and at the end of treatment

Variable	HR	95 % CI	<i>p</i> value
<i>(a) Multivariable model adjusted for age, MYCN and stage in the cohort of metastatic NB at diagnosis</i>			
Event-free survival			
<i>TH</i> mRNA in PB	1.3	[1.1, 1.5]	0.003
<i>DCX</i> mRNA in PB	1.2	[1.0, 1.3]	0.025
<i>TH</i> mRNA in BM	1.1	[1.0, 1.3]	0.06
<i>DCX</i> mRNA in BM	1.2	[1.0, 1.5]	0.04
Overall survival			
<i>TH</i> mRNA in PB	1.3	[1.1, 1.5]	0.004
<i>DCX</i> mRNA in PB	1.2	[1.0, 1.4]	0.01
<i>TH</i> mRNA in BM	1.1	[1.0, 1.3]	0.054
<i>DCX</i> mRNA in BM	1.3	[1.0, 1.5]	0.025
<i>(b) Multivariable model adjusted for age and MYCN in high-risk NB at diagnosis</i>			
Event-free survival			
<i>TH</i> mRNA in PB	1.2	[1.0, 1.5]	0.015
<i>DCX</i> mRNA in PB	1.1	[1.0, 1.3]	0.11
<i>TH</i> mRNA in BM	1.1	[0.9, 1.2]	0.31
<i>DCX</i> mRNA in BM	1.1	[0.9, 1.4]	0.17
Overall survival			
<i>TH</i> mRNA in PB	1.3	[1.1, 1.5]	0.01
<i>DCX</i> mRNA in PB	1.2	[1.0, 1.3]	0.053
<i>TH</i> mRNA in BM	1.1	[0.9, 1.2]	0.29
<i>DCX</i> mRNA in BM	1.2	[1.0, 1.5]	0.12
<i>(c) Multivariable model adjusted for age and MYCN in high-risk NB after induction therapy</i>			
Event-free survival			
<i>TH</i> mRNA in PB	2.7	[1.0, 7.3]	0.047
<i>DCX</i> mRNA in PB	2.4	[0.5, 11.6]	0.27
<i>TH</i> mRNA in BM	3.9	[1.2, 13.1]	0.026
<i>DCX</i> mRNA in BM	5.2	[1.6, 17.3]	0.007
Overall survival			
<i>TH</i> mRNA in PB	3.5	[1.3, 9.4]	0.013
<i>DCX</i> mRNA in PB	2.4	[0.5, 11.6]	0.27
<i>TH</i> mRNA in BM	3.6	[1.0, 13.3]	0.052
<i>DCX</i> mRNA in BM	3.6	[1.1, 4.2]	0.035
<i>(d) Multivariable model adjusted for age and MYCN in high-risk NB at the end of treatment</i>			
Event-free survival			
<i>TH</i> mRNA in PB	2.4	[1.0, 5.7]	0.056
<i>DCX</i> mRNA in PB	3.4	[1.0, 11.6]	0.055
<i>TH</i> mRNA in BM	0.9	[0.02, 41.5]	0.98
<i>DCX</i> mRNA in BM	1.7	[0.03, 82.9]	0.79
Overall survival			
<i>TH</i> mRNA in PB	3.2	[1.2, 8.8]	0.026
<i>DCX</i> mRNA in PB	2.2	[0.5, 9.9]	0.31
<i>TH</i> mRNA in BM	0.06	[0, 6.9]	0.25
<i>DCX</i> mRNA in BM	2.8	[0.06, 132.1]	0.60

Statistically significant *p*-values are indicated in bold
PB peripheral blood, *BM* bone marrow, *HR* hazard ratio

Fig. 2 Three-year overall survival graphs representing the prognostic impact of *TH* mRNA **a** and *DCX* mRNA detection **b** in peripheral blood from metastatic NB patients considering stage and *MYCN* status



including the previously mentioned risk factors demonstrated that only *TH* mRNA when detected in PB remained as an independent predictor of adverse outcome (Table 3d).

Discussion

RT- qPCR has shown tremendous potential for detecting MRD in PB and BM from NB patients (Viprey et al. 2014; Stutterheim et al. 2011; Cheung et al. 2003). However, the proof of the clinical utility of the mRNAs detection has been limited by several factors. An important one has been the small number of samples investigated at the scheduled time points for disease evaluation. Another significant factor has been the lack of multivariable analysis to assess the independent significance of MRD detection. The majority of previous studies have focused on high-risk metastatic NB patients. This approach has helped identify children with ultrahigh-risk disease who may benefit from new treatment strategies (Viprey et al. 2014). However, this approach does not take into consideration low and intermediate metastatic NB patients at the time of diagnosis. Since in the group of low and intermediate metastatic NB there are a percentage of patients who die of disease, it is also important to identify such group to treat them more accurately. In our study we analyzed a cohort of metastatic NB patients without previously stratifying by risk factors. The levels of *TH* and *DCX* mRNAs when detected in PB and BM independently predicted worse EFS and OS. Given the heterogeneity of the metastatic NB group, considering the mRNA levels in new pre-treatment risk stratification strategies would help predict outcome differences and identify children for whom current treatment is failing or insufficient. In low and intermediate metastatic NB, the study of MRD at different time points of evolution/treatment could be another interesting challenge.

TH and *DCX* mRNAs are not 100 % specific biomarkers for NB cell detection since low levels of expression have been detected in hematopoietic cells and in PB from healthy donors (Kuçi et al. 2006; Corrias et al. 2012; Hartomo

et al. 2012). In order to address the issue of the illegitimate expression of the NB mRNAs, previous multicenter international studies have established cut points for data analyses with a threshold beyond which the mRNAs most reliably predict worse EFS and OS (Viprey et al. 2014). Medical researchers often converted continuous variables into categorical variables by grouping values into two or more categories. The simplicity achieved may cause considerable loss of power and residual confounding if categorization is applied to the original prognostic variables (Royston et al. 2006). Under our experimental conditions, we have not detected *TH* neither *DCX* mRNAs in PB and BM samples from healthy donors. In this study the *TH* and *DCX* mRNA levels were considered continuous variables. We assessed the expected continuous relationship between increasing levels of *TH* and *DCX* mRNAs and an increasing risk of events. This also allowed us to address the problem of illegitimate expression: patients with low mRNA levels have a lower risk of events than patients with higher mRNA levels.

TH is the most rigorously evaluated and most used target for the detection of disease in PB and BM from children with NB. There are some important factors to take into consideration when analyzing the *TH* expression. One relevant factor is that hematopoietic cells can also produce, metabolize and take up catecholamines. This means that discriminating hematopoietic cells from NB cells by detecting *TH* mRNA is not as precise as desired, since low expression levels of *TH* have been detected in hematopoietic cells. In addition, an inverse correlation of noradrenaline transporter and *TH* expression has been described (Lode et al. 1995). Metaiodobenzylguanidine (MIBG) is accumulated in the NB cell by the noradrenaline transporter. Thus, it is possible that NBs with high MIBG uptake may express very low levels of *TH*, perhaps even undetectable by RT-qPCR. Testing multiple targets for MRD detection may increase sensitivity and specificity and also overcome the heterogeneity of the NB cells.

In the subgroup of high-risk metastatic NB patients, we found that high levels of *TH* mRNA in PB independently

predicted worse outcome when detected at diagnosis, post-induction therapy and at the end of treatment. The use of PB and not BM samples for the study is an additional advantage taking into consideration that patients will not be exposed to an invasive technique. Our results at diagnosis agree with some previously published reports (Viprey et al. 2014; Burchill et al. 2001; Träger et al. 2008).

After induction therapy, *TH* and *DCX* mRNAs when detected in BM independently predicted worse outcome in high-risk metastatic NB patients. Additionally, *TH* mRNA when detected in PB is an independent predictor of poor EFS and OS. Viprey et al. have previously described that high levels of these mRNAs predicted worse EFS and OS in BM but not in PB. The methodological differences between the two studies could be the principal reason for such discrepancy. Sensitivity limitations of cytological screening for accurate detection of disease in BM reinforce the importance of the mRNAs assessment by RT-qPCR to evaluate the effectiveness of the induction chemotherapy. Additional alternative treatment should be considered for children with insufficient molecular response to treatment at this time point.

The study of the MRD at the end of treatment was carried out with fewer samples as compared to the one used during diagnostics. The decrease in the number of samples is in part a result of the evolution of the disease, that is, the patients die before reaching the end of treatment. Prospective multicenter collaborative studies with larger cohorts of patients are needed to determine the clinical relevance of the mRNAs detection at the end of treatment. To the best of our knowledge, we described here for the first time that *TH* mRNA when detected in PB at the end of treatment is an independent predictor of worse outcome. Circulating tumor cells detected at the end of treatment could generate metastases or die by apoptotic mechanisms induced by the maintenance therapy. Considering the low survival rates of metastatic NB who relapse or progress, new maintenance treatment strategies should be contemplated for this patient population based on the true remission status. Accurate detection of minimal disease, undetectable by conventional methods, would identify patients with worse outcome before the appearance of overt clinical symptoms.

RT-qPCR is a sensitive, easy and widely applicable method to objectively detect MRD in NB patients. There are very few published studies focused on MRD detection in PB and BM samples with an evolutionary focus on the different evaluation points in the disease. Sequential MRD monitoring throughout the disease course by RT-qPCR should be included as a standard method for disease evaluation using standard operating procedures for analysis and reporting.

In conclusion, *TH* and *DCX* mRNA levels in PB and BM samples assessed by RT-qPCR at diagnosis could be used to

better assign metastatic NB patients into risk groups and tailor the intensity of treatment. MRD detection in PB and BM after induction therapy has important prognostic implication for high-risk metastatic NB. When MRD is monitored at scheduled times as per protocol, it would give relevant insights into the effectiveness of treatment. Also, monitoring MRD would aid clinicians to recognize critical elements in practice such as how and when to modify treatment.

Acknowledgments We thank Désirée Ramal for her help in the data management and all the Spanish collaborating hospitals who register their patients.

Funding This work was supported in part by: FIS PS09/02323, FIS PS02/0315, Cancercare Foundation and APU Foundation.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors indicated no potential conflicts of interest.

Ethical approval The study was approved by the Hospital La Fe Ethical Committee and was performed in accordance with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent All parents or guardians signed an informed consent statement for sample and data management from all patients included in the study.

References

- Ambros IM, Benard J, Boavida M, Bown N, Caron H, Combarret V, Couturier J, Darnfors C, Delattre O, Freeman-Edward J, Gambini C, Gross N, Hattinger CM, Luegmayr A, Lunec J, Martinsson T, Mazzocco K, Navarro S, Noguera R, O'Neill S, Potschger U, Rumpfer S, Speleman F, Tonini GP, Valent A, Van Roy N, Amann G, De Bernardi B, Kogner P, Ladenstein R, Michon J, Pearson AD, Ambros PF (2003) Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification. *J Clin Oncol* 21(11):2077–2084
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM (1984) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224:1121–1124
- Burchill SA, Lewis IJ, Abrams KR et al (2001) Circulating neuroblastoma cells detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA are an independent poor prognostic indicator in stage 4 neuroblastoma in children over 1 year. *J Clin Oncol* 19:1795–1801
- Burgues O, Navarro S, Noguera R, Pellin A, Ruiz A, Castel V, Llombart-Bosch A (2006) 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(4):410–420
- Cheung IY, Lo Piccolo MS, Kushner BH et al (2003) Early molecular response of marrow disease to biologic therapy is highly prognostic in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 21:3853–3858
- Cheung IY, Feng Y, Gerald W et al (2008) Exploiting gene expression profiling to identify novel minimal residual disease markers of neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 14:7020–7027

- Cheung NK, Ostrovnyaya I, Kuk D, Cheung IY (2015) Bone marrow minimal residual disease was an early response marker and a consistent independent predictor of survival after anti-GD2 immunotherapy. *J Clin Oncol* 33(7):755–763
- Corrias MV, Faulkner LB, Pistorio A, Rosanda C, Callea F, Lo Piccolo MS, Scaruffi P, Marchi C, Lacitignola L, Occhino M, Gambini C, Tonini GP, Haupt R, De Bernardi B, Pistoia V, Garaventa A (2004) Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood by different techniques: accuracy and relationship with clinical features of patients. *Clin Cancer Res* 10:7978–7985
- Corrias MV, Haupt R, Carlini B, Cappelli E, Giardino S, Tripodi G, Tonini GP, Garaventa A, Pistoia V, Pistorio A (2012) Multiple target molecular monitoring of bone marrow and peripheral blood samples from patients with localized neuroblastoma and healthy donors. *Pediatr Blood Cancer* 58(1):43–49
- Hartomo TB, Kozaki A, Hasegawa D, Van Huyen Pham T, Yamamoto N, Saitoh A, Ishida T, Kawasaki K, Kosaka Y, Ohashi H et al (2012) Minimal residual disease monitoring in neuroblastoma patients based on the expression of a set of real-time RT-PCR markers in tumor-initiating cells. *Oncol Rep* 29:1629–1636
- Kuçi Z, Seitz G, Kuçi S, Kreyenberg H, Schumm M, Lang P, Niethammer D, Handgretinger R, Bruchelt G (2006) Pitfalls in detection of contaminating neuroblastoma cells by tyrosine hydroxylase RT-PCR due to catecholamine-producing hematopoietic cells. *Anticancer Res* 26(3A):2075–2080
- Lampert F, Rudolph B, Christiansen H, Franke F (1988) Identical chromosome 1p breakpoint abnormality in both the tumor and the constitutional karyotype of a patient with neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 34:235–239
- Lode HN, Bruchelt G, Seitz G, Gebhardt S, Gekeler V, Niethammer D, Beck J (1995) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of monoamine transporters in neuroblastoma cell lines: correlations to meta-iodobenzylguanidine (MIBG) uptake and tyrosine hydroxylase gene expression. *Eur J Cancer* 31A(4):586–590
- London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, Thorer P, Brodeur G, Maris JM, Reynolds CP, Cohn SL (2005) Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 23:6459–6465
- Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, Smith EI, Brodeur GM (1991) Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 9:581–591
- Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, von Schweinitz D, Simon T, Cohn SL, Pearson AD, Force IT (2009) The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG task force report. *J Clin Oncol* 27:298–303
- Noguera R, Canete A, Pellin A, Ruiz A, Tasso M, Navarro S, Castel V, Llombart-Bosch A (2003) MYCN gain and MYCN amplification in a stage 4S neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 140(2):157–161
- Oltra S, Martínez F, Orellana C, Grau E, Fernández JM, Canete A, Castel V (2005) The doublecortin gene, a new molecular marker to detect minimal residual disease in neuroblastoma. *Diagn Mol Pathol* 14(1):53–57
- Royston P, Altman DG, Sauerbrei W (2006) Dichotomizing continuous predictors in multiple regression: a bad idea. *Stat Med* 25(1):127–141
- Sakamoto Y, Ishiguro M, Kitagawa G (1986) Akaike information criterion statistics. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht
- Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP (1999) The international neuroblastoma pathology classification (the Shimada system). *Cancer* 86:364–372
- Spitz R, Oberthuer A, Zaparka M, Brors B, Hero B, Ernestus K, Oestreich J, Fischer M, Simon T, Berthold F (2006) Oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization (aCGH) of 90 neuroblastomas reveals aberration patterns closely associated with relapse pattern and outcome. *Genes Chromosomes Cancer* 45:1130–1142
- Stutterheim J, Gerritsen A, Zappeij-Kannegieter L et al (2008) PHOX2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 26:5443–5449
- Stutterheim J, Zappeij-Kannegieter L, Versteeg R et al (2011) The prognostic value of fast molecular response of marrow disease in patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma. *Eur J Cancer* 47:1193–1202
- Träger C, Vernby A, Kullman A, Ora I, Kogner P, Kågedal B (2008) mRNAs of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase but not of GD2 synthase are specific for neuroblastoma minimal disease and predicts outcome for children with high-risk disease when measured at diagnosis. *Int J Cancer* 123:2849–2855
- Viprey VF, Gregory WM, Corrias MV, Tchirkov A, Swerts K, Vicha A, Dallorso S, Brock P, Luksch R, Valteau-Couanet D, Papadakis V, Laureys G, Pearson AD, Ladenstein R, Burchill SA (2014) Neuroblastoma mRNAs predict outcome in children with stage 4 neuroblastoma: a European HR-NBL1/SIOPEN Study. *J Clin Oncol* 32:1074–1083
- Yáñez Y, Grau E, Oltra S, Cañete A, Martínez F, Orellana C, Noguera R, Palanca S, Castel V (2011) Minimal disease detection in peripheral blood and bone marrow from patients with non-metastatic neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 137(8):1263–1272

5.3 ARTÍCULO III

Two independent epigenetic biomarkers predict survival in Neuroblastoma.

Yanía Yáñez, Elena Grau, Virginia Rodríguez, David Hervás, Rosa Noguera, Miguel Hernández, Vanessa Segura, Adela Cañete, Ana Conesa, Jaime Font de Mora and Victoria Castel.

Clin Epigenetics 2015, 7(1):16.

Impact Factor 2015: 4.543

RESEARCH

Open Access

Two independent epigenetic biomarkers predict survival in neuroblastoma

Yania Yáñez^{1*}, Elena Grau¹, Virginia C Rodríguez-Cortez², David Hervás³, Enrique Vidal⁴, Rosa Noguera⁵, Miguel Hernández⁶, Vanessa Segura¹, Adela Cañete¹, Ana Conesa⁴, Jaime Font de Mora⁷ and Victoria Castel¹

Abstract

Background: Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial pediatric solid tumor with a highly variable clinical course, ranging from spontaneous regression to life-threatening disease. Survival rates for high-risk NB patients remain disappointingly low despite multimodal treatment. Thus, there is an urgent clinical need for additional biomarkers to improve risk stratification, treatment management, and survival rates in children with aggressive NB.

Results: Using gene promoter methylation analysis in 48 neuroblastoma tumors with microarray technology, we found a strong association between survival and gene promoter hypermethylation ($P = 0.036$). Hypermethylation of 70 genes significantly differentiated high-risk survivor patients from those who died during follow-up time. Sixteen genes with relevant roles in cancer biology were further validated in an additional cohort of 83 neuroblastoma tumors by bisulfite pyrosequencing. High promoter methylation rates of these genes were found in patients with metastatic tumors (either stage metastatic (M) or metastatic special (MS)), 18 months or older at first diagnosis, *MYCN* amplification, relapsed, and dead. Notably, the degree of methylation of retinoblastoma 1 (*RB1*) and teratocarcinoma-derived growth factor 1 (*TDGF1*) predicts event-free and overall survival independently of the established risk factors. In addition, low *RB1* mRNA expression levels associate with poor prognosis suggesting that promoter methylation could contribute to the transcriptional silencing of this gene in NB.

Conclusions: We found a new epigenetic signature predictive for NB patients' outcome: the methylation status of *RB1* and *TDGF1* associate with poorer survival. This information is useful to assess prognosis and improve treatment selection.

Keywords: Neuroblastoma, Epigenetic biomarkers, Promoter methylation

Background

Neuroblastoma originates from the sympathico-adrenal lineage of the neural crest and is the most common extracranial solid tumor in early childhood. This tumor exhibits contrasting patterns of clinical behavior ranging from spontaneous remission to rapid tumor progression and death. Prognosis classically depends on age at diagnosis [1], tumor stage [2], *MYCN* oncogene amplification status [3,4], and histology in a lesser extent [5]. Several well-characterized genetic abnormalities associated with neuroblastoma (NB) have been used to predict outcome, for example, DNA content [6], gain of chromosome arm 17q [7], or deletion of chromosome arm 1p [8] and 11q

[9,10]. However, current knowledge of the molecular features of NB is not sufficient to explain the observed clinical heterogeneity.

There is an important body of work on NB to find robust biomarkers that could help to improve the standard response criteria and, consequently, patients' survival. In this regard, several mRNA and miRNA classifiers have been established [11-13]. A recent study from SIOPEX shows that levels of tyrosine hydroxylase (*TH*) and paired-like homeobox 2B (*PHOX2B*) or doublecortin (*DCX*) mRNA in peripheral blood and bone marrow at diagnosis are independent predictors of survival [14]. Notably, high levels of *TH* and *PHOX2B* mRNA in peripheral blood identify ultrahigh-risk NB patients. Despite these new discoveries, survival rates in children with high-risk NB remain disappointingly low.

* Correspondence: yanyez_yan@gva.es

¹Pediatric Oncology Unit, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avda Fernando Abril Martorell, Valencia 46026, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Epigenetic modifications, particularly the methylation of the 5' position of cytosines, within CpGs dinucleotides at gene promoter regions, are essential regulatory mechanisms for normal cell development and may modulate gene expression without altering the DNA sequence. In the last decade, DNA-methylation studies have focused on identifying epigenetically modified genes to further understand NB pathogenesis and to find prognostic methylation markers. In this regard, global methylation studies have demonstrated that a methylator phenotype, characterized by the methylation of multiple CpG islands, is a hallmark of NB with poor prognosis [15]. Several tumor suppressor genes such as caspase 8 (*CASP8*), Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1 (*RASSF1A*), cyclin D2 (*CCND2*), CD44, O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*), and PYD and CARD domain containing (*TMS1*), have been shown to be silenced in NB by aberrant hypermethylation of their promoters [16-18]. In general, screening studies in NB showed that frequently methylated genes are related to apoptotic pathways as well as to cell cycle regulation.

Recent studies in oncology research have increased genome coverage allowing the identification of new epigenetic biomarkers. In NB, two recent studies have investigated DNA methylation patterns using genome-wide technologies [19,20]. However, the number of clinically relevant epigenetic biomarkers is still very low. In here, we used methylation microarrays to identify robust and independent epigenetic biomarkers in NB.

Results

Genome-wide promoter methylation screening

With the purpose of identifying DNA methylation biomarkers, we first analyzed 48 primary NB tumors using the Infinium HumanMethylation27 BeadChip microarray. Clinical, biological, and follow-up data are summarized in Table 1. Patients were classified following the International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) guidelines as 10 L1 (stage 1 localized); 16 L2 (stage 2 localized), 18 M (metastatic), and 4 MS (metastatic special). Twenty patients relapsed: 1 L1 presented a local relapse and is alive and disease free, 7 L2 (5 presented local relapses, 1 metastatic and 1 combined, 4 of them died of disease); 11 M stages (2 presented local relapses, 3 presented metastatic relapses and 6 combined relapses, all of them died of disease). One MS stage presented a metastatic relapse and died due to disease progression.

Data distribution according to the methylation probe intensity from the Illumina array was shown to be bimodal (Figure 1A). Using minAS, a method for feature selection in multivariate data, cutoff values for data discretization were defined as follows: ≤ 0.3 hypomethylated '0', $>0.3 < 0.7$ intermediate '0.5', and >0.7 hypermethylated '1'.

In order to understand to which extent gene promoter methylation is relevant to NB, we analyzed differences in the methylation levels among different patient subgroups. The most striking result of this analysis revealed a significant association between poor survival and global gene promoter hypermethylation ($P = 0.036$) (Figure 1B). Patients who died during follow-up time had higher promoter hypermethylation rates than survivors (median follow-up time for survivors of 12 years). No association was detected between survival and global hypomethylation of gene promoters. Other types of subgrouping (by age at diagnosis, *MYCN* status, or relapse) did not reveal any significant changes. However, comparing patients at different NB stages (L1 and MS vs. L2 vs. M) did indicate a near-significant hypermethylation of the runt-related transcription factor 3 (*RUNX3*) gene ($P = 0.05$). These results suggest that the overall promoter hypermethylation status at diagnosis could predict survival and that NB stages can be associated with methylation changes at specific genes.

After establishing a significant association between promoter hypermethylation and NB, we then aimed to identify particular methylation events. Comparison of methylation values of high-risk patients who died of disease, and of high-risk patients who survived, revealed 70 genes that significantly differentiate these two groups (Figure 1C and Table 2). Interestingly, only specific CpG sites within promoter regions were methylated (compare total probes vs. significant probes that were methylated on Table 2 and see the scheme on Additional file 1). This result revealed the importance of sufficient CpG probes at promoter regions to capture the dynamics of methylation changes. Sixteen genes with high impact on cancer biology were selected for validation. The methylated probes and P values as well as the methylation level of the selected hypermethylated genes are shown in Table 3. Detailed information of these genes' promoter methylation sites in each patient is described in Additional file 2. These genes regulate the following: maturation and maintenance of the overall structure of the nervous system (neuronatin (*NNAT*)); cell cycle progression (cyclin D1 (*CCND1*), janus kinase 2 (*JAK2*), retinoblastoma 1 (*RBI*), leucine-rich repeat C4 protein (*LRRCA*), and tumor protein P73 (*TP73*)); cell growth and differentiation (dual specificity phosphatase 2 (*DUSP2*), paired box 8 (*PAX8*), and hepsin (*HPN*)); tumorigenesis (melanoma antigen family A, 2 (*MAGEA2*), *RUNX3*, cathepsin Z (*CTSZ*), teratocarcinoma-derived growth factor 1 (*TDGF1*), and tetraspanin 32 (*TSPAN32*)); apoptosis (*JAK2* and esophageal cancer-related gene 4 protein (*ECRG4*)) and DNA repair mechanisms (*MGMT*).

Validation of the prognostic power of DNA methylation biomarkers by bisulfite pyrosequencing

To validate the specific CpG methylated sites, we performed sequencing analysis of the 16 promoter genes.

Table 1 Clinical and biological data from the 48 patients included in the microarray analysis

Characteristics	INRG staging system				Total
	L1	L2	M	MS	
Number of patients	10	16	18	4	48
Pre-treatment risk group					
Very low + low	10	2	0	3	15
Intermediate	0	10	2	0	12
High	0	4	16	1	21
Age at diagnostic in months					
Median	11.1	18.6	27.6	4	16.1
Range	1.5-22.7	4.8-109.3	6.6-79.8	1.9-6.7	1.5-109.3
Patients over 18 months at diagnostic	4	9	11	0	24
Sex					
Female	6	8	6	2	22
Male	4	8	12	2	26
Primary site					
Adrenal	1	5	9	3	18
Abdominal	4	5	2	0	11
Cervical	0	1	0	1	2
Thoracic	2	0	4	0	6
Cervical-thoracic	0	1	0	0	1
Thoracic-abdominal	1	1	0	0	2
Pelvic	1	0	0	0	1
Other sites	1	3	3	0	7
Protocol of treatment					
LNEGS I	2	0	0	0	2
LNEGS II	1	0	0	0	1
EUNS	0	2	0	0	2
INES	3	5	2	2	12
HR-NBL-1	0	4	9	0	13
Other (national protocols)	4	4	7	2	17
MYCN status					
Amplified (%)	0 (0%)	4 (25%)	8 (44%)	1 (25%)	13 (27%)
Not amplified (%)	10 (100%)	12 (75%)	10 (56%)	3 (75%)	35 (73)
1p status					
Normal (%)	8 (80%)	8 (50%)	8 (44%)	3 (75%)	27 (56%)
Deleted (%)	0 (0%)	4 (25%)	7 (39%)	0 (0%)	11 (23%)
Not determined (%)	2 (20%)	4 (25%)	3 (17%)	1 (25%)	10 (21%)
Patients with relapse (%)	1 (10%)	7 (44%)	11 (61%)	1 (25%)	20 (42%)
Type of relapse					
Local	1	5	2	0	8
Metastatic	0	1	3	1	5
Local + metastatic	0	1	6	0	7
Dead (%)	0 (0%)	5 (32%)	12 (67%)	1 (25%)	18 (38%)

Table 1 Clinical and biological data from the 48 patients included in the microarray analysis (Continued)

Cause of death					
Disease progression	0	4	11	1	16
Other	0	1	1	0	2
Time of follow-up (month)					
Median	152.1	93.5	45.4	129.3	117.4
Range	87.8-208.3	9.4-206.5	3.4-161.2	17.2-214.9	3.4-214.9

Primers for bisulfite pyrosequencing were carefully designed flanking the methylated CpG sites detected in the array. Validation of results was carried out with an independent cohort of 83 NB including 12 L1, 21 L2, 42 M, and 8 MS stages. Clinical and biological data from the validation cohort is summarized in Table 4.

We performed a multivariate analysis of variance (MANOVA) statistical analysis in order to study the methylation variations of selected genes among the established subgroups (see below and “Methods” section) of NB patients. Overall, we found significantly higher gene promoter methylation rates in patients with the following characteristics: metastatic tumors (either stage M or MS)

(Figure 2A), aged 18 months or older at first diagnosis (Figure 2B) and *MYCN* amplification (Figure 2C). The same applies to patients who relapsed or died (Figure 2D). In particular, methylated status of *TDGF1* and *PAX8* allowed us to differentiate all the clinical subgroups mentioned above (Figure 2). In addition, high methylation rates of *RUNX3*, *ECRG4*, *CTSZ*, and *RBI* also distinguished all NB subgroups but not *MYCN*-amplified status (Figure 2). We also found highest methylation rates of *LRRC4* and *CCND1* in patients older than 18 months (Figure 2B). Furthermore, *DUSP2*, *TP73*, *JAK2*, *MGMT*, and *HPN* methylation rates were significantly higher in *MYCN*-amplified patients than in non-amplified patients

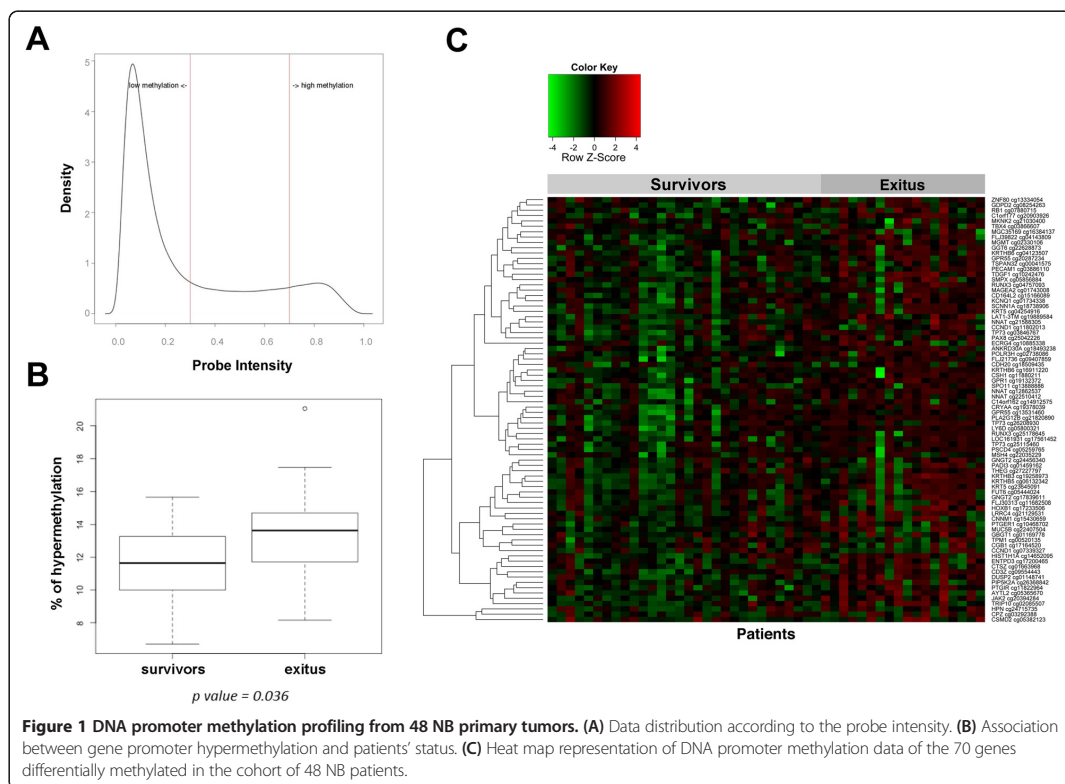


Table 2 Seventy significantly hypermethylated genes in high-risk NB patients

Genes	Total probes	Sig. probes	ID. Sig. probes	P values
<i>ANKRD30A</i>	2	1	cg18493238	0.044554738
<i>AYTL2</i>	2	1	cg05365670	0.035713814
<i>C14orf162</i>	2	1	cg14912575	0.005363655
<i>C1orf177</i>	2	1	cg20903926	0.012915253
<i>CCND1</i>	18	2	cg11802013, cg07339327	0.0341943541, 0.047611226
<i>CD164L2</i>	2	1	cg15166089	0.021147357
<i>CD3Z</i>	1	1	cg09554443	0.018393493
<i>CDH20</i>	1	1	cg18509435	0.047064214
<i>CGB1</i>	2	1	cg17164520	0.020905647
<i>CNNM1</i>	2	1	cg15430659	0.020905647
<i>CPZ</i>	2	1	cg03292388	0.022686711
<i>CRYAA</i>	2	1	cg19378039	0.004448711
<i>CSH1</i>	2	1	cg11880211	0.035724213
<i>CSMD2</i>	2	1	cg05382123	0.035713814
<i>CTSZ</i>	7	1	cg01663968	0.037116693
<i>DUSP2</i>	2	1	cg01148741	0.012020747
<i>ECRG4</i>	2	1	cg10885338	0.004398444
<i>ENTPD3</i>	2	1	cg17200465	0.022686711
<i>FLJ21736</i>	2	1	cg09407859	0.039315449
<i>FLJ30313</i>	2	1	cg11682508	0.035713814
<i>FLJ39822</i>	2	1	cg04143809	0.047611226
<i>FUT6</i>	2	1	cg05444024	0.03549584
<i>GBGT1</i>	2	1	cg01169778	0.037116693
<i>GDPD2</i>	2	1	cg08254263	0.034194354
<i>GGT6</i>	2	1	cg22628873	0.010030882
<i>GNGT2</i>	2	2	cg17839611, cg24456340	0.0135039944, 0.0183934926
<i>GPR1</i>	1	1	cg19132372	0.047064214
<i>GPR55</i>	2	2	cg20287234, cg13531460	0.005474794, 0.0343533092
<i>HIST1H1A</i>	2	1	cg14652095	0.021147357
<i>HOXB1</i>	2	1	cg17233506	0.020905647
<i>HPN</i>	2	1	cg24715735	0.022686711
<i>JAK2</i>	1	1	cg20394284	0.035713814
<i>KCNQ1</i>	23	1	cg01734338	0.034194354
<i>KRT5</i>	2	2	cg23645091, cg04254916	0.0067809343, 0.0072736595
<i>KRTHB3</i>	2	1	cg19258973	0.012020747
<i>KRTHB5</i>	2	1	cg06132342	0.000549806
<i>KRTHB6</i>	2	2	cg04123507, cg16911220	0.000926591, 0.0053636552
<i>LAT1-3TM</i>	1	1	cg19889584	0.013503994
<i>LOC161931</i>	2	1	cg17561452	0.044554738
<i>LRRC4</i>	2	1	cg21129531	0.013503994
<i>LY6D</i>	2	1	cg05800321	0.032446014
<i>MAGEA2</i>	2	1	cg01743008	0.034353309
<i>MGC35169</i>	2	1	cg16384137	0.021877651
<i>MGMT</i>	26	1	cg02330106	0.031115525

Table 2 Seventy significantly hypermethylated genes in high-risk NB patients (Continued)

<i>MKNK2</i>	2	1	cg21030400	0.031115525
<i>MSH4</i>	2	1	cg22035229	0.044554738
<i>MUC5B</i>	2	1	cg22407504	0.030056033
<i>NNAT</i>	7	3	cg22510412, cg12862537, cg21588305	0.0182304654, 0.0211473571, 0.0324460138
<i>PADI3</i>	2	1	cg01459162	0.010896145
<i>PAX8</i>	2	1	cg25042226	0.007819456
<i>PECAM1</i>	2	1	cg03886110	0.021147357
<i>PIP5K2A</i>	2	1	cg26368842	0.047611226
<i>PLA2G12B</i>	2	1	cg21820890	0.015211786
<i>POLR3H</i>	1	1	cg02738086	0.044554738
<i>PSCD4</i>	2	1	cg05259765	0.012683212
<i>PTGER1</i>	2	1	cg10468702	0.022686711
<i>PTGIR</i>	2	1	cg11822964	0.035713814
<i>RB1</i>	21	1	cg07880715	0.047611226
<i>RUNX3</i>	19	2	cg04757093, cg25178645	0.0004487598, 0.0390263555
<i>SCNN1A</i>	2	1	cg18738906	0.044000585
<i>SMPX</i>	2	1	cg05856884	0.035713814
<i>SPO11</i>	2	1	cg13888886	0.001023813
<i>TBX4</i>	2	1	cg03866607	0.006780934
<i>TDGF1</i>	2	1	cg10242476	0.037116693
<i>THEG</i>	1	1	cg27227797	0.030056033
<i>TP73</i>	12	3	cg03846767, cg26208930, cg25115460	0.0038887033, 0.0324460138, 0.0470642136
<i>TPM1</i>	2	1	cg00520135	0.007819456
<i>TRIP10</i>	2	1	cg02085507	0.037116693
<i>TSPAN32</i>	2	1	cg00041575	0.007819456
<i>ZNF80</i>	2	1	cg13334054	0.012599325

(Figure 2C). These results demonstrate that these set of methylated gene promoters allow the discrimination of specific NB subgroups defined in Figure 2.

To study the influence of the degree of the 16 validated genes' promoter methylation on survival, we evaluated them as independent prognostic variables by the elastic net penalized Cox's regression model. Higher gene promoter methylation rates of *RB1*, *PAX8*, and *TDGF1* remained as independent predictors of overall survival (OS) after adjusting for known prognostic factors (Table 5A). On the other hand, *RB1* and *TDGF1* but not *PAX8* predicted worse event-free survival (EFS) (Table 5B). Information of *TDGF1* and *RB1* promoter methylation sites in the validation cohort of patients is described in Additional file 3. These regressions also confirmed the well-established stage, *MYCN* status, and age as independent predictors, thus further supporting the consistency of this model. The penalized coefficient of each independent variable directly associates with survival. Thus, *MYCN* amplification and staging have the highest influence on survival followed by the degree of *TDGF1* and *RB1*

promoter methylation. Age at diagnosis had a lower impact in EFS and none in OS.

***RB1* expression in NB correlates with survival**

Taking into account that *RB1* and *TDGF1* promoter methylation is one of the mechanisms responsible for the downregulation of these genes in other tumors [21,22], we explored *RB1* and *TDGF1* expression in NB, the two only independent predictors of EFS and OS that we found in this study. For this purpose, we analyzed a new cohort of 251 NB patients using the R2: microarray analysis and visualization platform (<http://r2.arnc.nl>). The results of this analysis are displayed in Figure 3. The Kaplan-Meier plots show the significant association between low expression levels of *RB1* and poorer outcome (Figure 3A). Based on these findings, promoter methylation could contribute to the transcriptional silencing of *RB1* in NB. On the other hand, low expression levels of *TDGF1* associates with better outcome in this patient cohort (Figure 3B). Since our results show that high methylation levels of *TDGF1* negatively affect patient survival, the *TDGF1* expression-

Table 3 Hypermethylated genes selected for pyrosequencing validation

Genes	Sign. probes	Total probes	P values	Gene function
<i>NNAT</i>	3	7	0.018, 0.021, 0.032	Involved in the maturation or maintenance of the overall structure of the nervous system
<i>TP73</i>	3	12	0.004, 0.032, 0.047	Participates in the apoptotic response to DNA damage
<i>CCND1</i>	2	18	0.034, 0.048	Essential for the control of the cell cycle at the G1/S (start) transition
<i>RUNX3</i>	2	19	0.0004, 0.039	Tumor suppressor gene
<i>CTS2</i>	1	7	0.037	May be involved in tumorigenesis and metastasis
<i>DUSP2</i>	1	2	0.012	Regulates cellular proliferation and differentiation
<i>HPN</i>	1	2	0.023	Plays an essential role in cell growth and maintenance of cell morphology
<i>JAK2</i>	1	1	0.036	Involved in cell cycle progression, apoptosis, mitotic recombination, genetic instability, and histone modifications
<i>LRRC4</i>	1	2	0.014	Significantly downregulated in primary brain tumors. The exact function of the protein encoded is unknown
<i>MAGEA2</i>	1	2	0.034	May play a role in embryonal development and tumor transformation or aspects of tumor progression
<i>MGMT</i>	1	26	0.031	Involved in DNA repair mechanisms
<i>PAX8</i>	1	2	0.008	Transcription factor. Mutations in this gene are associated with carcinogenesis
<i>ECRG4</i>	1	2	0.004	Antiapoptotic gene
<i>RB1</i>	1	21	0.048	Negative regulator of the cell cycle
<i>TDGF1</i>	1	2	0.037	Plays an essential role in embryonic development and tumor growth
<i>TSPAN32</i>	1	2	0.008	Is one of several tumor-suppressing subtransferable fragments located in the imprinted gene domain of chromosome 11p15.5

Kaplan-Meier plots suggest that this particular epigenetic event on cg10242476 is not involved in *TDGF1* down-regulation but rather in its expression. In order to investigate the positive correlation between CpG methylation and *TDGF1* expression, we explored the correlation between *TDGF1* expression and the DNA methyltransferases *DNMT1*, *DNMT3A*, and *DNMT3B*. As shown in Additional file 4, we found a significant correlation between *TDGF1* and *DNMT1* and *DNMT3B* but not between *TDGF1* and *DNMT3A* in the cohort of patients with *MYCN* amplification. These correlations further

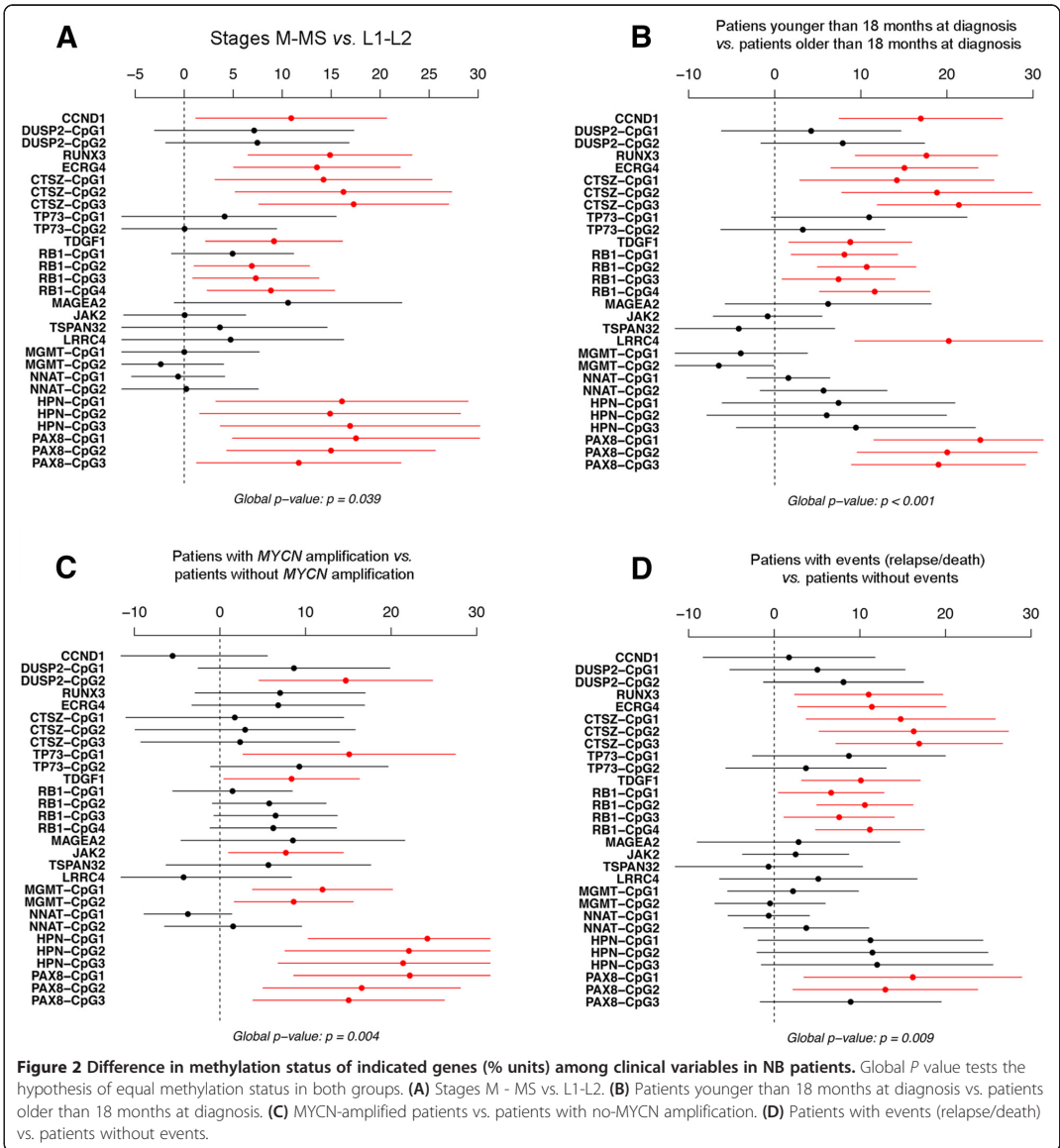
support that DNA methylation might as well be implicated in the upregulation of *TDGF1* expression.

Discussion

Most of the DNA methylation studies in NB are experimentally limited because they used previously selected candidate genes based on their implication in cancer development or tumor biology [16,23-25]. A recent report described the signature of hypomethylated regions within non-promoter regulatory sites [20], thus complementing our findings on hypermethylated promoter regions. These

Table 4 Clinical and biological characteristics of the NB cohort used for pyrosequencing validation

Characteristics	INRG staging system				Total
	L1	L2	M	MS	
Number of patients	12	21	42	8	83
Patients over 18 months at diagnostic	3	8	38	0	49
Sex					
Female	8	6	16	3	33
Male	4	15	26	5	50
MYCN status					
Amplified (%)	0	8 (38%)	16 (38%)	1 (12.5%)	25 (30%)
Not amplified (%)	12 (100%)	13 (62%)	23 (55%)	7 (87.5%)	55 (66%)
Not determined (%)	0	0	3 (7%)	0	3 (4%)
Patients with relapse (%)	3 (25%)	5 (24%)	22 (52%)	0	30 (36%)
Dead (%)	0	6 (29%)	25 (60%)	0	31 (37%)



characteristic profiles may reflect specific chromatin remodeling events that could contribute to the generation of chromosomal instability. Another recent genome-wide study has proposed new epigenetic biomarkers of interest in NB patients [19,26]. However, authors only used cell lines in the selection phase of potential prognostic DNA methylation biomarkers. Although candidate genes were further validated in 89 primary tumor samples, this approach may have skipped many candidate biomarkers

occurring on primary tumors due to the passage-dependent epigenetic changes on cell lines. Lau et al. applied a genome-wide screen of DNA methylation changes using NB primary tumors [26]. In their study, they pre-selected candidate genes which may result in the loss of novel epigenetic biomarkers. In here, we adopted a non-targeted approach based on genome-wide screen of DNA-methylation changes. Our results reveal 70 candidate genes that showed epigenetic changes within the high-risk group. We further

Table 5 Cox elastic net results for (A) OS (B) and EFS

Variable	Penalized coefficient
A. OS	
MYCN amplification	0.7217
Stage M	0.4871
<i>TDGF1</i>	0.0133
<i>RB1</i>	0.0045
<i>PAX8</i>	0.0002
B. EFS	
MYCN amplification	0.455
Stage M5	-0.34
Stage M	0.569
Age	0.002
<i>TDGF1</i>	0.009
<i>RB1</i>	0.005

Non-zero coefficients after elastic net penalization. Negative coefficients stand for variables lowering risk and positive coefficients for variables increasing risk.

validated 16 out of 70 candidate genes, leaving for future validation studies the remaining group.

The two patient cohorts used in this study included a representative distribution of all the INRG-based NB subgroups, being among the highest and well-characterized NB cohorts used for genome-wide epigenetic studies so far reported to our knowledge. Interestingly, the degree of methylation of the proposed biomarkers is able to distinguish between different subgroups of NB: patients who were older than 18 months at diagnosis from younger than 18 months at diagnosis, patients with *MYCN*-amplified tumors from *MYCN* non-amplified tumors, patients with metastatic tumors from localized tumors and relapsed or dead patients from relapse-free survivors. These findings support the idea that aberrant DNA methylation could be related to NB pathogenesis. Notably, only *RB1* and *TDGF1* remained as independent prognostic predictors of poorer OS and EFS. Therefore, our predictive epigenetic biomarkers constitute a new set of robust risk predictors of the disease.

TDGF1 promoter is hypomethylated and highly expressed in human-induced pluripotent stem (iPS) and embryonic stem (ES) cells [27]. Using the same Illumina array, our results reveal a different CpG site not only localized downstream but also within the first exon (5'-UTR) of *TDGF1* gene (cg10242476) that significantly predicts EFS and OS in NB patients. Importantly, *TDGF1* has been shown to be regulated by the ES cell-related transcription factors Oct4/Nanog and to a lesser extent by the DNA methylation status of the promoter region [28]. *TDGF1* has been found overexpressed in a variety of human tumors such as breast, colorectal, and gastric cancers, and high expression levels of this gene are associated with poorer prognosis in those tumors [29]. Using the microarray analysis and

visualization platform R2 (<http://r2.arnc.nl>), we confirmed that high *TDGF1* expression levels are also associated with poor prognosis in NB (Figure 3B). Following this reasoning, higher methylation of this CpG would correlate with higher *TDGF1* expression and, therefore, with poorer prognosis. Interestingly, this CpG site is localized in the first exon of *TDGF1* transcript variant 1 (NM_003212) and coincides with the first intron of *TDGF1* transcript variant 2 (NM_001174136). One plausible explanation for this correlation is that intronic CpG methylation results in *TDGF1* transcript variant 2 expression. In this regard, regulation of imprinted *IGF2R* expression is mediated by methylation of an intronic CpG island [30]. Taken all together, these results suggest that intronic CpG (cg10242476) methylation in *TDGF1* transcript variant 2 positively regulates its expression in NB whereas CpG (cg27371741) hypomethylation in the first exon of *TDGF1* transcript variant 1 regulates its expression in embryonic stem cells. The strong association between hypermethylation and poor prognosis reflects the consequences of epigenetic changes occurring in high-risk NB.

Loss of *RB1* expression is associated with a higher grade of malignancies and seems to be a prognostic indicator in a variety of human tumors [31,32]. Hypermethylation of *RB1* CpG island is a common epigenetic event associated with the development of malignant nervous system tumors [22]. A clear correlation between loss of *RB1* expression and promoter hypermethylation was found in glioblastomas [32]. Although hypermethylation of *RB1* promoter has previously been reported in NB, no association with patient survival was included in the study [33]. Moreover, the methylation-specific PCR approach used to detect *RB1* promoter methylation does not allow to study the broad CpG sites analyzed with a genome-wide approach. We describe for the first time that the degree of *RB1* promoter methylation associates with poorer prognosis in NB patients. In agreement with our findings, using the publicly available R2 platform, we found that low expression levels of *RB1* associates with poorer outcome. These results suggest that *RB1* promoter methylation could contribute to its silencing and enhance NB development and aggressiveness.

Conclusions

Biomarkers are playing an increasing role in the management of NB patients and, together with drug targets, represent the future analytical platforms for personalized clinical intervention. In this work, we demonstrate that high promoter methylation rates of *TDGF1* and *RB1* genes are independent predictive biomarkers of NB aggressiveness and disease progression. Our findings highlight the use of methylation profiling to identify risk-independent prognostic markers in NB and reinforce the connection between epigenetic events and NB biology. Taking into

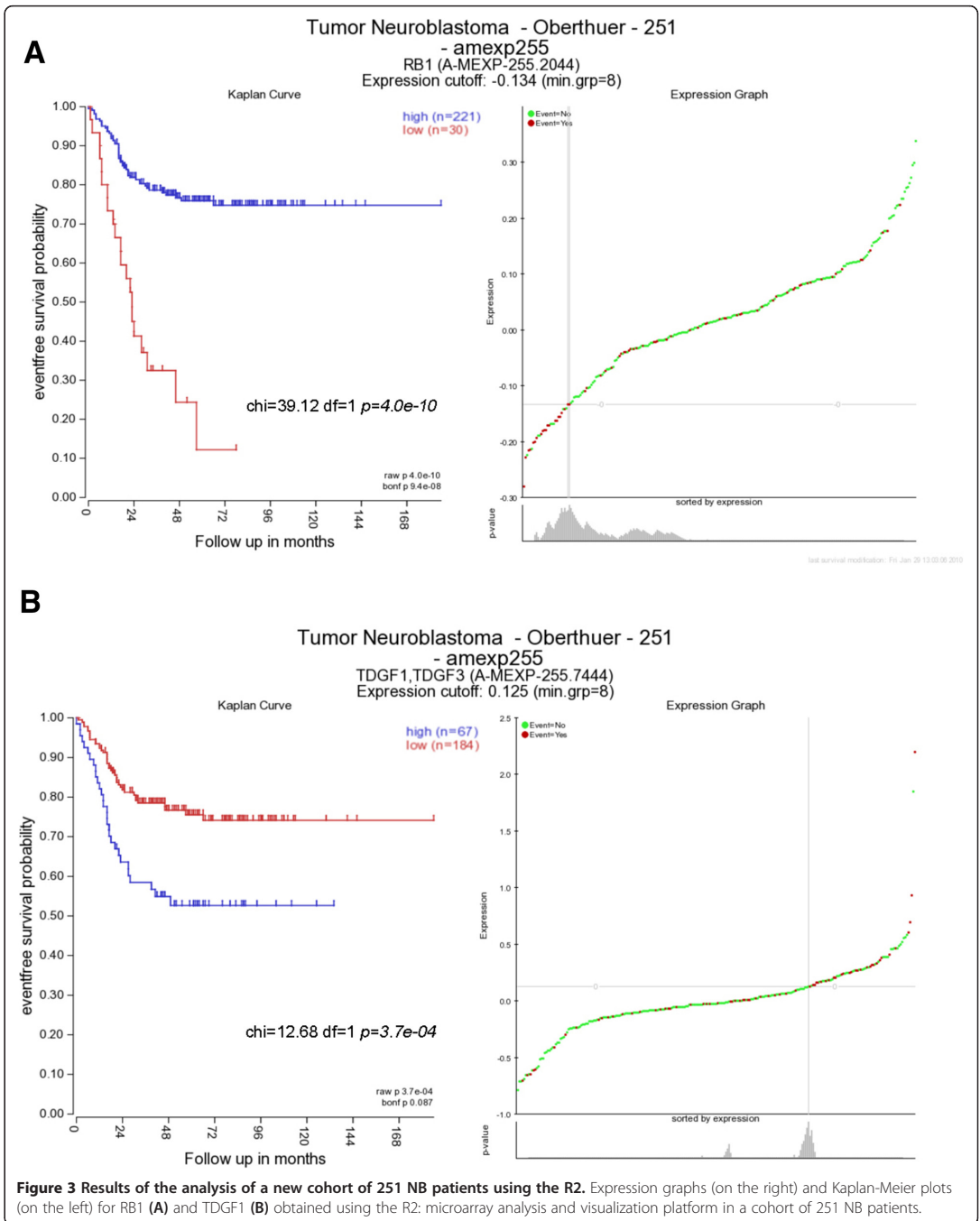


Table 6 Sequences of primers used for pyrosequencing validation

Genes	Amplification primers		Sequencing primers
	Name	Sequence	
CTSZ	Forward	GTTGGGGYGTAGGTGGGTAT	GTAGTTTTGGGGGA
	Reverse	[Btñ]CACAAACATCAAACTCACCTAAATAT	
DUSP2	Forward	TTGAGTGGTTGGGATAGTTAA	GGGATAGGTTAAAGGGT
	Reverse	[Btñ]AAAACRCAATCTAAACTAACCTAAAACTT	
CCND1	Forward	[Btñ]GGGYGGTTGGGTTTGTGATTT	CATATTTATCTTTTTATCTTCTACT
	Reverse	ACCACCTACCTAATTCT	
ECRG4	Forward	ATTTTGGTAAGGAGGGTTAG	GGGTAAGGGGTTGT
	Reverse	[Btñ]TACCATTACCTCTCTAAATTACCA	
RUNX3	Forward	[Btñ]GGTTTTGGGAATTAGAGTTTAAAG	AAAAAAAATCAATCCAAT
	Reverse	ACTAACATAACCCRAAATAATACATCCTA	
TP73	Forward	AGTTAGTTGATAGAATTAAGGGAGATG	ATGGGAAAAGYAAAATGTTAATAA
	Reverse	[Btñ]ATCTACACACRCCAAAACTAATATCCC	
LCCR4	Forward	TGAAAAGAGGAGTTTTTGTGTTTAAAG	AAATTTTAGGYGATGGTGAATTA
	Reverse	[Btñ]ATTACCTACCACAAAACTCATAATAT	
MAGEA2	Forward	GATTTGYGTATTGGAGGTTAGAGGATA	GTAAGAYGTYGAGGGAGGATTGA
	Reverse	[Btñ]TAAAAATCTTCCCTCACAAAAATCCA	
MGMT	Forward	TTTTTGAGAGYGGTTGAGTTAGGT	AGGTTATYGGTATTGATAGTT
	Reverse	[Btñ]CCAAACCAACAAAAACCTATCA	
NNAT	Forward	TGTAGGTTAGGATTGGGGAGAA	TTAAAGTAAATTTAAAGTAAGT
	Reverse	[Btñ]TCCATCTTAACCCCTTCCAA	
TSPAN32	Forward	GAGGTTTATAAAGTTTTTTTGGAGG	GAGGTTTTAYGTGAGTGTGA
	Reverse	[Btñ]CACCCCTTAAAAATCTCTATAACAACCT	
HPN	Forward	ATGAAATAAAGATTTTTGGATTGATGTAT	GTGAGTTTYGITATTTTTTTTTTAT
	Reverse	[Btñ]TAAATAACTCACCTATAAACCCCTCAAAT	
JAK2	Forward	[Btñ]TTTTTTAGATAGTTATGGGATTGGTTTAT	AATAAAAACRACAAAAACAACAACA
	Reverse	ACACTCCTACCCTACTAAATTATATT	
PAX 8	Forward	GTGATTTAGGAGGATTAGAGAATTTTATT	ATTTTTTTGATTTAGTTAGTTAA
	Reverse	[Btñ]CTCTCCTCTCTAAAATTTATCC	
TDGF1	Forward	ATTGGGGTTTGTGTTGAAGAA	TTTATTTTTTTTTTAAATGTTATT
	Reverse	[Btñ]AAACAACCAAAAAAACATTCATCTCC	
RB1	Forward	[Btñ]TTGGGGTTGGTTTATTTATTAGTTTTG	TTACCCCTCCTCCCC
	Reverse	AACRAAAAACCCCTTACCCTCCTC	

account that survival rates remain sadly low in high-risk NB patients, our epigenetic biomarkers are valuable tools for future patient stratification and treatment management.

Methods

Patients and samples

Tumor samples were resected from 131 children diagnosed with NB between years 1996 and 2010 in Spanish cooperative hospitals. Patients were included in different national and European studies (LNESEG I and II, INES, EUNS, N-AR-99, N-II-92, and HR-NBL1) and carefully

selected in order to have all NB subtypes represented (Table 1). Forty-eight NB tumor samples were used for genome-wide promoter methylation analysis, and an additional cohort of 83 tumor samples were used for validation. Staging and risk stratification was established according to International Neuroblastoma Risk Group (INRG) criteria [2]. However, very low- and low-risk patients were joined for the statistical analysis and were considered as low-risk group. Samples were centrally reviewed and classified according to the International Neuroblastoma Pathology Committee (INPC) system [5,34]. Biological studies included status of *MYCN* and 1p, both studied by FISH

according to ENQUA guidelines [35,36]. Parents or guardians signed an informed consent statement for sample and data management. The study was approved by the Hospital La Fe Research Institute Ethical Committee.

Genome-wide promoter methylation profiling

Genomic DNA was extracted from frozen tumor tissues by a standard proteinase K and phenol-chloroform extraction protocol. The quality and quantity of the extracted DNA was measured by A260 spectrophotometric absorbance. Genomic DNA bisulphite modification was carried out following the manufacturer's instructions (Zymo Research). Promoter methylation analysis was performed using the Infinium HumanMethylation27 BeadChip (Illumina Inc., CA, USA) at the Spanish National Cancer Center (CEGEN-CNIO, Madrid, Spain). The Infinium HumanMethylation27 BeadChip allowed us to interrogate 27,578 highly informative CpG sites per sample, located within the proximal gene promoter regions of transcription. A file containing all CpG sites used in the Illumina array HumanMethylation27 BeadChip can be localized at http://support.illumina.com/array/array_kits/infinium_humanmethylation27_beadchip_kit/downloads.html. BeadStudio software (version 3, Illumina Inc, USA) [37,38] was used to analyze the data. For each CpG site, we calculated the beta-value (*b*-value), a quantitative measure of DNA methylation levels ranging from 0 for completely unmethylated to 1 for completely methylated cytosines.

Bisulfite pyrosequencing

Promoter methylation data from the array was validated by bisulfite pyrosequencing. Genomic DNA was bisulfite modified using EZ DNA Methylation Gold Kit™ (Zymo Research). A subsequent PCR amplification was performed using biotinylated primers designed with the PyroMark Assay Design 2.0 software, Qiagen (Table 6). The pyrosequencing and data analysis were performed in a PyroMark Q24 System version 2.0.6 (Qiagen) following the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

The methylation status at each array probe was established by analyzing the distribution of *b*-values for all samples and CpG sites and transforming data into discrete values. The cutoff values for hyper- and hypomethylation were established using the minAS method [39] and considering the bimodal distribution of *b*-values. Differential methylation analysis was done at the single CpG, CpG island, and gene-centric levels. For the analysis of CpG island, individual probes were considered independent observation, whereas the gene-level analysis simply counted the percentage of CpG and CpG island associated to each gene that were declared significant. Differential methylation

across the NB subgroups was determined by either a proportion test when several groups were compared or by Fisher's exact test when only two subgroups were involved. Subgroups were established and compared based on clinical and biological parameters such as age at first diagnosis (younger vs. older than 18 months), *MYCN* status (*MYCN*-amplified vs. non-amplified tumors), stage (L1-L2 vs. M-MS), risk groups (low and intermediate vs. high risk), relapse, and death (patients with events (relapse/death) vs. patients without events). Nominal *P* values were corrected for multiple tests using the Benjamini and Hochberg FDR procedure [40].

Data distribution from pyrosequencing analysis was not bimodal and varies among genes; therefore, variables were analyzed as continuous. The relationship between the methylation status and NB risk factors was evaluated using a MANOVA test. A Cox elastic net analysis [41] was performed to evaluate the influence on survival of gene promoter methylation. This novel statistical analysis method is especially suited for analyzing data with many variables and few observations by performing variable selection. This is done by penalizing predictors' coefficients towards zero according to their association with survival. Coefficients from variables with less influence on survival were more penalized, dropped to zero, and excluded from the predictive model.

For all the above-mentioned statistical tests, R software (version 3.0.2) and package glmnet (version 1.9-5) were used. For EFS analysis, time to event was defined as the time from diagnosis until the time of first occurrence of relapse, progression, or death. For OS, time to event was defined as time until death or until last contact if the patient was alive. *P* values <0.05 were considered statistically significant.

Additional files

Additional file 1: Schematic mapping of CpGs sites within the promoter regions of the sixteen genes selected for pyrosequencing validation.

Additional file 2: Illumina methylation microarray data of the sixteen genes selected for bisulfite pyrosequencing validation.

Additional file 3: *TDGF1* and *RB1* methylation data from bisulfite pyrosequencing analysis in the validation cohort of patients.

Additional file 4: Correlation graphs between *TDGF1* expression and *DNMT1* (A), *DNMT3B* (B) and *DNMT3A* (C) obtained at R2: microarray analysis and visualization platform (<http://r2.amc.nl>) using a cohort of 31 NB patients with *MYCN* amplification.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

Conception and design were performed by YY, EG, AC, and VC. The methodology was developed by YY, EG, VR, RN, and MH. Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.) was performed by YY¹, EG, AC, MH, VS, JFdM, and VC. Analysis and

interpretation of data (for example, statistical analysis, biostatistics, computational analysis) were accomplished by DH, EV and AC. Writing, review, and/or revision of the manuscript were done by YY, EG, VR, DH, RN, MH, VS, AC, AC, JFdM, and VC. Administrative, technical, or material support (that is, reporting or organizing data, constructing databases) was provided by YY, EG, and AC. JFdM and VC supervised the study. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported in part by FIS P509/02323 and Prometeo 2013. Conselleria de Educació Cultura i Esports. We thank Désirée Ramal for her help in the data management and all the Spanish collaborating hospitals who register their patients in neuroblastoma studies. We thank Ana Gonzalez-Neira (head of the Human Genotyping Unit at CEGEN-CNIO, Madrid, Spain) for her technical support.

Author details

¹Pediatric Oncology Unit, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avda Fernando Abril Martorell, Valencia 46026, Spain. ²Chromatin and Disease Group, Cancer Epigenetics and Biology Programme (PEBC) Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Gran Via de l'Hospitalet, Barcelona 08908, Spain. ³Biostatistics Unit, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Avda Fernando Abril Martorell, Valencia 46026, Spain. ⁴Genomics of Gene Expression Lab, Centro de Investigaciones Príncipe Felipe, Carrer d'Eduardo Primo Yúfera, Valencia 46012, Spain. ⁵Department of Pathology, Medical School, University of Valencia, Avda Blasco Ibáñez, Valencia 46010, Spain. ⁶Department of Pathology, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avda Fernando Abril Martorell, Valencia 46026, Spain. ⁷Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Avda Fernando Abril Martorell, Valencia 46026, Spain.

Received: 9 September 2014 Accepted: 9 February 2015

Published online: 27 February 2015

References

- London WB, Castleberry RP, Matthey KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, 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*. 2005;23:6459–65.
- Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 2009;27:298–303.
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. 1984;224:1121–4.
- Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med*. 1985;313:1111–6.
- Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*. 1999;86:364–72.
- Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, et al. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 1991;9:581–91.
- Caron H. Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavorable prognostic markers in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 1995;24:215–21.
- Lampert F, Rudolph B, Christiansen H, Franke F. Identical chromosome 1p breakpoint abnormality in both the tumor and the constitutional karyotype of a patient with neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1988;34:235–9.
- Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 2009;27:289–97.
- Spitz R, Hero B, Simon T, Berthold F. Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2006;12:3368–73.
- De Preter K, Mestdagh P, Vermeulen J, Zeka F, Naranjo A, Bray I, et al. Vandesompele J: miRNA expression profiling enables risk stratification in archived and fresh neuroblastoma tumor samples. *Clin Cancer Res*. 2011;17:7684–92.
- Schulte JH, Schowe B, Mestdagh P, Kaderali L, Kalaghatgi P, Schlierf S, et al. Accurate prediction of neuroblastoma outcome based on miRNA expression profiles. *Int J Cancer*. 2010;127:2374–85.
- Vermeulen J, De Preter K, Naranjo A, Verbruggen L, Van Roy N, Hellemans J, et al. Predicting outcomes for children with neuroblastoma using a multigene-expression signature: a retrospective SIOPEN/COG/GPOH study. *Lancet Oncol*. 2009;10:663–71.
- Viprey VF, Gregory WM, Corrias MV, Tchirkov A, Swerts K, Vicha A, et al. Neuroblastoma mRNAs predict outcome in children with stage 4 neuroblastoma: a European HR-NBL1/SIOPEN study. *J Clin Oncol*. 2014;32:1074–83.
- Abe M, Watanabe N, McDonnell N, Takato T, Ohira M, Nakagawara A, et al. Identification of genes targeted by CpG island methylator phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor prognosis. *Oncology*. 2008;74:50–60.
- Alaminos M, Davalos V, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M. Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:1208–19.
- Grau E, Martínez F, Orellana C, Canete A, Yanez Y, Oltra S, et al. Hypermethylation of apoptotic genes as independent prognostic factor in neuroblastoma disease. *Mol Carcinog*. 2011;50:153–62.
- Yang Q, Kiernan CM, Tian Y, Salwen HR, Chlenski A, Brumback BA, et al. Methylation of CASP8, DCR2, and HIN-1 in neuroblastoma is associated with poor outcome. *Clin Cancer Res*. 2007;13:3191–7.
- Decock A, Ongenaert M, Hoebeek J, De Preter K, Van Peer G, Van Criekinge W, et al. Genome-wide promoter methylation analysis in neuroblastoma identifies prognostic methylation biomarkers. *Genome Biol*. 2012;13:R95.
- Mayol G, Martin-Subero JI, Rios J, Queiros A, Kulis M, Sunol M, et al. DNA hypomethylation affects cancer-related biological functions and genes relevant in neuroblastoma pathogenesis. *PLoS One*. 2012;7:e48401.
- Bianco C, Salomon DS. Targeting the embryonic gene Cripto-1 in cancer and beyond. *Expert Opin Ther Pat*. 2010;20:1739–49.
- Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME, Arjona D, Lomas J, de Campos JM, et al. CpG island methylation status and mutation analysis of the RB1 gene essential promoter region and protein-binding pocket domain in nervous system tumours. *Br J Cancer*. 2003;88:109–14.
- Grau E, Martínez F, Orellana C, Canete A, Yanez Y, Oltra S, et al. Epigenetic alterations in disseminated neuroblastoma tumour cells: influence of TMS1 gene hypermethylation in relapse risk in NB patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136:1415–21.
- Hoebeek J, Michels E, Pattyn F, Combaret V, Vermeulen J, Yigit N, et al. Aberrant methylation of candidate tumor suppressor genes in neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2009;273:336–46.
- Michalowski MB, de Fraipont F, Plantaz D, Michelland S, Combaret V, Favrot MC. Methylation of tumor-suppressor genes in neuroblastoma: The RASSF1A gene is almost always methylated in primary tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50:29–32.
- Lau DT, Hesson LB, Norris MD, Marshall GM, Haber M, Ashton LJ. Prognostic significance of promoter DNA methylation in patients with childhood neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18:5690–700.
- Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, et al. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPSC cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. *PLoS One*. 2010;5:e13017.
- Watanabe K, Meyer MJ, Strizzi L, Lee JM, Gonzales M, Bianco C, et al. Cripto-1 is a cell surface marker for a tumorigenic, undifferentiated subpopulation in human embryonal carcinoma cells. *Stem Cells*. 2010;28:1303–14.
- Rangel MC, Karasawa H, Castro NP, Nagaoka T, Salomon DS, Bianco C. Role of Cripto-1 during epithelial-to-mesenchymal transition in development and cancer. *Am J Pathol*. 2012;180:2188–200.
- Wutz A, Smrzka OW, Schweifer N, Schellander K, Wagner EF, Barlow DP. Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island. *Nature*. 1997;389:745–9.
- Cryns VL, Thor A, Xu HJ, Hu SX, Wierman ME, Vickery Jr AL, et al. Loss of the retinoblastoma tumor-suppressor gene in parathyroid carcinoma. *N Engl J Med*. 1994;330:757–61.
- Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest*. 2001;81:77–82.
- Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Lomas J, Arjona D, Alonso ME, Aminoso C, et al. Aberrant methylation of multiple genes in neuroblastic tumours.

- Relationship with MYCN amplification and allelic status at 1p. *Eur J Cancer*. 2003;39:1478–85.
34. Burgues O, Navarro S, Noguera R, Pellin A, Ruiz A, Castel V, 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*. 2006;449:410–20.
 35. Ambros IM, Benard J, Boavida M, Bown N, Caron H, Combaret V, et al. Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification. *J Clin Oncol*. 2003;21:2077–84.
 36. Noguera R, Canete A, Pellin A, Ruiz A, Tasso M, Navarro S, et al. MYCN gain and MYCN amplification in a stage 4S neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2003;140:157–61.
 37. Bibikova M, Le J, Barnes B, Saedinia-Melnyk S, Zhou L, Shen R, et al. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium(R) assay. *Epigenomics*. 2009;1:177–200.
 38. Kanduri M, Cahill N, Goransson H, Enstrom C, Ryan F, Isaksson A, et al. Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115:296–305.
 39. Tarazona S, Garcia-Alcalde F, Dopazo J, Ferrer A, Conesa A. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res*. 2011;21:2213–23.
 40. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B*. 1995;57:289–300.
 41. Simon N, Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization paths for Cox's proportional hazards model via coordinate descent. *J Stat Software*. 2011;39:1–13.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *TH* Y *DCX* EN SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA DE NBs NO METASTÁSICOS

La cohorte de estudio consistió en 102 pacientes con NB no metastásico de los que se analizaron 81 muestras de sangre periférica y 94 aspirados de médula ósea al diagnóstico. Los tumores primarios se localizaban fundamentalmente en el abdomen, las glándulas suprarrenales y en menor número en el tórax. De acuerdo a los criterios del *INSS* para el estadiaje de la enfermedad se estudiaron 38 estadios 1, 11 estadios 2 y 53 estadio 3. Los principales datos clínicos y biológicos se detallan en la tabla 2. Los datos relacionados con la detección de la expresión de los marcadores *TH* y *DCX* mediante RT-qPCR en sangre periférica y médula ósea se reflejan en la tabla 3.

	Sangre periférica			Médula ósea		
	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3
DCX+ (%)	4 (13%)	0 (0%)	9 (21%)	5 (15%)	1 (9%)	14 (29%)
TH+ (%)	5 (17%)	1 (12%)	5 (12%)	4 (12%)	1 (9%)	10 (20%)
DCX+ TH+ (%)	1 (3%)	0 (0%)	4 (9%)	2 (6%)	0 (0%)	8 (16%)
Pacientes con muestras positivas	8 (27%)	1 (12%)	10 (23%)	6 (18%)	2 (18%)	16 (33%)
Total de muestras	30	8	43	34	11	49
Total de pacientes	38	11	53	38	11	53

TABLA 3. Detección de la expresión de *DCX* y *TH* en sangre periférica y médula ósea en la cohorte de neuroblastomas no metastásicos.

Se comparó la supervivencia de los pacientes en función de la detección o no de la expresión génica conjunta de ambos marcadores en médula ósea al diagnóstico y no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia global ni libre de eventos. En cambio, al comparar la supervivencia de los pacientes en función de la detección o no de los marcadores en sangre periférica se encontraron resultados signifi-

cativos. Los NBs no metastásicos en los que se detectaba la expresión de *TH* y *DCX* en sangre periférica al diagnóstico, presentaban peor supervivencia libre de eventos que aquellos en los que no se detectaban los marcadores (Figura 4). Además, se confirmó en esta cohorte de pacientes que los NBs no metastásicos con histología desfavorable, *MYCN* amplificado o deleción de 1p presentaban tasas de supervivencia global y libre de eventos significativamente más bajas que aquellos sin dichos factores de riesgo (Figura 5). Sin embargo, no fue posible analizar si existía una asociación significativa entre la detección de ARNm de *TH* y *DCX* en sangre periférica y médula ósea y el resto de factores de riesgo conocidos, debido al escaso número de pacientes con enfermedad mínima detectable al diagnóstico.

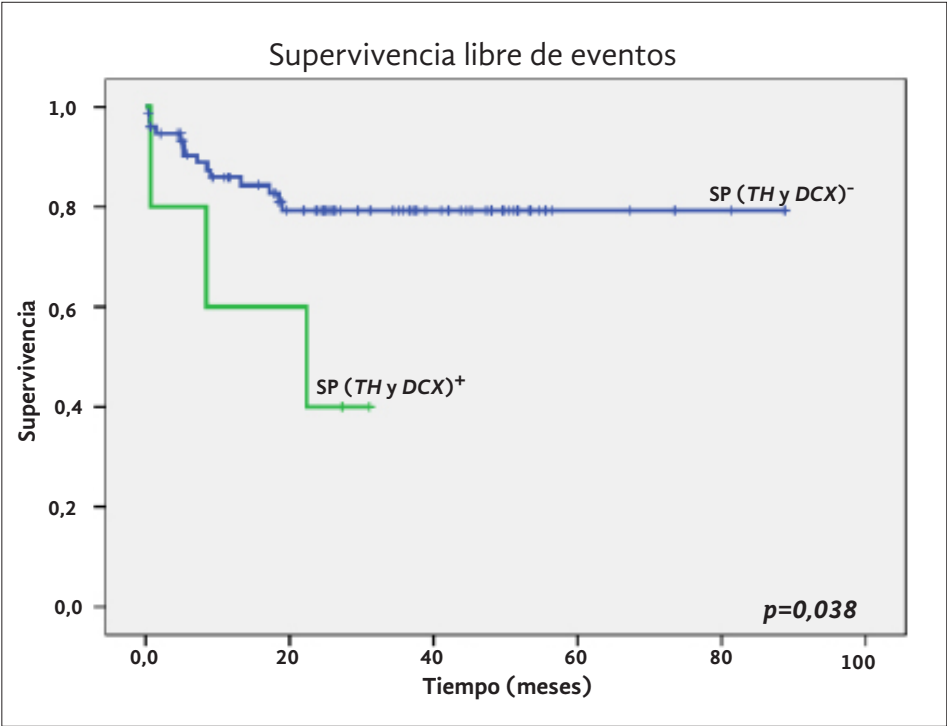


FIGURA 4. Efecto en la supervivencia de la detección de la expresión de *TH* y *DCX* en sangre periférica al diagnóstico en la cohorte de neuroblastomas no metastásicos. SP: sangre periférica.

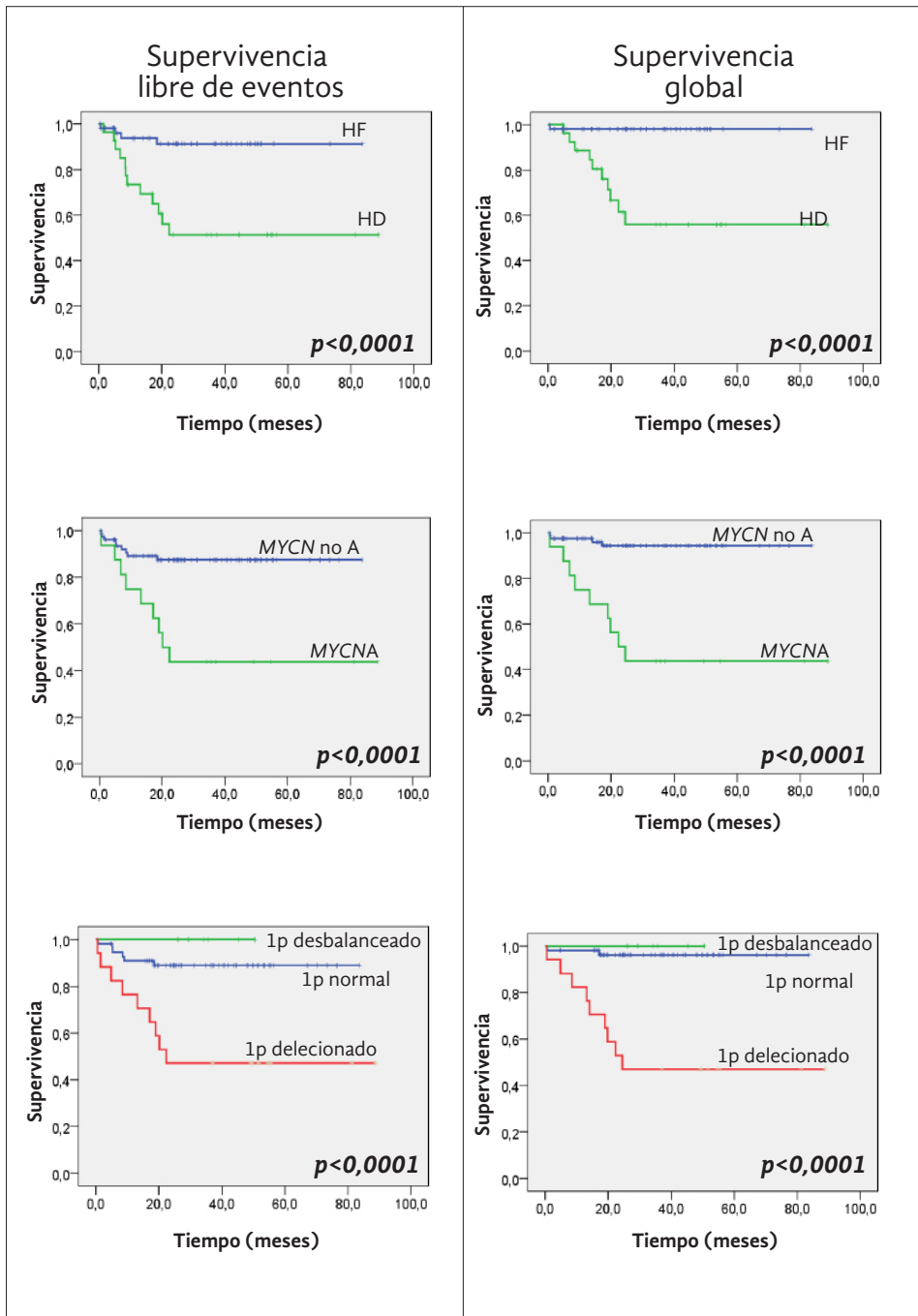


FIGURA 5. Efecto en la supervivencia global y libre de eventos de la histología, el estatus de *MYCN* y del cromosoma 1p en la cohorte de neuroblastomas no metastásicos. HF: histología favorable, HD: histología desfavorable; *MYCN* A: *MYCN* amplificado, *MYCN* no A: *MYCN* no amplificado.

Las tasas de supervivencia observadas en nuestra serie se corresponden con las esperadas en pacientes con enfermedad localizada (De Bernardi *et al.* 2008). De acuerdo con nuestros resultados, la presencia de ARNm de los genes *TH* y *DCX* en sangre periférica al diagnóstico predice una peor supervivencia libre de eventos, lo cual refleja la propensión a la diseminación de la enfermedad a través del torrente sanguíneo. Al separar los pacientes por estadios (estadios 1-2 vs. estadios 3), aquellos con estadio 3 en los que se detectaban los marcadores en sangre periférica, mostraban una mayor tendencia a presentar recaídas, pero las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas. Consideramos que realizar el análisis aumentando el número de pacientes con estadio 3 permitirá esclarecer el valor pronóstico de la detección de la expresión de *TH* y *DCX* en sangre periférica al diagnóstico en este subgrupo. Cabe destacar la ventaja que supone el valor predictivo de la detección de enfermedad mínima al diagnóstico en sangre periférica y no de médula ósea, por la facilidad para disponer de estas muestras para su estudio y lo poco invasivo que resulta el procedimiento en comparación con la realización de aspirados de médula ósea. La presencia de células tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes con tumores sólidos se ha correlacionado con el pronóstico (Steen *et al.* 2008; Botionellou *et al.* 2004). El NB, como otros tumores, presenta subpoblaciones celulares genéticamente heterogéneas y con diferente potencial para generar metástasis por lo que la presencia de las células tumorales circulantes es una condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de metástasis (Mocellin *et al.* 2006).

En el caso de los pacientes con estadios 1-2 de nuestra serie, el porcentaje de detección de los marcadores fue muy bajo y no se encontró ninguna asociación con la supervivencia. Cuatro de estos pacientes recayeron y en ninguno se detectaron los

marcadores en muestras de sangre periférica ni médula ósea. Estos resultados sugieren que la detección de la expresión génica de *TH* y *DCX* en sangre periférica y médula ósea al diagnóstico en este subgrupo de pacientes no tiene valor pronóstico.

6.2 DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *TH* Y *DCX* EN SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA DE NBs METASTÁSICOS

Para el estudio de la expresión de *TH* y *DCX* en sangre periférica y médula ósea mediante RT-qPCR se analizaron muestras de 162 pacientes con NB metastásico, el 73% de los cuales eran mayores de 12 meses al diagnóstico. De acuerdo a los criterios del *INRGSS* y el *INSS*, 146 pacientes eran estadios M (4) y 16 estadios MS (4S) respectivamente (el estadiaje de acuerdo al *INSS* aparece entre paréntesis). Las localizaciones más frecuentes del tumor primario fueron abdominales o suprarrenales y el 64% de los pacientes presentaban metástasis en médula ósea al diagnóstico. Los datos clínicos y biológicos más relevantes de la serie se describen en la tabla 4.

La frecuencia de detección de los dos marcadores y la mediana de expresión en sangre periférica y médula ósea al diagnóstico se detallan en la tabla 5 y figura 6a respectivamente. Se encontró una alta correlación entre ambos marcadores tanto en sangre periférica como en médula ósea ($\rho = 0,72$; $CI = 0,58-0,83$ y $\rho = 0,92$; $CI = 0,86-0,94$). Los análisis multivariados se realizaron considerando además de la expresión de los marcadores, la edad al diagnóstico, el estatus del oncogén *MYCN* y el estadio de la enfermedad. Dichos análisis revelaron que altos niveles de detección de expresión génica de *TH* y *DCX* en sangre periférica predicen una peor supervivencia global y libre de eventos (Tabla 6a). En médula ósea, altos niveles de expresión de *DCX*, pero no de *TH* se asocian a una peor supervivencia global y libre de eventos independien-

Características	Estadio (INRG)		
	M	MS	Total
Número de pacientes	146	16	162
Grupo de riesgo pre-tratamiento			
bajo	0	14	14
intermedio	20	0	20
alto	126	2	128
Edad al diagnóstico (months)			
mediana	36.7	5.3	33.8
rango	2.0 -267	0.2 - 13.6	0.2 - 267
Sexo			
femenino	57	9	66
masculino	89	7	96
Localización del tumor primario			
adrenal	57	11	68
abdominal	62	4	66
cervical	2	0	2
torácica	9	0	9
cervico-torácica	2	0	2
toraco-abdominal	4	1	5
cervico-toraco-abdominal	1	0	1
abdomino-pélvica	2	0	2
pélvica	3	0	3
intracraneal	1	0	1
sin tumor primario	2	0	2
no informado	1	0	1
Metástasis en MO al diagnóstico	103	2	105
Estatus de MYCN			
amplificado (%)	50 (34,2%)	2 (12,5%)	52 (32,1%)
no amplificado (%)	89 (61%)	13 (81,25%)	102 (63%)
no informado	7 (4,8%)	1 (6,25%)	8 (4,9%)
Pacientes con recaídas (%)	86 (58,9%)	3 (18,75%)	89 (54,9%)
Pacientes fallecidos (%)	79 (54,1%)	1 (6,25%)	80 (49,4%)
Mediana del tiempo de seguimiento (meses)	41,3	62,8	42,9

TABLA 4. Datos clínicos y biológicos de la cohorte de 162 neuroblastomas metastásicos.

	Frecuencia de detección (%)					
	Diagnóstico		Fin de la Inducción		Fin de tratamiento	
	SP	MO	SP	MO	SP	MO
ARNm <i>TH</i>	70.3	84.5	10.5	44.4	21.2	30.6
ARNm <i>DCX</i>	68.3	87.9	8.8	39.5	12.1	19.4

TABLA 5. Frecuencia de detección de la expresión de *TH* y *DCX* en sangre periférica (SP) y médula ósea (MO) al diagnóstico, post-quimioterapia de inducción y al final del tratamiento.

temente de la edad de los pacientes al diagnóstico, el estatus de *MYCN* o el estadio de la enfermedad. Es importante destacar que aplicando el criterio AKAIKE en los modelos multivariados para la selección del mejor modelo estadístico, se encontró que *TH* tiene una mayor capacidad predictiva que *DCX* ($\Delta AIC=1,35$). Este valor de ΔAIC refleja que existe un 70 % de evidencia de que el modelo de *TH* es mejor que el de *DCX*.

Por otro lado, se analizó el valor pronóstico independiente de la detección de la expresión de *TH* y *DCX* en la cohorte de pacientes con NB metastásico de alto riesgo. Los análisis multivariados identificaron como factor predictor independiente de la supervivencia global y libre de eventos, los niveles de expresión de *TH* en sangre periférica al diagnóstico (Tabla 6b). En este subgrupo de pacientes se evaluó al final de la quimioterapia de inducción, el valor predictivo de la detección de la expresión génica de *TH* y *DCX*. La frecuencia de detección de ambos marcadores y la mediana de expresión se especifican en la tabla 5 y figura 6b respectivamente. Los modelos multivariados incluyeron como covariables el estatus de *MYCN* y la edad al diagnóstico. La detección de la expresión de *TH* en sangre periférica y *DCX* en médula ósea al finalizar la quimioterapia de inducción, predice una peor supervivencia global y libre de eventos en los NBs metastásicos de alto riesgo independientemente del estatus *MYCN* y la edad. Además, la detección de la expresión de *TH* en médula ósea predice una peor supervivencia libre de eventos en dichos pacientes (Tabla 6c).

Finalmente, se analizó el valor predictivo de la detección de la expresión de los genes marcadores al finalizar el tratamiento en la cohorte de NBs metastásicos de alto riesgo. En la tabla 5 y la figura 6c se detallan la frecuencia de detección y la mediana de expresión de *TH* y *DCX* tanto en sangre periférica como en médula ósea. Pese al

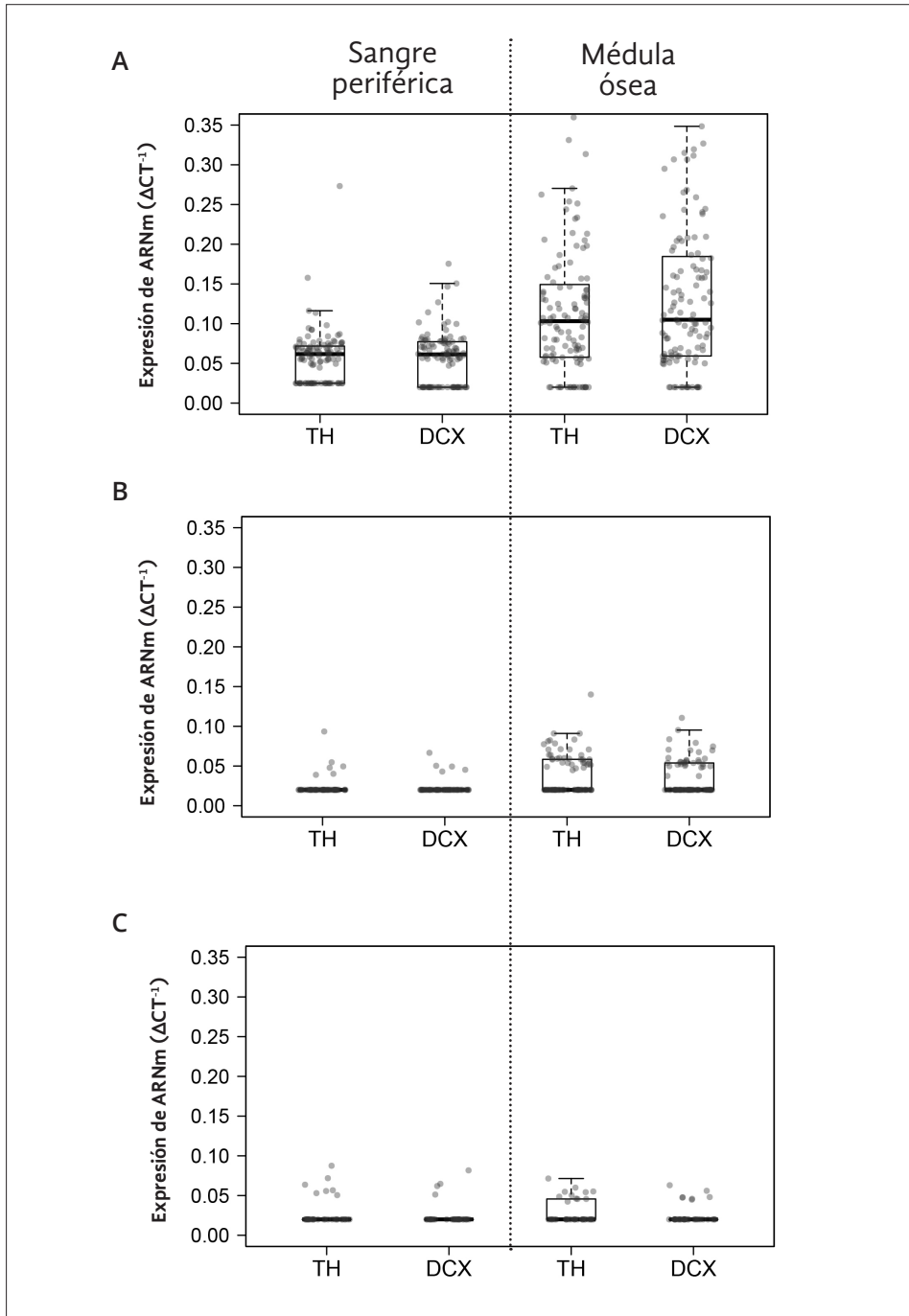


FIGURA 6. Niveles de expresión génica de *TH* y *DCX* en sangre periférica y médula ósea de pacientes con neuroblastoma metastásico. A: al diagnóstico. B: post-quimioterapia de inducción. C: al final del tratamiento.

A Modelo multivariable incluyendo como covariables: edad al diagnóstico, estatus de *MYCN* y estadio, en la cohorte de pacientes con NB metastásico al diagnóstico

Variable	HR	95% CI	<i>p</i> valor
Supervivencia libre de eventos			
ARNm <i>TH</i> en SP	1.3	[1.1, 1.5]	0.003
ARNm <i>DCX</i> en SP	1.2	[1.0, 1.3]	0.025
ARNm <i>TH</i> en MO	1.1	[1.0, 1.3]	0.06
ARNm <i>DCX</i> en MO	1.2	[1.0, 1.5]	0.04
Supervivencia global			
ARNm <i>TH</i> en SP	1.3	[1.1, 1.5]	0.004
ARNm <i>DCX</i> en SP	1.2	[1.0, 1.4]	0.01
ARNm <i>TH</i> en MO	1.1	[1.0, 1.3]	0.054
ARNm <i>DCX</i> en MO	1.3	[1.0, 1.5]	0.025

B Modelo multivariable incluyendo como covariables la edad al diagnóstico y el estatus de *MYCN* en los NBs metastásicos de alto riesgo al diagnóstico.

Variable	HR	95% CI	<i>p</i> valor
Supervivencia libre de eventos			
ARNm <i>TH</i> en SP	1.2	[1.0, 1.5]	0.015
ARNm <i>DCX</i> en SP	1.1	[1.0, 1.3]	0.11
ARNm <i>TH</i> en MO	1.1	[0.9, 1.2]	0.31
ARNm <i>DCX</i> en MO	1.1	[0.9, 1.4]	0.17
Supervivencia global			
ARNm <i>TH</i> en SP	1.3	[1.1, 1.5]	0.01
ARNm <i>DCX</i> en SP	1.2	[1.0, 1.3]	0.053
ARNm <i>TH</i> en MO	1.1	[0.9, 1.2]	0.29
ARNm <i>DCX</i> en MO	1.2	[1.0, 1.5]	0.12

C Modelo multivariable incluyendo como covariables la edad al diagnóstico y el estatus de *MYCN* en los NBs metastásicos de alto riesgo al final de la inducción.

Variable	HR	95% CI	<i>p</i> valor
Supervivencia libre de eventos			
ARNm <i>TH</i> en SP	2.7	[1.0, 7.3]	0.047
ARNm <i>DCX</i> en SP	2.4	[0.5, 11.6]	0.27
ARNm <i>TH</i> en MO	3.9	[1.2, 13.1]	0.026
ARNm <i>DCX</i> en MO	5.2	[1.6, 17.3]	0.007
Supervivencia global			
ARNm <i>TH</i> en SP	3.5	[1.3, 9.4]	0.013
ARNm <i>DCX</i> en SP	2.4	[0.5, 11.6]	0.27
ARNm <i>TH</i> en MO	3.6	[1.0, 13.3]	0.052
ARNm <i>DCX</i> en MO	3.6	[1.1, 4.2]	0.035

D Modelo multivariable incluyendo como covariables la edad al diagnóstico y el estatus de *MYCN* en los NBs metastásicos de alto riesgo al final del tratamiento.

Variable	HR	95% CI	<i>p</i> valor
Supervivencia libre de eventos			
ARNm <i>TH</i> en SP	2.4	[1.0, 5.7]	0.056
ARNm <i>DCX</i> en SP	3.4	[1.0, 11.6]	0.055
ARNm <i>TH</i> en MO	0.9	[0.02, 41.5]	0.98
ARNm <i>DCX</i> en MO	1.7	[0.03, 82.9]	0.79
Supervivencia global			
ARNm <i>TH</i> en SP	3.2	[1.2, 8.8]	0.026
ARNm <i>DCX</i> en SP	2.2	[0.5, 9.9]	0.31
ARNm <i>TH</i> en MO	0.06	[0, 6.9]	0.25
ARNm <i>DCX</i> en MO	2.8	[0.06, 132.1]	0.60

TABLA 6. Efecto en la supervivencia global y libre de eventos de los niveles de expresión génica de *TH* y *DCX* en sangre periférica (SP) y médula ósea (MO) al diagnóstico post-quimioterapia de inducción y al final del tratamiento. HR: hazard ratio.

limitado número de muestras analizadas, los modelos multivariantes revelaron que la detección de la expresión de *TH* en sangre periférica al finalizar el tratamiento de primera línea predice una peor evolución de los pacientes (Tabla 6d).

Los estudios para determinar la utilidad clínica de la detección de marcadores de EMR en pacientes afectados de NB y su valor pronóstico, se han visto limitados fundamentalmente por el escaso número de muestras analizadas en los distintos momentos de evaluación de la enfermedad y la falta de análisis multivariantes. Estos trabajos se han centrado fundamentalmente en paciente con NB metastásico de alto riesgo (Burchil *et al.* 2001; Träger *et al.* 2008; Stutterheim *et al.* 2011, Viprey *et al.* 2014). Recientemente el Grupo de Monitorización Molecular de SIOPEN publicó los resultados de un estudio multicéntrico internacional donde se revela que altos niveles de detección de ARNm de *TH* y *PHOX2B* en muestras de sangre periférica permiten identificar pacientes de ultra alto riesgo que deberían beneficiarse de nuevas estrategias de tratamiento (Viprey *et al.* 2014). En dicho estudio sólo se consideraron los NBs metastásicos de alto riesgo de acuerdo a los criterios del INRG, excluyendo aquellos casos de riesgos bajo e intermedio con metástasis al diagnóstico. Considerando que hay un porcentaje de estos pacientes que recaen y fallecen, resulta de gran utilidad identificar este subgrupo para tratarlos de manera más adecuada. En el presente trabajo se estudió una cohorte de NBs metastásicos, sin estratificar previamente a los pacientes por grupos de riesgo, y se analizó el valor pronóstico independiente de la detección de la expresión de los genes *TH* y *DCX* en sangre periférica y médula ósea al diagnóstico. Se pudo demostrar que altos niveles de detección de *TH* y *DCX* en sangre periférica y médula ósea predicen una peor supervivencia global y libre de eventos en NBs metastásicos. Nuestro trabajo y estudios previos multicéntricos, refuerzan la idea de

que los niveles de expresión de los marcadores de EMR en sangre periférica y médula ósea, deben ser incorporados como factores pronóstico en las futuras estrategias de estratificación de los pacientes en función del riesgo.

En el caso de los NBs metastásicos de alto riesgo, el estudio de la EMR en muestras de sangre periférica y médula ósea al finalizar la quimioterapia de inducción, podría ser de vital importancia para evaluar la efectividad del régimen de quimioterapia aplicado. Nuestros resultados al respecto revelan que la presencia de *TH* y *DCX* en médula ósea y de *TH* en sangre periférica predice una peor supervivencia de los pacientes independientemente del estatus de *MYCN* y la edad. Resultados similares fueron descritos recientemente por el grupo de Monitorización Molecular de SIOPEN (Viprey *et al.* 2014). Consideramos que es necesario comprobar si la intensificación del tratamiento en NBs con una respuesta molecular insuficiente a la quimioterapia de inducción, mejora la supervivencia de los pacientes en ensayos clínicos multicéntricos y aleatorizados.

El análisis de la detección de la expresión de *TH* y *DCX* al final del tratamiento fue llevado a cabo con un limitado número de muestras de NBs metastásicos de alto riesgo. No obstante, los análisis multivariantes revelan que la detección de la expresión *TH* en sangre periférica es un factor de mal pronóstico independientemente del estatus de *MYCN* y la edad al diagnóstico. Serán necesarios estudios multicéntricos cooperativos posteriores para aclarar la relevancia clínica de la detección de EMR en sangre periférica y médula ósea al finalizar el tratamiento. Considerando las bajas tasas de supervivencia de los NBs metastásicos que recaen, deberían contemplarse nuevos regímenes de terapias de mantenimiento en función del estatus de remisión real de los pacientes. La detección precisa de EMR, indetectable por métodos conven-

cionales, podría identificar precozmente las recaídas antes de la aparición de sintomatología clínica.

Existen estudios que apoyan que *TH* y *DCX* no son marcadores 100% específicos para la detección de células neuroblásticas debido a que se han detectado a bajos niveles en muestras de individuos sanos (Kuçi *et al.* 2006 y Corrias *et al.* 2011). Bajo nuestras condiciones experimentales y en la puesta a punto de la metodología, no se han detectado ninguno de los dos marcadores en donantes sanos. Utilizar varios marcadores para la detección de EMR aumenta la sensibilidad y especificidad de las determinaciones. Recientemente en nuestro laboratorio se ha incluido a *PHOX2B* en los estudios de la EMR siguiendo las recomendaciones del grupo europeo de Monitorización Molecular de SIOPEN. La utilización de *PHOX2B* permite una identificación específica de células neuroblásticas (Stutterheim *et al.* 2008). No obstante, el hecho de que no se detecte la expresión génica de *PHOX2B* en ciertas poblaciones celulares de NB, refuerza la necesidad de utilizar biomarcadores complementarios.

En resumen, la RT-qPCR es una técnica sensible que permite evaluar de manera precisa la presencia de micrometástasis en pacientes afectados de NB. La detección de la expresión de los genes *TH*, *DCX* y *PHOX2B*, los tres marcadores consensuados por los grupos cooperativos europeos, en muestras de sangre periférica y médula ósea al diagnóstico y en diferentes momentos durante el curso de la enfermedad, es de vital importancia para mejorar la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo y evaluar la respuesta al tratamiento. En el caso de los NB no metastásicos con tumores primarios irresecables al diagnóstico, sería interesante evaluar la utilidad clínica de la detección de los marcadores de EMR en sangre periférica y médula ósea en estudios prospectivos multicéntricos con una serie amplia de pacientes. En estos pacientes, así

como en los NBs metastásicos considerados de riesgo intermedio y bajo, la evaluación de la repercusión clínica de la detección de los marcadores en las distintas fases del proceso terapéutico y al final del tratamiento es un reto para futuros estudios.

6.3 IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES EPIGENÉTICOS EN NB MEDIANTE ARRAYS DE METILACIÓN

Aunque el estudio de las alteraciones genéticas implicadas en la patogénesis del NB ha permitido mejorar la supervivencia de los pacientes y adecuar el tratamiento en función de factores de riesgo biológicos, los pacientes con tumores agresivos y sobre todo aquellos que recaen, siguen teniendo un pronóstico nefasto. Esto sugiere que el conocimiento actual es insuficiente para explicar la complejidad de este tumor. En la última década numerosos estudios destacan el papel de los mecanismos epigenéticos en la progresión del NB. El análisis de la metilación aberrante de todo el genoma es una buena herramienta para identificar biomarcadores del comportamiento clínico de la enfermedad.

Para identificar alteraciones en el patrón de metilación se estudiaron muestras de tumor primario de 131 pacientes diagnosticados de NB en el período de 1996 al 2010. Los pacientes fueron cuidadosamente seleccionados para tener todos los subgrupos de NB representados de forma homogénea. Inicialmente se hibridaron muestras de 48 pacientes utilizando la plataforma de Illumina (HumanMethylation27 BeadChip). Las variables clínicas y biológicas más relevantes de esta serie se detallan en la tabla 7. Al analizar los datos del nivel de metilación de cada CpG se encontró que seguían una distribución bimodal (Figura 7A). De acuerdo a dicha distribución y empleando el método minAS se establecieron puntos de corte para el análisis de manera que valores

iguales o inferiores a 0.3 indicaban hipometilación y superiores a 0.7 hipermetilación.

Se analizaron las diferencias en el nivel de metilación de las CpG de cada gen entre subgrupos de NBs mediante tests de proporciones. Se encontró una asociación signi-

Características	Estadio INRG				
	L1	L2	M	MS	Total
Número de pacientes	10	16	18	4	48
Grupo de riesgo pre-tratamiento					
muy bajo + bajo	10	2	0	3	15
intermedio	0	10	2	0	12
alto	0	4	16	1	21
Edad al diagnóstico en meses					
mediana	11,1	18,6	27,6	4	16,1
rango	1.5 - 22.7	4.8 - 109.3	6.6 - 79.8	1.9 - 6.7	1.5 - 109.3
Pacientes > de 18 meses al diagnóstico	4	9	11	0	24
Sexo					
femenino	6	8	6	2	22
masculino	4	8	12	2	26
Localización del tumor primario					
suprarrenal	1	5	9	3	18
abdominal	4	5	2	0	11
cervical	0	1	0	1	2
torácica	2	0	4	0	6
cervico-torácica	0	1	0	0	1
torácica-abdominal	1	1	0	0	2
Pélvica	1	0	0	0	1
other sites	1	3	3	0	7
Estatus de MYCN					
amplificado (%)	0 (0%)	4 (25%)	8 (44%)	1 (25%)	13 (27%)
no amplificado (%)	10 (100%)	12 (75%)	10 (56%)	3 (75%)	35 (73)
Estatus de 1p					
normal (%)	8 (80%)	8 (50%)	8 (44%)	3 (75%)	27 (56%)
deleciónado (%)	0 (0%)	4 (25%)	7 (39%)	0 (0%)	11 (23%)
no determinado (%)	2(20%)	4 (25%)	3 (17%)	1 (25%)	10 (21%)
Pacientes con recaídas (%)	1 (10%)	7 (44%)	11 (61%)	1 (25%)	20 (42%)
Tipo de recaída					
local	1	5	2	0	8
metastásica	0	1	3	1	5
local + metastásica	0	1	6	0	7
Exitus(%)	0 (0%)	5 (32%)	12 (67%)	1 (25%)	18 (38%)
Causa del exitus					
progresión de la enfermedad	0	4	11	1	16
otras causas	0	1	1	0	2
Tiempo de seguimiento (meses)					
mediana	152,1	93,5	45,4	129,3	117,4
rango	87.8-208.3	9.4-206.5	3.4-161.2	17.2-214.9	3.4-214.9

TABLA 7. Datos clínicos y biológicos de la cohorte inicial de 48 neuroblastomas.

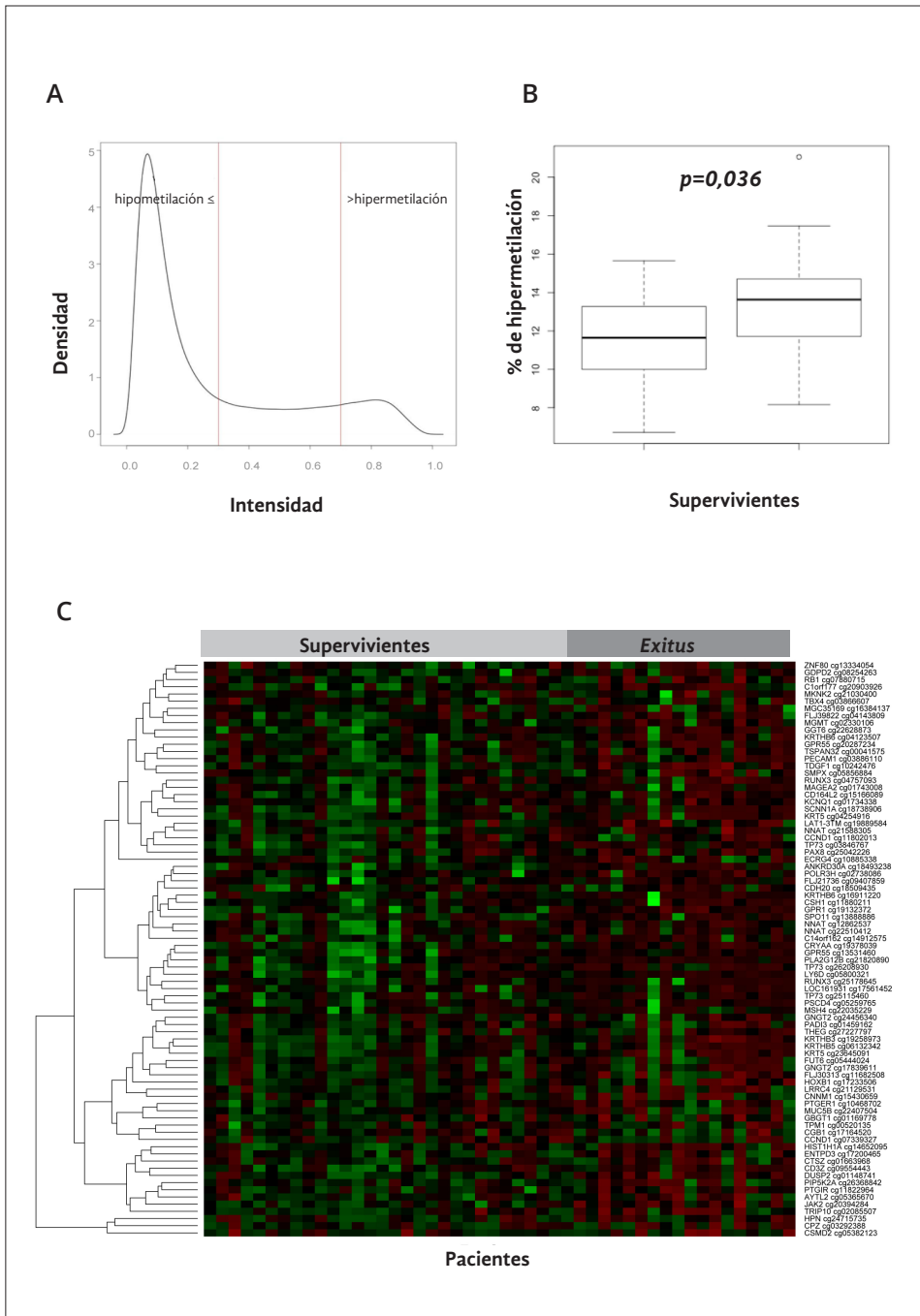


FIGURA 7. Perfil de metilación del ADN en la cohorte inicial de 48 neuroblastomas. A: frecuencia de CpGs en base a sus niveles de metilación. B: asociación entre la supervivencia y la hipermetilación global de los genes. C: *heatmap* representativo de la metilación diferencial de 70 genes entre supervivientes y fallecidos.

ficativa entre la supervivencia y la hipermetilación global de los genes ($p=0,036$). Los pacientes fallecidos a causa de la enfermedad presentaban tasas de hipermetilación mayores que los supervivientes (Figura 7B). No se encontró una asociación significativa entre la supervivencia y la hipometilación global de las regiones promotoras. Las comparaciones entre subgrupos de pacientes en función de la edad al diagnóstico, el estatus de *MYCN* o la presencia de recaídas no arrojaron resultados significativos. Sin embargo, al agrupar los pacientes por estadios de acuerdo a los criterios del *INRGSS* (L1 y MS vs L2 vs M) se observó una metilación diferencial, casi significativa, de *RUNX3* ($p=0.05$). Estos resultados sugieren que el análisis del estatus de hipermetilación global de las regiones promotoras al diagnóstico puede predecir la supervivencia de los pacientes y que los diferentes estadios de NB podrían asociarse a cambios en el patrón de metilación de genes específicos.

Los resultados más relevantes salieron a la luz al comparar los niveles de metilación del subgrupo de NBs de alto riesgo fallecidos a causa de la enfermedad y los supervivientes. De este análisis se identificaron 70 genes cuyo grado de metilación diferenciaba de manera significativa ambos subgrupos de pacientes (Figura 7C). Se seleccionaron 16 genes para su posterior validación, teniendo en cuenta su implicación en cáncer, dejando el resto para futuros estudios. Las funciones celulares en las que participan los genes candidatos son: la maduración y el mantenimiento de la estructura del sistema nervioso (*NNAT*); la progresión del ciclo celular (*CCND1*, *JAK2*, *RB1*, *LRRC4* y *TP73*); el crecimiento y la diferenciación celular (*DUSP2*, *PAX8* y *HPN*); la tumorigénesis (*MAGEA2*, *RUNX3*, *CTSZ*, *TDGF1* y *TSPAN32*); la apoptosis (*JAK2* y *ECRG4*) y los mecanismos de reparación del ADN (*MGMT*) (Tabla 8).

Genes	CpGs significativas	Total de CpGs	p valores	Función del gen
<i>NNAT</i>	3	7	0,018; 0,021; 0,032	Maduración y mantenimiento de las estructuras del sistema nervioso
<i>TP73</i>	3	12	0,004; 0,032; 0,047	Regulación del ciclo celular e inducción de la apoptosis
<i>CCND1</i>	2	18	0,034; 0,048	Control del ciclo celular en la transición G1/S
<i>RUNX3</i>	2	19	0,0004; 0,039	Gen supresor tumoral
<i>CTSZ</i>	1	7	0,037	Tumorigénesis y formación de metástasis
<i>DUSP2</i>	1	2	0,012	Implicado en la proliferación y la diferenciación celular
<i>HPN</i>	1	2	0,023	Crecimiento celular y mantenimiento de la morfología de la célula
<i>JAK2</i>	1	1	0,036	Control del ciclo celular, apoptosis, recombinación mitótica, modificación de histonas
<i>LRRC4</i>	1	2	0,014	Función desconocida. Está desregulado en tumores cerebrales
<i>MAGEA2</i>	1	2	0,034	Involucrado en el desarrollo embrionario y en la transformación tumoral de las células
<i>MGMT</i>	1	26	0,031	Implicado en la reparación del ADN
<i>PAX8</i>	1	2	0,008	Implicado en la organogénesis y carcinogénesis
<i>ECRG4</i>	1	2	0,004	Gen antiapoptótico
<i>RB1</i>	1	21	0,048	Inhibición de la proliferación celular
<i>TDGF1</i>	1	2	0,037	Implicado en el desarrollo embrionario y el crecimiento tumoral.
<i>TSPAN32</i>	1	2	0,008	Posible gen supresor tumoral

TABLA 8. Genes significativamente hipermetilados seleccionados para su validación por pirosecuenciación.

6.3.1 VALIDACIÓN DEL VALOR PRONÓSTICO DE LOS PERFILES EPIGENÉTICOS ENCONTRADOS MEDIANTE PIROSECUENCIACIÓN

El nivel de metilación de los 16 genes seleccionados se validó por pirosecuenciación diseñando cuidadosamente cebadores que flanquearan las CpG específicas encontra-

das hipermetiladas en el *array*. Para este análisis se emplearon muestras de tumor primario al diagnóstico de una cohorte de validación de 83 NB. La serie de validación incluía: 12 estadios L1, 21 estadios L2, 42 estadios M y 8 estadios MS. Los principales datos clínicos y biológicos se reflejan en la tabla 9.

Los datos de metilación obtenidos de la pirosecuenciación no seguían una distribución bimodal y variaban entre los diferentes genes. Por tal motivo, las variables fueron consideradas como continuas para los análisis multivariados. Se realizó un análisis multivariado de la varianza (MANOVA) para comparar el grado de metilación de los 16 genes entre subgrupos establecidos en base a parámetros clínicos y biológicos como la edad al diagnóstico (menores de 18 meses vs. mayores de 18 meses); el estatus de *MYCN* (pacientes con *MYCN* amplificado vs. pacientes con *MYCN* no amplificado); el estadio (NBs localizados L1-L2 vs. NBs metastásicos M-MS), grupo de riesgo (riesgos bajo e intermedio vs. altos riesgo) y la presencia o no de recaídas y/o *exitus*. Dichos análisis revelaron que los pacientes con tumores metastásicos, los mayores de 18 meses al diagnóstico, los que presentaban *MYCN* amplificado y aquellos que habían recaído y/o fallecido a causa de la enfermedad presentaban, de manera global, mayores tasas de metilación de las regiones promotoras de los genes estudiados (Figura 8). En particular, los niveles de metilación de *TDGF1* y *PAX8* diferenciaban claramente todos los subgrupos de pacientes comparados. Además, altas tasas de metilación de *RUNX3*, *ECRG4*, *CTSZ* y *RBI* también permitían diferenciar todos los subgrupos excepto cuando se comparaban los pacientes en función del estatus de *MYCN*. Los pacientes con *MYCN* amplificado presentaban además, mayores tasas de metilación de los genes *DUSP2*, *TP73*, *JAK2*, *MGMT* y *HPN* que los pacientes con *MYCN* no amplificado y aquellos mayores de 18 meses al diagnóstico presentaban mayores tasas de metilación

Características	Estadio INRG				
	L1	L2	M	MS	Total
Número de pacientes	12	21	42	8	83
Pacientes > de 18 meses al diagnóstico	3	8	38	0	49
Sexo					
femenino	8	6	16	3	33
masculino	4	15	26	5	50
Estatus de MYCN					
amplificado (%)	0	8 (38%)	16 (38%)	1 (12.5%)	25 (30%)
no amplificado (%)	12 (100%)	13 (62%)	23 (55%)	7 (87.5%)	55 (66%)
no determinado (%)	0	0	3 (7%)	0	3 (4%)
Pacientes con recaídas (%)	3 (25%)	5 (24%)	22 (52%)	0	30 (36%)
Exitus (%)	0	6 (29%)	25 (60%)	0	31 (37%)

TABLA 9. Datos clínicos y biológicos de la cohorte de validación de 83 neuroblastomas.

de *LRRC4* y *CCND1* que los menores de esta edad al debutar con la enfermedad (Figuras 8C y 8B respectivamente).

Para estudiar el efecto en la supervivencia del grado de metilación de los 16 genes se evaluaron cada uno como variable pronóstico independiente utilizando un modelo de regresión de Cox penalizada. Los resultados de este análisis mostraron que altas tasas de metilación de *RB1* y *TDGF1* predicen una peor supervivencia global y libre de eventos de los pacientes (Tabla 5A y 5B). Por otra parte la metilación de *PAX8* también predice una peor supervivencia global. Con este modelo también se confirma el valor pronóstico independiente de factores de riesgo ya conocidos en NB como el estadio, el estatus de *MYCN* y la edad, lo cual apoya la validez del mismo. El coeficiente de penalización de cada variable se asocia directamente a la supervivencia, así, el estatus de *MYCN* y el estadio tienen la mayor influencia en la supervivencia seguidos del grado de metilación de *TDGF1* y *RB1*.

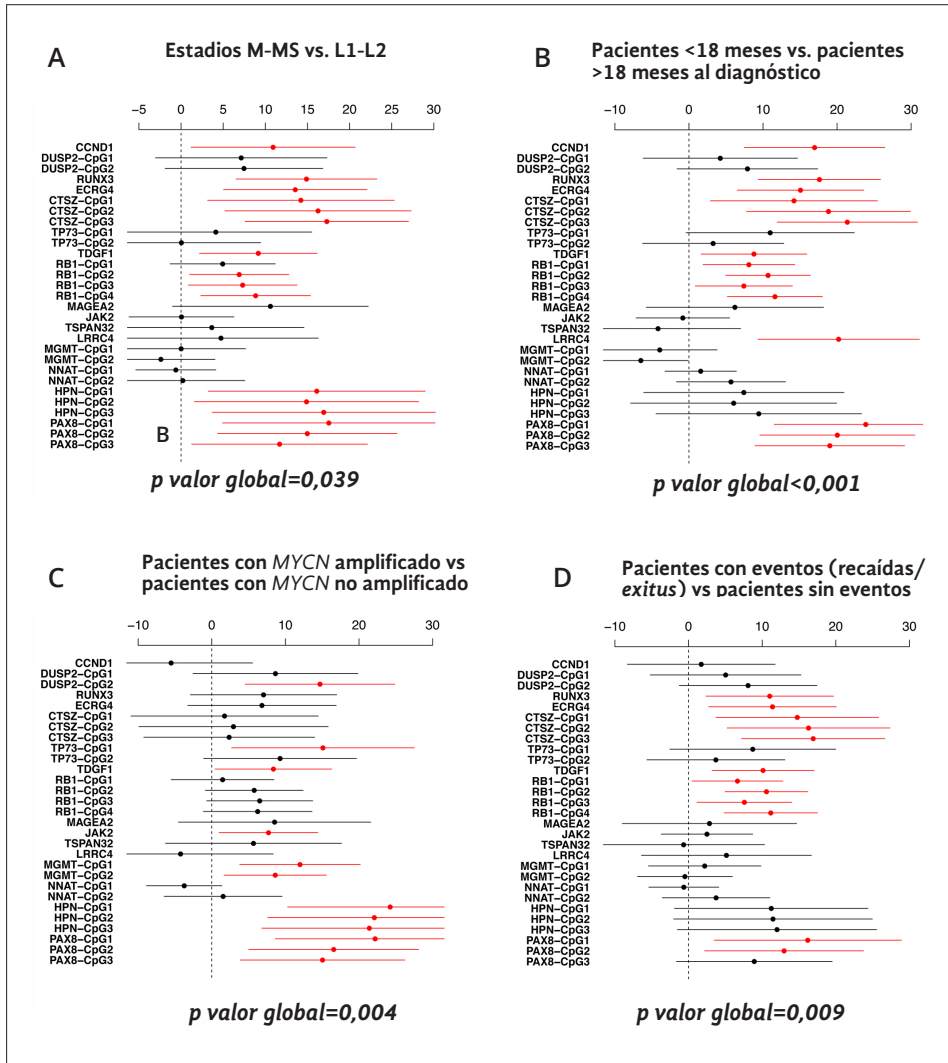


FIGURA 8. Diferencias en el nivel de metilación de los 16 genes validados entre subgrupos de neuroblastomas. A: estadios M-MS vs. L1-L2. B: pacientes <18 meses vs. pacientes >18 meses al diagnóstico. C: pacientes con *MYCN* amplificado vs pacientes con *MYCN* no amplificado. D: pacientes con eventos (recaídas/exitus) vs pacientes sin eventos. El *p* valor global prueba la hipótesis de igual nivel de metilación de los genes entre los grupos comparados.

Hasta la fecha existen pocos estudios epigenéticos que analicen de manera global la metilación aberrante en todo el genoma en NB. La mayoría de los estudios previos se basaban en la preselección de genes candidatos para su posterior análisis, lo cual

limitaba la búsqueda de nuevos biomarcadores (Alaminos *et al.* 2004; Grau *et al.* 2010; Hoebeekck *et al.* 2009 y Michalowski *et al.* 2008). Un trabajo reciente describe nuevos marcadores epigenéticos de interés en NB mediante el análisis de la metilación global en líneas celulares de NB (Decock *et al.* 2012). Aunque los genes seleccionados se validan en muestras de tumor primario de pacientes afectados de NB, esta aproximación puede obviar eventos epigenéticos del tumor primario debido a los cambios que pueden ocurrir a consecuencia de los procesos de perpetuación de las líneas. En nuestro estudio se analiza la metilación global en muestras de tumor primario de NB sin hacer preselección de genes. Mayol y colaboradores emplearon, como en nuestro trabajo, la plataforma de Illumina HM27K para el análisis de la metilación global en NB. En dicho estudio, pese a analizar una serie limitada de pacientes (22 NBs en la cohorte inicial y 13 en la de validación), se identifica un perfil de metilación diferente en los NBs en comparación con el perfil encontrado en el tejido sano control. Además se describe un patrón de hipermetilación e hipometilación asociado subgrupos clínicamente relevantes en NB. Los genes diferencialmente hipometilados identificados en este estudio, están implicados en funciones biológicas relacionadas con el desarrollo tumoral y son relevantes en la patogénesis del NB (Mayol *et al.* 2012). Una publicación más reciente postula que los cambios en la metilación del ADN en NB, ocurren no sólo las regiones promotoras, sino también regiones inter e intragénicas y afectan dominios funcionales de la cromatina y genes de relevancia en cáncer (Gómez *et al.* 2015). En su conjunto, estos trabajos refuerzan el papel de los eventos epigenéticos en la biología de este tumor.

6.3.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE *RB1* Y *TDGF1* EN NB

En nuestro trabajo se identifican dos genes (*RB1* y *TDGF1*) cuyo nivel de metilación

del ADN predice, de manera independiente, una peor supervivencia global y libre de eventos de los pacientes. La metilación de las regiones promotoras de *RB1* y *TDGF1* es uno de los mecanismos responsables de la desregulación de la expresión de estos genes en algunos tumores (Bianco *et al.* 2010 y González-Gómez *et al.* 2003). Por ello, exploramos su expresión en una cohorte de 251 NBs utilizando la plataforma de análisis de microarrays R2 (<http://r2.arnc.nl>). Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 9. Las curvas de Kaplan-Meier revelan que la presencia de bajos niveles de expresión de *RB1* se asocia a tasas de supervivencia más bajas de los pacientes (Figura 9A). Basados en estos resultados, la hipermetilación de la región promotora de *RB1* podría contribuir a su silenciamiento transcripcional e influir en el desarrollo del NB.

La pérdida de expresión de *RB1* parece ser indicador pronóstico en varios tipos de tumores y se asocia a un mayor grado de malignidad (Cryns *et al.* 1994 y Nakamura *et al.* 2001). La hipermetilación de islas CpGs de *RB1* es un evento epigenético común en tumores del sistema nervioso central (González-Gómez *et al.* 2003). En glioblastomas está descrito que existe una alta correlación entre la falta de expresión de *RB1* y la hipermetilación de la región promotora de dicho gen (Nakamura *et al.* 2001). En NB se ha descrito la presencia de hipermetilación de la región promotora de *RB1*, sin encontrar relación entre dicho evento y la supervivencia de los pacientes (González-Gómez *et al.* 2003). Esto puede ser debido a la metodología empleada, teniendo en cuenta que la PCR específica de metilación (técnica empleada en el estudio antes mencionado) no permite el estudio de la gran mayoría de CpGs de la región promotora de dicho gen, a diferencia de los estudios de la metilación aberrante en todo el genoma. En tal sentido, en nuestro trabajo se describe por primera vez que el grado de metilación de la región promotora de *RB1* se asocia a un peor pronóstico de los pacientes.

Al analizar la asociación entre la expresión de *TDGF1* y la supervivencia, encontramos que bajos niveles de expresión de dicho gen se asocian a un mejor pronóstico de los NBs (Figura 9B). Teniendo en cuenta que al evaluar el efecto en la supervi-

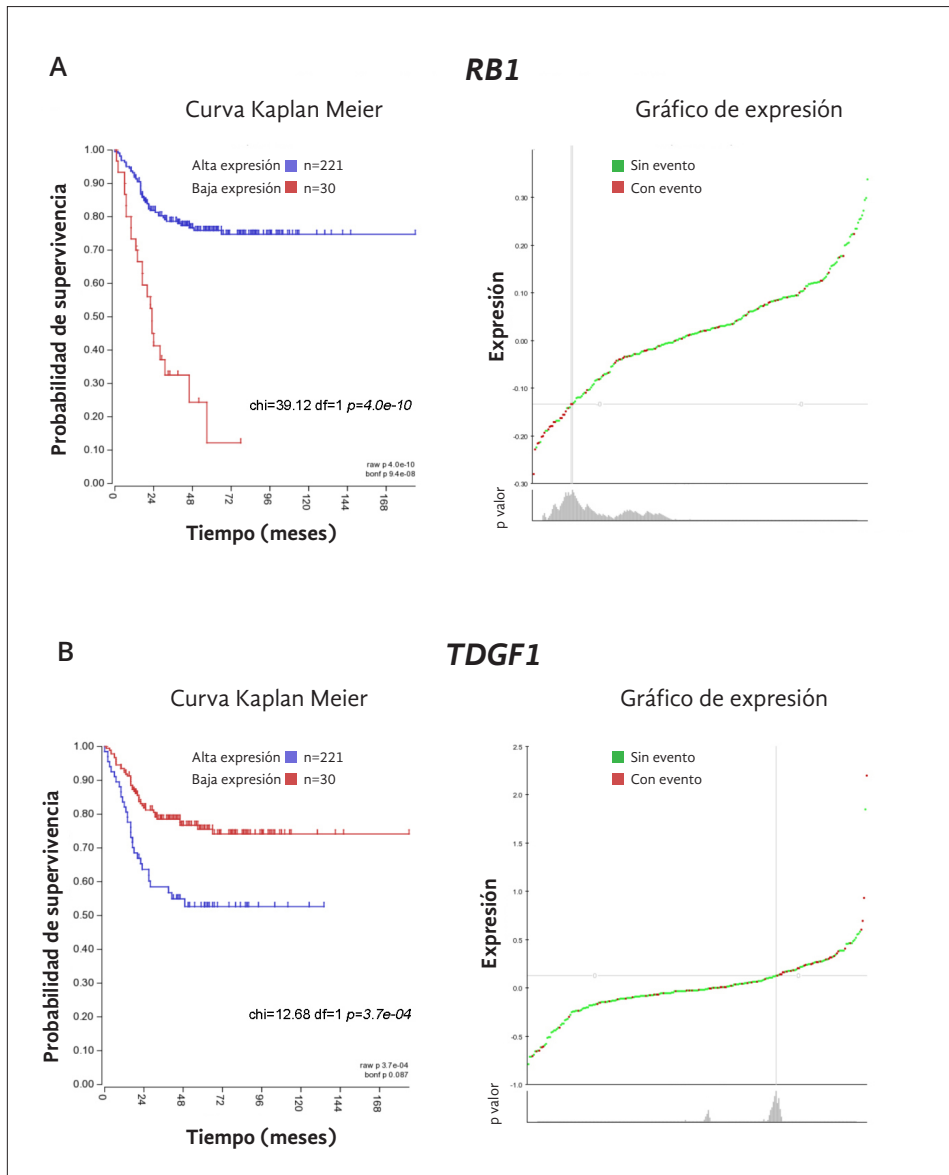


FIGURA 9. Análisis de la expresión de *RB1*(A) y *TDGF1*(B) en una nueva cohorte de 251 neuroblastomas usando la plataforma R2 (<http://r2.arnc.nl>).

vencia del grado de metilación *TDGF1* encontramos que altos niveles de metilación de dicho gen afectan negativamente la supervivencia de los pacientes, los análisis de expresión sugieren que este evento epigenético particular en la cg10242476, no está implicado en su silenciamiento en NB. Para elucidar la existencia de una correlación positiva entre la metilación de *TDGF1* y su expresión, exploramos la correlación entre la expresión de *TDGF1* y de las ADN- metiltransferasas 1, 3A y 3B. Los resultados de este análisis revelan la existencia de una correlación positiva entre la expresión de *TDGF1* y *DNMT1* y *DNMT3B* lo cual apoya la idea de que la metilación del ADN también puede estar implicada en el aumento la expresión de *TDGF1*.

Está descrito en la literatura que la región promotora de *TDGF1* se encuentra hipometilada y en consecuencia hay una alta expresión del gen en células madres embrionarias y en células humanas pluripotentes inducidas (Nishino *et al.* 2010). Pese a que en dicho estudio se usa la misma plataforma de *array* que en el nuestro, la CpG que encontramos altamente metilada y que predice una peor supervivencia global y libre de eventos de los NBs no es la misma, sino que se encuentra en el primer exón (5' UTR) del gen (cg10242476). Se ha visto que *TDGF1* se sobreexpresa en cáncer de mama, colorectal y en cáncer de estómago y que los altos niveles de expresión se asocian a un peor pronóstico de los pacientes (Rangel *et al.* 2012). Usando la plataforma R2, confirmamos que altos niveles de expresión de *TDGF1* están también asociados a un peor pronóstico en NB. Basándonos en estas evidencias podría decirse que altas tasas de metilación de la CpG cg10242476 podrían correlacionarse con una alta expresión de *TDGF1* y con un peor pronóstico de los NBs. Curiosamente este sitio CpG se localiza en el primer exón de la variante 1 del gen (NM_003212) que coincide con el primer intrón de la variante 2 (NM_001174136). Una posible explicación para

esta correlación es que la metilación de la CpG intrónica conlleva a la expresión de la variante 2 del gen. En este sentido, la regulación de la expresión del gen improntado que codifica para el factor de crecimiento insulínico tipo 2 (*IGF2R*) está mediada por la metilación de CpGs intrónicas (Wutz *et al.* 1997). En su conjunto, estos resultados sugieren que la hipometilación de la CpG cg27371741 localizada en el primer exón la variante 1 del gen *TDGF1* regula su expresión en células madre embrionarias mientras que la metilación de la CpG intrónica (cg10242476) de la variante 2, regula positivamente la expresión de dicho gen en NB.

A la vista de estos resultados, podemos concluir que los perfiles epigenéticos identificados en este estudio, constituyen biomarcadores predictivos de la agresividad y la progresión del NB. Considerando el pronóstico infausto de los NB de alto riesgo, el análisis de estos perfiles puede ayudar a optimizar los actuales sistemas de estratificación de los pacientes y orientar en la terapéutica en relación a futuros ensayos clínicos con fármacos desmetilantes.

7. CONCLUSIONES

En relación a los estudios de la detección de la expresión génica de *TH* y *DCX* en pacientes con tumores localizados y metastásicos concluimos:

1 La detección de la expresión génica conjunta de *TH* y *DCX* en sangre periférica y no en médula ósea al diagnóstico, predice una peor supervivencia libre de eventos de los pacientes con tumores localizados.

2 En los NBs no metastásicos estadios 1 y 2, no se encontraron evidencias de que la detección de la expresión génica de *TH* y *DCX* en sangre periférica y médula ósea al diagnóstico tenga valor pronóstico. Sin embargo, los NBs estadios 3 en los que se detecta la expresión conjunta de los genes *TH* y *DCX* en sangre periférica al diagnóstico, muestran una tendencia a un peor supervivencia libre de eventos.

3 En los NBs metastásicos, altos niveles de detección de la expresión génica de *TH* y *DCX* en sangre periférica al diagnóstico, predicen una peor supervivencia global y libre de eventos independientemente de la edad, el estatus de *MYCN* o el estadio de la enfermedad. Además, la presencia de altos niveles de expresión de *DCX* en médula ósea al diagnóstico se asocia a un mal pronóstico de los pacientes.

4 En los NBs metastásicos de alto riesgo, altos niveles de expresión génica de *TH* en sangre periférica al diagnóstico, predicen una peor supervivencia de los pacientes independientemente del estatus de *MYCN* y la edad de los pacientes al debutar con la enfermedad. Al finalizar la quimioterapia de

inducción, la detección de la expresión de *TH* en sangre periférica y médula ósea tiene valor pronóstico independiente, al igual que la detección de la expresión génica de *DCX* en médula ósea. Al final del tratamiento, la detección de la expresión génica de *TH* en sangre periférica, predice una peor evolución de los NBs de alto riesgo con enfermedad metastásica, independientemente de la edad al diagnóstico y el estatus de *MYCN*.

Con respecto a la identificación de biomarcadores epigenéticos en NB concluimos que:

- 1 La tasa de hipermetilación global de las regiones promotoras es mayor en los NBs que fallecen a causa de la enfermedad, que en los supervivientes. No se encontró asociación significativa entre la supervivencia y la hipometilación global de las regiones promotoras.
- 2 Se identificaron 70 genes capaces de diferenciar pacientes con NB de alto riesgo fallecidos a causa de la enfermedad, de los supervivientes.
- 3 La tasa de metilación global de los 16 genes validados permite diferenciar subgrupos de NB en función de la edad al diagnóstico, el estatus de *MYCN*, la presencia o no de metástasis y la supervivencia.
- 4 Los pacientes mayores de 18 meses, con *MYCN* amplificado, con enfermedad metastásica y/o que han recaído o fallecido a causa de la enfermedad, presentan mayores tasas de metilación de *TDGF1* y *PAX8* que aquellos menores de 18 meses al diagnóstico, con tumores localizados, *MYCN* no amplificado y que no han recaído ni fallecido.

5 Los pacientes con *MYCN* amplificado presentan mayores de tasas de metilación de *DUSP2*, *TP73*, *JAK2*, *MGMT* y *HPN* que los que no tienen dicho oncogén amplificado.

6 Se encontró un perfil epigenético con valor pronóstico independiente en NB: altas tasas de metilación de *TDGF1* y *RB1* predicen una peor supervivencia de los pacientes.

7 La metilación de la región promotora de *RB1* podría contribuir a su silenciamiento e influir en el desarrollo y la agresividad del NB.

Finalmente y reuniendo todos los resultados concluimos que los estudios presentados son de relevancia para generar nuevas estrategias de estratificación de los pacientes en grupos de riesgo y definir nuevos enfoques terapéuticos que mejoren la supervivencia de los pacientes con NB.

8. REFERENCIAS

Abe M, Watanabe N, McDonell N, Takato T, Ohira M, Nakagawara A, Ushijima T: Identification of genes targeted by CpG island methylator phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor prognosis. *Oncology* 2008, 74:50-60.

Alaminos M, Dávalos V, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M. Clustering of gene hypermethylation associates with clinical risk groups in neuroblastoma. *J Nat Cancer Inst* 2004, 96:1208-1219.

Alaminos M, Gerald WL, Cheung NK. Prognostic value of MYCN and ID2 overexpression in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 45:909-915.

Ambros IM, Benard J, Boavida M, Bown N, Caron H, Combaret V, Couturier J, Darnfors C, Delattre O, Freeman-Edward J, et al. Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification. *J Clin Oncol* 2003, 21: 2077-2084.

Ambros IM. Role of ploidy, chromosome 1p and Schwann cells in maturation of NB. *N Engl J Med* 1996, 334:1505-1511.

Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Schleiermacher G, Speleman F, Spitz R, London WB, Cohn SL, Pearson ADJ, Maris JM. Inter-

national consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer* 2009, 100:1471-1482.

Banelli B, Casciano I, Croce M, Di Vinci A, Gelvi I, Pagnan G, Brignole C, Allemanni G, Ferrini S, Ponzoni M, Romani M. Caspase-8 gene expression in neuroblastoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2004, 1028:157-167.

Banelli B, Gelvi I, Di Vinci A, Scaruffi P, Casciano I, Allemani G, Bonassi S, Tonini GP, Romani M. Distinct CpG methylation profiles characterize different clinical groups of neuroblastic tumors. *Oncogene* 2005, 24:5619-5628.

Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenomebiological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 2011, 11:726-734.

Beiske K, Burchill SA, Cheung IY, Hiyama E, Seeger RC, Cohn SL, Pearson AD, Matthay KK. Consensus criteria for sensitive detection of minimal neuroblastoma cells in bone marrow, blood and stem cell preparations by immunocytology and QRT-PCR: recommendations by the International Neuroblastoma Risk Group Task Force. *Br J Cancer.* 2009, 100:1627-1637.

Bell E, Chen L, Lui T, Marshall GM, Lunec J, Tweddle DA. MYCN oncoprotein targets and their therapeutical potential. *Cancer Lett* 2010, 293:144-157.

Bird AP. CpG-rich islands and function of DNA methylation. *Nature* 1986, 321:209-213.

Bowen KA, Chung DH. Recent advances in neuroblastoma. *Curr Opin Pediatr* 2009, 21:350-356.

Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, Meddeb M, Danglot G, Brinkschmidt C, Christiansen H, et al. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *The New England journal of medicine* 1999, 340: 1954-1961.

Bown N, Lastowska. 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* 2001, 36:14-29.

Bozionellou V, Mavroudis D, Perraki M et al. Trastuzumab administration can effectively target chemotherapy-resistant cytokeratin-19 messenger RNA-positive tumor cells in the peripheral blood and bone marrow of patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10:8185-8194.

Brodeur GM, Green AA, Hayes FA, Williams KJ, Williams DL, Tsiatis AA. Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines. *Cancer Res* 1981, 41:4778-4786.

Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, eds. *Principles and practice of pediatric oncology*, 5th edn. Philadelphia: J B Lippincott Company 2006, 933-970.

Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993, 11:1466-1477.

Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984, 224:1121-1124.

Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, et al. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1988, 6:1874-1881.

Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:203-16.

Buckley PG, Das S, Bryan K, Watters KM, Alcock L, Koster J, Versteeg R, Stallings RL. Genome-wide DNA methylation analysis of neuroblastic tumors reveals clinically relevant epigenetic events and large-scale epigenomic alterations localized to telomeric regions *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2011, 128: 2296-2305.

Burchill SA, Lewis IJ, Abrams KR, Riley R, Imeson J, Pearson AD, Pinkerton R, Selby P. Circulating neuroblastoma cells detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA are an independent poor prognostic indicator. *J Clin Oncol* 2001, 19:1795-1801.

Burchill SA, Selby P. Early detection of circulating solid tumour cells using molecular technology. *Cancer Topics* 1999, 10:1–4.

Burchill SA, Selby PJ. Molecular detection of low-level disease in patients with cancer. *J Pathol* 2000, 190:6–14.

Capasso M, Diskin SJ. Genetics and genomics of neuroblastoma. *Cancer treatment and research* 2010, 155: 65-84.

Carey PJ, Thomas L, Buckle G, Reid MM. Immunocytochemical examination of bone marrow in disseminated neuroblastoma. *J Clin Pathol* 1990, 43:9–12.

Caron H, van Sluis P, de Kraker J, Bokkerink J, Egeler M, Laureys G, Slater R, Westerveld A, Voute PA, Versteeg R. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N. Engl. J. Med* 1996, 334:225–230.

Caron H: Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 1995, 24:215-221.

Cheung IY, Feng Y, Gerald W, et al. Exploiting gene expression profiling to identify novel minimal residual disease markers of neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2008, 14:7020-7027.

Cheung IY, Lo Piccolo MS, Kushner BH et al. Early molecular response of marrow disease to biologic therapy is highly prognostic in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2003, 21:3853–3858.

Cheung NK, Ostrovnaya I, Kuk D, Cheung IY. Bone marrow minimal residual disease was an early response marker and a consistent independent predictor of survival after anti-GD2 immunotherapy. *J Clin Oncol* 2015, 33:755–763.

Cheung NK, Saarinem UM, Neely JE, Landmeier B, Donovan D, Coccia PF. Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1985, 45: 2642-2649.

Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 2002, 21:5483-5495.

Clapier CR, Cairns BR. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 2009, 78:273-304.

Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK, Force IT: The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009, 27:289-297.

Cooper R, Khakoo Y, Matthay KK, Lukens JN, Seeger RC, Stram DO, Gerbing RB, Nakagawa A, Shimada H. Opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome in neuroblastoma: histopathologic features—a report from the Children’s Cancer Group. *Med Pediatr Oncol* 2001, 36:623–629.

Corrias MV, Haupt R, Carlini B, Cappelli E, Giardino S, Tripodi G, Tonini GP, Garaventa A, Pistoia V, Pistorio A. Multiple target molecular monitoring of bone marrow and peripheral blood samples from patients with localized neuroblastoma and healthy donors. *Pediatr Blood Cancer* 2012, 58:43–49.

Cotterman R, Jin VX, Krig SR, Lemen JM, Wey A, Farnham PJ, Knoepfler PS. N-Myc Regulates a Widespread Euchromatic Program in the Human Genome Partially Independent of Its Role as a Classical Transcription Factor. *Cancer Res* 2008, 68:9654–9663.

Cowan LA, Talwar S, Yang AS. Will DNA methylation inhibitors work in solid tumors? A review of the clinical experience with azacitidine and decitabine in solid tumors. *Epigenomics* 2010, 2:71–86.

Cryns VL, Thor A, Xu HJ, Hu SX, Wierman ME, Vickery Jr AL, et al. Loss of the retinoblastoma tumor-suppressor gene in parathyroid carcinoma. *N Engl J Med* 1994, 330:757–61.

Dawson MA, Kouzarides T. Cancer Epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell* 2012, 150:12–27.

De Bernardi B, Balwierz W, Bejent J, Cohn SL, Garrè ML, Iehara T, Plantaz D, Simon T, Angelini P, Cama A, London WB, Kramer K, Katzenstein HM, Tortori-Donati P, Rossi A, D'Angio GJ, Evans AE. Epidural compression in neuroblastoma: Diagnostic and therapeutic aspects. *Cancer Lett* 2005, 228:283–299.

De Bernardi B, Mosseri V, Rubie H, Castel V, Foot A, Ladenstein R, Laureys G, Beck-Popovic M, De Lacerda A et al. Treatment of localised resectable neuroblastoma. results of the LNESG I study by the SIOP Europe neuroblastoma group. *Br J Cancer* 2008, 99:1027–1033.

De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, Zabrocki P, Porcu M, Westerhout EM, Lakeman A, Vandesompele J, Hoebeeck J, Van Maerken T, et al. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res* 2010, 16: 4353-4362.

Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 2012, 26:1010-1022.

Decock A, Ongenaert M, Hoebeeck J, De Preter K, Van Peer G, Van Criekinge W, Ladenstein R, Schulte JH, Noguera R, Stallings RL, Van Damme A, Laureys G, Vermeulen J, Van Maerken T, Speleman F, Vandesompele J: Genome-wide promoter methylation analysis in neuroblastoma identifies prognostic methylation biomarkers. *Genome Biol* 2012, 13:R95.

Duijkers FA, Gaal J, Meijerink JP, Admiraal P, Pieters R, de Krijger RR, van Noesel MM. Anaplastic lymphoma a kinase (ALK) inhibitor response in neuroblastoma is highly correlated with ALK mutation status, ALK mRNA and protein levels. *Cell Oncol (Dordr)* 2011, 34: 409-417.

Espada J, Esteller M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Semin Cell Dev Biol* 2010, 21:238-246.

Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 2003, 4:351-358.

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histonemodification maps. *Nat Rev Genet* 2007b, 8:286-298.

Esteller M. Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med* 2008, 358:1148–1159.

Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* 2007, 96:R26-30.

Evans AE, D'Angio GJ. Age at Diagnosis and Prognosis in Children With Neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2005, 23:6443-6444.

Faulkner LB, Tintori V, Tamburini A, Paoli A, Garaventa A, Viscardi E, Tucci F, Lippi AA, De Bernardi B, Bernini G. High-sensitivity immunocytologic analy-

sis of neuroblastoma cells in paired blood and marrow samples. *J Hematother* 1998, 4:361–366.

Fazzari MJ, Grealley JM. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat. Rev* 2004, 5:446–455.

Fulda S, Küfer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by reexpression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 2001, 20:5865–5877.

Gómez S, Castellano G, Mayol G, Suñol M, Queiros A, Bibikova M, Nazor KL, Loring JF, Lemos I, Rodríguez E, de Torres C, Mora J, Martín-Subero JI, Lavarino C. DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights. *Epigenomics* 2015, 7:1137–1153.

Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Lomas J, Arjona D, Alonso ME, Aminoso C, et al. Aberrant methylation of multiple genes in neuroblastic tumours. Relationship with MYCN amplification and allelic status at 1p. *Eur J Cancer* 2003, 39:1478–1485.

Grau E, Martinez F, Orellana C, Canete A, Yanez Y, Oltra S, Noguera R, Hernandez M, Bermudez JD, Castel V: Hypermethylation of apoptotic genes as independent prognostic factor in neuroblastoma disease. *Mol Carcinog* 2011, 50:153–162.

Grau E, Martinez F, Orellana C, Canete A, Yañez Y, Oltra S, Noguera R, Hernandez M, Bermúdez JD, Castel V. Epigenetic alterations in disseminated neuroblastoma tumour

cells: influence of TMS1 gene hypermethylation in relapse risk in NB patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010, 136:1415-1421.

Guccione E, Martinato F, Finocchiaro G, Luzi L, Tizzoni L, Dall' Olio V, Zardo G, Nervi C, Bernard L, Amati B. Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat Cell Biol* 2006, 8:764- 770.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100:57-70.

He S, Liu Z, Oh DY, Thiele CJ. MYCN and the epigenome. *Front Oncol* 2013, 3:1-9.

Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl Med* 2003, 349:2042-2054.

Hervouet E, Vallette FM, Cartron PF. Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics* 2009, 4:487-499.

Hoebeeck J, Michels E, Pattyn F, Combaret V, Vermeulen J, Yigit N, et al. Aberrant methylation of candidate tumor suppressor genes in neuroblastoma. *Cancer Lett* 2009, 273:336-46.

Hoefnagel CA. Nuclear medicine therapy of neuroblastoma. *Q J Nucl Med* 1999, 43:336-343.

Hurtubise A, Bernstein ML, Momparler RL. Preclinical evaluation of the antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and different histone deacetylase inhibitors on human Ewing's sarcoma cells. *Cancer Cell Int* 2008, 8:16.

Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004, 4:988-993.

Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, Ribeiro A, de Pontual L, Combaret V, Raynal V, Puisieux A, Schleiermacher G, Pierron G, et al. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 2008, 455:967-970.

Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, Mosseri V, Ribeiro A, Lequin D, Vermeulen J, Couturier J, Peuchmaur M, Valent A, et al. Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2009, 27: 1026-1033.

Kaneko Y, Cohn SL. Ploidy and cytogenetics of neuroblastoma. In: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA (ed). *Neuroblastoma*. Elsevier Science. Amsterdam 2000, 41-56.

Kantarjian HM, Issa JP. Decitabine dosing schedules. *Semin Hematol* 2005, 42:S17-S22.

Kim TY, Bang YJ, Robertson KD. Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy. *Epigenetics* 2006, 1:14-23.

Kuçi Z, Seitz G, Kuçi S, Kreyenberg H, Schumm M, Lang P, Niethammer D, Handgretinger R, Bruchelt G. Pitfalls in detection of contaminating neuroblastoma cells by tyrosine hydroxylase RT-PCR due to catecholamine-producing hematopoietic cells. *Anticancer Res* 2006, 26:2075–2080.

Lampert F, Rudolph B, Christiansen H, Franke F: Identical chromosome 1p breakpoint abnormality in both the tumor and the constitutional karyotype of a patient with neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1988, 34:235-239.

Lawor ER, Thiele CJ. Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets. *Clin Cancer Res* 2012, 18:2768-2779.

London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, Thorner P, Brodeur G, Maris JM, Reynolds CP, Cohn SL: Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2005, 23:6459-6465.

Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, Smith EI, Brodeur GM: Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1991, 9:581-591.

LoTurco J. Doublecortin and a tale of two serines. *Neuron* 2004, 41:175-177.

Maris J. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010, 362:2202-2211.

Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet* 2007, 369:2106-2120.

Mayol G, Martin-Subero JJ, Rios J, Queiros A, Kulis M, Sunol M, Esteller M, Gomez S, Garcia I, de Torres C, Rodriguez E, Galvan P, Mora J, Lavarino C: DNA hypomethylation affects cancer-related biological functions and genes relevant in neuroblastoma pathogenesis. *PLoS One* 2012, 7:e48401.

Michalowski MB, de Fraipont F, Plantaz D, Michelland S, Combaret V, Favrot MC. Methylation of tumor-suppressor genes in neuroblastoma: The RASSF1A gene is almost always methylated in primary tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2008, 50:29–32.

Michels E, Vandesompele J, De Preter K, Hoebeek J, Vermeulen J, Schramm A, Molenaar JJ, Menten B, Marques B, Stallings RL, et al. ArrayCGH-based classification of neuroblastoma into genomic subgroups. *Genes, chromosomes & cancer* 2007, 46: 1098-1108.

Mocellin S, Keilholz U, Rossi CR, Nitti D. Circulating tumour cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med* 2006, 12:130–139.

Molenaar JJ, Koster J, Zwijnenburg DA, van Sluis P, Valentijn LJ, van der Ploeg I, Ham-

di M, van Nes J, Westerman BA, van Arkel J, et al. Sequencing of neuroblastomaidentifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes *Nature* 2012, 483: 589-593.

Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009, 27: 298-303.

Mosse YP, Diskin SJ, Wasserman N, Rinaldi K, Attiyeh EF, Cole K, Jagannathan J, Bhambhani K, Winter C, Maris JM. Neuroblastomas have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional gene expression. *Genes, chromosomes & cancer* 2007, 46:936-949.

Nair SS, Kumar R. Chromatin remodeling in cancer: a gateway to regulate gene transcription. *Mol Oncol* 2012, 6:611-619

Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest* 2001, 81:77-82.

Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, et al. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. *PLoS One* 2010, 5:e13017.

Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Igarashi J, Fujita T, Silverman KA, Xhao H, Mosse YP, White PS, Brodeur GM. Expression and sequence analysis of candidates

for the 1p36.31 tumor suppressor gene deleted in neuroblastomas. *Oncogene* 2007, 27:803-810

Oltra S, Martinez F, Orellana C, Grau E, Fernandez JM, Canete A, Castel V. The doublecortin gene, a new molecular marker to detect minimal residual disease in neuroblastoma. *Diagn Mol Pathol* 2005, 14:53-57.

Ootsuka S, Asami S, Sasaki T, Yoshida Y, Nemoto N, Shichino H, Chin M, Mugishima H, Suzuki T. Analyses of novel prognostic factors in neuroblastoma patients. *Biol Pharm Bull* 2007, 30:2294-2299.

Ootsuka S, Asami S, Sasaki T, Yoshida Y, Nemoto N, Shichino H, Chin M, Mugishima H, Suzuki T. Useful markers for detecting minimal residual disease in cases of neuroblastoma. *Biol Pharm Bull* 2008, 31:1071-1074.

Ora I, Eggert A. Progress in treatment and risk stratification of neuroblastoma: impact on future clinical and basic research. *Semin Cancer Biol* 2011, 21:217-228.

Peris-Bonet R. Incidencia y supervivencia del cáncer infantil *Revista española de pediatría: clínica e investigación* 2008, 64: 342-356.

Pikaard CS. Methylating the DNA of the most repressed: special access required. *Mol Cell* 2013, 49:1021-1022.

Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, Carter SL, Cibulskis K, Hanna M, Kiezun A, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nature genetics* 2013, 45: 279-284.

Rangel MC, Karasawa H, Castro NP, Nagaoka T, Salomon DS, Bianco C. Role of Cripto-1 during epithelial-to-mesenchymal transition in development and cancer. *Am J Pathol* 2012, 180:2188–200.

Rodriguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 2011, 17:330-339.

Sandoval J, Esteller M. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Curr Opin Genet Dev.* 2012, 2:50-55.

Schleiermacher G, Janoueix-Lerosey I, Delattre O. Recent insights into the biology of neuroblastoma *Int J Cancer* 2014, 135: 2249-2261.

Schleiermacher G, Janoueix-Lerosey I, Ribeiro A, Klijanienko J, Couturier J, Pierron G, Mosseri V, Valent A, Auger N, Plantaz D, et al. Accumulation of segmental alterations determines progression in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2010, 28: 3122-3130.

Schleiermacher G, Michon J, Huon I, d’Enghien CD, Klijanienko J, Brisse H, Ribeiro A, Mosseri V, Rubie H, Munzer C, et al. Chromosomal CGH identifies patients with a

higher risk of relapse in neuroblastoma without MYCN amplification. *British journal of cancer* 2007, 97: 238-246.

Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 2003; 4:472-480.

Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010, 31:27-36.

Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B (1999). Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 1999b, 86: 349-363.

Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 1999, 86: 364-372.

Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F. Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2003, 9:52-58.

Spitz R, Hero B, Simon T, Berthold F. Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2006, 12:3368-3373.

Stallings RL, Nair P, Maris JM, Catchpoole D, McDermott M, O'Meara A, Breatnach F. High-resolution analysis of chromosomal breakpoints and genomic instability identifies PTPRD as a candidate tumor suppressor gene in neuroblastoma. *Cancer research* 2006, 66: 3673-3680.

Steen S, Nemunaitis J, Fisher T, Kuhn J. Circulating tumor cells in melanoma: a review of the literature and description of a novel technique. *Bayl Univ Med Cent* 2008, 21:127-132.

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* 2008, 26:5443-5449.

Tanaka T, Serneo FF, Tseng HC, Kulkarni AB, Tsai LH, Gleeson JG. Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* 2004, 41:215-227.

Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat. Med.* 2000, 6:529-535.

Theissen J, Oberthuer A, Hombach A, Volland R, Hertwig F, Fischer M, Spitz R, Zapata M, Brors B, Ortmann M, et al. Chromosome 17/17q gain and unaltered profiles in high resolution array-CGH are prognostically informative in neuroblastoma. *Genes, chromosomes & cancer* 2014, 53:639-649.

Träger C, Vernby A, Kullman A, Ora I, Kogner P, Kågedal B. mRNAs of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase but not of GD2 synthase are specific for neuroblastoma minimal disease and predicts outcome for children with high-risk disease when measured at diagnosis. *Int J Cancer* 2008, 123:2849 –2855.

Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, Deville A, de Pontual L, Schleiermacher G, Coze C, Philip N, Frebourg T, Munnich A, et al. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *American journal of human genetics* 2004, 74: 761-764.

Van Noesel MM, Versteeg R. Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic ‘danse macabre’. *Gene* 2004, 325:1-15.

Viprey VF, Gregory WM, Corrias MV, Tchirkov A, Swerts K, Vicha A, Dallorso S, Brock P, Luksch R, Valteau-Couanet D, Papadakis V, Laureys G, Pearson AD, Ladenstein R, Burchill SA. Neuroblastoma mRNAs Predict Outcome in Children with Stage 4 Neuroblastoma: A European HR-NBL1/SIOPEN Study. *J Clin Oncol* 2014, 32:1074-1083.

White PS, Thompson PM, Gotoh T, Okawa ER, Igarashi J, Kok M, Winter C, Gregory SG, Hogarty MD, Maris JM, Brodeur GM. Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene* 2005, 24:2684-2694.

Wutz A, Smrzka OW, Schweifer N, Schellander K, Wagner EF, Barlow DP. Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Nature* 1997, 389:745–749.

Yamada Y, Jackson-Grusby L, Linhart H, Meissner A, Eden A, Lin H, Jaenisch R. Opposing effects of DNA hypomethylation on intestinal and liver carcinogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2005, 102:13580–13585.

Yang Q, Kiernan CM, Tian Y, Salwen HR, Chlenski A, Brumback BA, London WB, Cohn SL: Methylation of *CASP8*, *DCR2*, and *HIN-1* in neuroblastoma is associated with poor outcome. *Clin Cancer Res* 2007, 13:3191-3197.

Yang, Q, Zage P, Kagan D, Tian Y, Seshadri R, Salwen HR, Liu S, Chlenski A, Cohn SL. Association of epigenetic inactivation of *RASSF1A* with poor outcome in human neuroblastoma. *Clin. Cancer Res* 2004, 10: 8493–8500.

Zhu WG, Otterson GA. The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003, 3:187-199.

9. ANEXOS

9.1 OTRAS PUBLICACIONES DE LA AUTORA

- Immunoproteomic Studies on Paediatric Opsoclonus-Myoclonus associated with Neuroblastoma. Torres-Vega E, Durán-Moreno M, Sánchez del Pino M, Yáñez Y, Cañete A, Castel V, López-Cuevas R, Vílchez J, Dalmau J, Graus F, García-Verdugo JM, Bataller L. *Journal of Neuroimmunology* 2016, 297:98-102.
- Targeting neuroblastoma stem cells with retinoic Acid and proteasome inhibitor. Hämmerle B, Yáñez Y, Palanca S, Cañete A, Burks DJ, Castel V, Font de Mora J. *PLoS One* 2013, 8: e76761
- New prognostic markers in Neuroblastoma. Navarro S, Piqueras M, Villamon E, Yáñez Y, Balaguer J, Cañete A, Noguera R. *Expert Opin.Med.Diag* 2012, 6:555-567.
- Epigenetic alterations in disseminated neuroblastoma tumour cells: influence of TMS1 hypermethylation gene in relapse risk in NB patients. Grau E, Martinez F, Orellana C, Canete A, Yáñez Y, Oltra S, Noguera R, Hernandez M, Bermúdez JD, Castel V. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010, 136:1415-21.
- Hypermethylation of apoptotic genes as independent prognostic factors in neuroblastoma disease. Grau E, Martinez F, Orellana C, Canete A, Yáñez Y, Oltra S, Noguera R, Hernandez M, Bermúdez JD, Castel V. *Mol Carcinog.* 2011, 50:153-162
- Neuroblastoma in adolescents: genetic and clinical characterisation.Castel V, Villa-

món E, Cañete A, Navarro S, Ruiz A, Melero C, Herrero A, Yáñez Y, Noguera. R. Clin
Transl Oncol 2010, 1:49-54.

9.2 FINANCIACIÓN

El presente trabajo de tesis doctoral ha estado financiado por las fundaciones Pablo Ugarte (APU) y Cancercare y los siguientes proyectos:

Prometeo 2012/0325

Título: Búsqueda de tratamiento personalizado para el neuroblastoma de alto riesgo.

Entidad Financiadora: Conselleria de Educació.

Investigador Principal: Victoria Castel

FIS PS09/02323

Título: Aplicación del INRG a enfermos con neuroblastoma: valor de los nuevos grupos pronóstico para la individualización terapéutica.

Entidad Financiadora: Instituto de Salud Carlos III

Investigador Principal: Victoria Castel

FIS PS02/0315

Título: Estudio de Enfermedad Residual Mínima en sangre y médula ósea de niños con neuroblastoma de alto riesgo. Valor de la inmunología, PCR cuantitativa y búsqueda de nuevos marcadores.

Entidad Financiadora: Instituto de Salud Carlos III

Investigador Principal: Victoria Castel

FE DE ERRATAS

1) En la página 77 se hace referencia a la tabla 2, sin embargo no está incluida en el texto por lo que se adjunta a continuación:

Datos clínicos y biológicos	Estadio (INSS)			Total
	1	2	3	
Número de pacientes	38	11	53	102
Edad al diagnóstico (meses)				
mediana	25	17	24	23
rango	0,4 - 138	0,9 - 62	0,2 - 126	0,2 - 138
Pacientes >18 meses al diagnóstico	16	3	25	44
Sexo				
femenino	22	7	21	50
masculino	16	4	32	52
Localización del tumor primario				
suprarrenal	16	5	13	34
abdominal	11	2	27	40
cervical	0	0	1	1
torácica	10	1	7	18
cervico-torácica	0	0	2	2
toraco-abdominal	0	0	1	1
pélvica	0	1	1	2
otras localizaciones	1	2	1	4
Histología				
histología favorable (%)	26 (68%)	4 (36%)	24 (45%)	54 (53%)
histología desfavorable (%)	2 (5%)	3 (27%)	23 (43%)	28 (27%)
histología no informada (%)	10 (26%)	4 (36%)	6 (11%)	20 (30%)
Estatus de MYCN				
amplificado (%)	0 (0%)	2 (18%)	14 (26%)	16 (16%)
no amplificado (%)	34 (89%)	9 (82%)	37 (70%)	80 (78%)
no determinado (%)	4 (10%)	0 (0%)	2 (4%)	6 (6%)
Estatus de 1p				
normal (%)	25 (66%)	6 (54%)	25 (47%)	56 (55%)
deleciónado (%)	2 (5%)	1 (9%)	14 (26%)	17 (17%)
desbalanceado (%)	3 (8%)	1 (9%)	2 (4%)	6 (6%)
no determinado (%)	8 (21%)	3 (27%)	12 (23%)	23 (22%)
Recaída (meses)				
mediana	5,2	6,9	13,9	11,2
rango	5,2 - 5,2	5,3 - 7,1	1,5 - 22	1,5 - 22
Tipo de Recaída				
local	0	1	3	4
metastásica	1	0	1	2
local + metastásica	0	2	1	3
sin información	0	0	2	2
Exitus (meses)				
mediana			11	11
rango			0,4 - 24	0,4 - 24
Causas del exitus				
progresión de la enfermedad	0	0	11	11
complicación quirúrgica	0	0	1	1
otras causas	0	0	1	1
Tiempo de seguimiento				
mediana	36	28	26	30
rango	0,7 - 84	5,8 - 70	0,4 - 89	0,7 - 89

TABLA 2. Datos clínicos y biológicos de la cohorte de 102 neuroblastomas no metastásicos.

2) En la página 91, figura 7B, en el eje de las X pone 'supervivientes' y debe poner en la caja izquierda 'supervivientes' y en la caja derecha 'exitus'.

3) En el índice está repetido el gen *CCND2*.

4) En la página 82, tabla 4 donde pone 'months' debe poner 'meses'.

5) En la página 90, tabla 7, donde pone 'other sites' debe poner 'otras localizaciones'.

6) En la página 95 donde pone '(Tabla 5A y 5B)' debe poner '(Tabla 5A y 5B del Artículo III)'