



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

Victor Zúñiga Zaragoza

2018



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Patologia

Análisis microscópico digital del infiltrado inmune en neuroblastoma. Impacto pronóstico.

Tesis doctoral

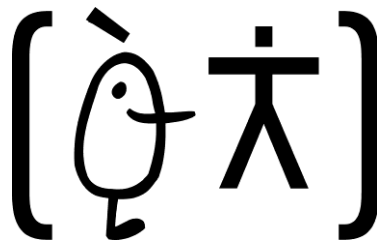
Presentada por:

**Victor
Zúñiga Zaragoza**

Dirigida por:

**Dra. Rosa
Noguera Salvá**

Valencia, Julio 2018



ANÁLISIS MICROSCÓPICO DIGITAL DEL INFILTRADO INMUNE EN
NEUROBLASTOMA. IMPACTO PRONÓSTICO

Tesis doctoral presentada por Víctor Zúñiga Zaragoza, licenciado en
Bioquímica, para optar al grado de Doctor por la Universidad de
Valencia.

Directora: Dra. Rosa Noguera Salvá.

Valencia, Julio 2018

Doña Rosa Noguera Salvá, doctora en Medicina y profesora catedrática de la Facultad de Medicina y Odontología,

CERTIFICA:

Que Víctor Zúñiga Zaragoza, licenciado en Bioquímica por la Universitat de València, ha realizado, bajo mi dirección, el trabajo que lleva por título:

Análisis microscópico digital del infiltrado inmune en neuroblastoma. Impacto pronóstico.

El cual considero satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Patología de la Universidad de Valencia.

Y para que conste, expido este certificado en Valencia, a 03 de septiembre de 2018

Fdo.: Rosa Noguera Salvá

Profa. Catedrática de Histología

Doña Rosa Noguera Salvá, doctora en Medicina y profesora catedrática de la Facultad de Medicina y Odontología,

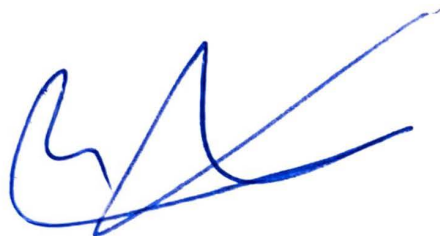
CERTIFICA:

Que Víctor Zúñiga Zaragoza, licenciado en Bioquímica por la Universitat de València, ha realizado, bajo mi dirección, el trabajo que lleva por título:

Análisis microscópico digital del infiltrado inmune en neuroblastoma. Impacto pronóstico.

El cual considero satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Patología de la Universidad de Valencia.

Y para que conste, expido este certificado en Valencia, a 03 de septiembre de 2018 .

A handwritten signature in blue ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that form a stylized representation of the name Rosa Noguera Salvá.

Fdo.: Rosa Noguera Salvá

Profa. Catedrática de Histología

ÍNDICE

Abreviaturas.....	15
Resumen.....	19
I. INTRODUCCIÓN	25
I.1 El sistema inmune. Una breve visión	27
I.1.1 Inmunidad innata <i>versus</i> adaptativa.....	27
I.1.2 Complejo Mayor de Histocompatibilidad	28
I.2 Sistema inmune y cáncer	30
I.2.1 Inflamación.....	30
I.2.1.1 Macrófagos asociados a tumor (TAM)	31
I.2.1.2 Células supresoras de origen mieloide (MDSC)	33
I.2.1.3 Células dendríticas (DC)	34
I.2.2 Inmunovigilancia e inmunoescape.....	35
I.2.2.1 Linfocitos T colaboradores (T _H)	36
I.2.2.2 Linfocitos T citotóxicos (T _C)	36
I.2.2.3 Natural killer (NK).....	38
I.2.2.4 Linfocitos B	39
I.3 Técnicas inmunohistoquímicas y de imagen digital.....	40
I.3.1 Inmunohistoquímica en las micromatrices de tejido.....	40
I.3.2 Técnicas de imagen digital microscópica	41
I.4 Los tumores neuroblásticos	42
I.4.1 Descripción general.....	42
I.4.2 Factores de estratificación pretratamiento de la INRG (International Neuroblastoma Risk Group).....	44
I.4.2.1 Factores clínicos e histopatológicos.....	45
I.4.2.2 Genética del tumor	47

I.4.4 El papel del sistema inmune.....	51
I.4.4.1 Inmunovigilancia sobre los neuroblastos.....	51
I.4.4.2 El inmunoescape de los neuroblastos.....	52
I.4.5 Estudio del microambiente tumoral neuroblástico como biomarcador terapéutico	53
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	57
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	63
III.1 Materiales.....	65
III.1.1 Imágenes y datos del infiltrado inmune.....	65
III.1.2 Muestras en las micromatrices de tejido.	65
III.1. 2. 1 Datos clínicos	69
III.1. 2. 2 Datos histopatológicos	72
III.1. 2. 3 Datos genéticos	73
III.1. 2. 4 Clasificaciones de riesgo.....	81
III. 2 Métodos	83
III.2.1 Construcción de las micromatrices de tejido y procesado..	83
III.2.2 Secciones e inmunohistoquímica	85
III.2.3 Análisis subjetivo de los marcadores inmunes.....	90
III.2.3.1 Análisis cuantitativo	90
III.2.3.2. Evaluación de la morfología de los elementos CD163+	91
III.2.3.3. Descripción histológica del infiltrado inmune.....	91
III.2.4 Análisis digital de los marcadores inmunes	93
III.2.4.1 Digitalización	94
III.2.4.2 Segmentación de las imágenes	94
III.2.4.3 Adaptación y validación de los algoritmos.....	95
III.2.4.4 Tratamiento de los datos cuantitativos objetivos.....	107

III.2.7 Análisis estadístico	110
III.2.7.1. Validación de la cohorte con los datos clínicos y biológicos de la INRG.....	110
III.2.7.2. Estudios de supervivencia	111
III.2.7.3. Relación entre los factores clínico-biológicos con las variables del sistema inmune.....	112
IV. RESULTADOS	115
IV.1 Características de los factores clínico-biológicos de la cohorte total	117
IV.2 Descripción histológica del infiltrado inmune	125
IV.2.1 Morfología celular.....	125
IV.2.2 Nódulos linfoides terciarios	126
IV.2.3 Nichos perivasculares-perinidos	131
IV.2.4 Distribuciones específicas estromales	137
IV.2.5 Distribución difusa	138
IV.2.6 Patrón específico.....	138
IV.3 Comparación entre análisis manual y digital	140
IV.4 Estadísticos descriptivos	145
IV.5 Patrones inmunes morfológicos y cuantitativos (unitarios y combinados).....	151
IV.5.1 Patrones inmunes cuantitativos asociados al exitus	153
IV.5.1.1 Patrones celulares inmunes cuantitativos unitarios..	153
IV.5.1.2 Patrones celulares inmunes cuantitativos combinados	154
IV.5.2 Patrones inmunes asociados al tiempo de supervivencia libre de eventos y global	156
IV.5.2.1 Patrones inmunes morfológicos de las células CD163 ⁺	156

IV.5.2.2 Patrones inmunes cuantitativos unitarios	158
IV.5.2.3 Patrones inmunes cuantitativos combinados	159
IV.5.3 Patrones inmunes influyentes en la clasificación global de riesgo pretratamiento de los pacientes (riesgo alto y no alto) ...	171
IV.5.3.1 Patrones inmunes morfológicos de las células CD163 ⁺	171
IV.5.3.2 Patrones celulares inmunes cuantitativos unitarios ..	172
IV.5.3.3 Patrones celulares inmunes cuantitativos combinados	177
IV.5.4 Patrones inmunes cuantitativos asociados a cada factor individual de la INRG	185
IV.5.4.1 Patrones celulares inmunes cuantitativos unitarios ..	185
IV.5.4.2 Patrones celulares inmunes cuantitativos combinados	195
V. DISCUSIÓN.....	205
V.1 La Patología digital	207
V.2 El estroma inmune de los tumores neuroblásticos: biomarcador pronóstico y terapéutico	213
VI. CONCLUSIONES	233
REFERENCIAS	239
ANEXOS	267

Este trabajo cumple las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la **Declaración de Helsinki** (Junio 1964, Helsinki, Finlandia y sus revisiones (desde Octubre 1975, Tokio, Japón; hasta Octubre 2013 Fortaleza, Brasil) y en la **Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO** y los **acuerdos del Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a las aplicaciones de la biología y de la medicina** (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Trabajo financiado por: FAECC, ISCIII & ERDF (**RD12/0036/0020**), CIBERONC (**CB16/12/00484**) ISCIII (**FIS PI14/01008 y FIS PI17/01558**).

Agradecimientos:

Me gustaría agradecer tantas cosas a tanta gente que tan solo puedo intentar abarcarlos a todos. Para empezar, quiero agradecer el esfuerzo realizado a los pacientes y sus familiares, al permitir la investigación, no sólo concediendo sus muestras, sino ayudando económicamente a multitud de proyectos, o invirtiendo su tiempo en conseguir fondos. Gracias también a la Dra. Adela Cañete, Dra. Victoria Castel, a Desirée Ramal y a Yania Yáñez por su ayuda con todos los datos clínicos. Gracias a la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica, que posibilita la realización de los estudios clínicos.

Quiero agradecer, también, toda la ayuda recibida para la realización de este trabajo en cuanto al procesado de las muestras recibidas al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Valencia, especialmente a Cristina Monfort, Alejo Sempere y Samuel Navarro, que con su alegría, energía y sabiduría me han hecho sentir respaldado.

Gracias, por supuesto, a toda la gente del Departamento de Patología del Hospital de Tortosa, especialmente Marylene Lejeune y a Carlos López, quienes me acogieron durante dos meses con mucha alegría y disposición de ayudar. Ellos me dieron el penúltimo aliento.

Me gustaría destacar toda la ayuda recibida y los aprendizajes realizados gracias al profesor José Bermúdez del Departament D'Estadística i Investigació Operativa de la Universidad de Valencia, así como todo el soporte estadístico recibido de la estadista Laura Descalzo.

Muchísimas gracias a mis compis de laboratorio: Irene Tadeo, Susana Martín, Maite Blanquer, Rebeca Burgos, Ana Berbegall, Elisa Alonso y a las nuevas incorporaciones Esther Gamero y Ezequiel Monfrener. Sin su ayuda, trabajo y esfuerzo, esta tesis no hubiera visto la luz. Gracias, también a Isidro Machado, quién me acompañó en mis primeras andaduras por el laboratorio y me echó una mano en la realización del presente trabajo. Por último, gracias a todos los alumnos

que han pasado por nuestro laboratorio llenos de alegría y ganas de aprender.

Muchas gracias a Rosa, mi directora de tesis, quién a pesar de los múltiples contratiempos no se rindió y dedicó toda la fuerza y paciencia posibles en mi formación. Gracias por ayudarme a mejorar como profesional y como persona.

Finalmente quiero acordarme de las personas que más me acompañan en este trepidante viaje que continua. Así que gracias a:

Mi familia, mis padres y mi hermana, a los que muchas veces más tendría que recordarles que les quiero. Siempre fueron mi bastón cuando mis rodillas flojearon. A mis abuelos, especialmente a mi yayo que aún me ayuda.

Los que siempre están, aunque no estén a ratos. Me refiero a esos biólogos, que desde que nos conocimos seguimos al pie del cañón.

A mi eterna familia ATMAN, a la que llevo en mi corazón especialmente a Pilar T, Pili y José Luis.

A Satyam y a S. Viswananda, como no podría ser de otra manera, por haberme ayudado y protegido tanto.

Y a ella. A la chica de mi vida: Marta. Por estar a mi lado contra viento y marea, por sosegar mis tempestades y por ser la luz de mi sendero.

¡Gracias a todos!

Abreviaturas

A: Infiltración Alta de elementos positivos.

APC: Células Presentadoras de Antígeno.

AUC: Área bajo la curva.

B: Infiltración baja de elementos positivos.

C: Variable objetiva continua.

CAF: Fibroblastos asociados al cáncer.

CD: Clúster de diferenciación (*cluster of differentiation*).

COG: Grupo de oncología pediátrica (*Children's Oncology Group*).

D: Deleción.

DC: Célula dendrítica.

Dif: En diferenciación.

DT: Desviación típica.

E: Muestra de entrenamiento.

EFS: Supervivencia libre de eventos.

Es: Recuento esperado.

FasL: Ligando de Fas o CD95L.

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente.

FN: Falso Negativo.

FP: Falso positivo.

G: Ganancia.

GAG: Glucosaminglicanos.

GN: Ganglioneuroma.

GNB: Ganglioneuroblastoma; GNBnod (nodular) o GNBe (entremezclado).

Gr: Grandes.

HdR: Hazard Ratio.

HE: Hematoxilina-eosina.

HLA: Antígeno Leucocitario Humano.

I: Indiferenciado.

IC: Intervalo de confianza.

IHQ: Inmunohistoquímica.

INRG: International Neuroblastoma Risk Group.

L: Estadio localizado.

M: Estadio metastásico.

Md: Infiltración media de elementos positivos.

MDSC: Célula supresora de origen mieloide (Myeloid Derived Suppressor Cell).

MEC: Matriz extracelular.

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

MLPA: Multiplex-ligand probe amplification.

MNA: Amplificación del gen *MYCN*.

MNNA: No amplificación del gen *MYCN*.

MQ: Módulo de membrana.

Ms: Estadio metastásico especial.

N: Número de casos.

NB: Neuroblastoma.

Nb: Neuroblastos.

NB (d): Neuroblastoma diferenciado o en diferenciación.

NB (pd o i): Neuroblastoma pobremente diferenciado o indiferenciado.

NCA: Alteraciones cromosómicas numéricas.

ND: No delecionado.

NG: No ganado.

NK: Células asesinas naturales (*Natural Killer*).

NQ: Módulo nuclear.

NR: No resultados.

Ob: Recuento observado.

OR: Odd Ratio.

OS: Supervivencia global.

pD: pobremente diferenciado.

PV: Pannoramic Viewer.

QC: Software QuantCenter.

R: Variable objetiva categórica o rango.

RC: Riesgo calculado.

Rd: Redondas.

RGB: Rojo, Verde y Azul.

ROC: Receiver Operating Characteristic (COR: Característica Operativa del receptor).

RR: Riesgo real.

S: Variable subjetiva.

SCA: Alteraciones cromosómicas segmentarias.

S/E: Porcentaje de Sensibilidad/Especificidad.

SEHOP: Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica.

SI: Sistema inmune.

SIOPE: International Society of Pediatric Oncology Europe
Neuroblastoma.

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple.

TAM: Macrófagos asociados a tumores.

T_C: Linfocito T citotóxico.

T_H: Linfocito T colaborador.

TLO: Nódulo linfoide terciario

TMA: Micromatrices de tejido.

TNB: Tumores neuroblásticos.

V: Muestra de validación.

VN: Verdaderos negativos.

VP: Verdaderos positivos.

Resumen

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más común en la niñez con un índice de supervivencia a los cinco años del 40% en pacientes de riesgo elevado a pesar de terapias intensivas. Recientemente, aunque la inmunoterapia, incluida la terapia de células T con receptor de antígeno quimérico, representa un tratamiento revolucionario para las neoplasias hematológicas, sigue habiendo grandes desafíos para aplicar esta estrategia terapéutica con los tumores sólidos, incluido el neuroblastoma, como resultado de la naturaleza inmunosupresiva del microambiente tumoral. Se ha descrito que las células cancerosas desarrollan múltiples mecanismos para escapar del reconocimiento inmune o para modular la función de las células inmunes. De hecho, varios subtipos de células inmunitarias que infiltran los tumores pueden fomentar el desarrollo de tumores, albergar actividad inmunosupresora y/o disminuir la eficacia de la inmunoterapia. Cuantificar los diferentes tipos celulares inmunes existentes en el microambiente tumoral del neuroblastoma, mediante técnicas morfométricas semiautomáticas validadas, ayudaría a mejorar la estratificación pretratamiento de riesgo a recaída y/o muerte de los pacientes, así como para avanzar en el conocimiento de la inmunoterapia adecuada a aplicar de manera precisa y personalizada.

Con esta finalidad, hemos construido 33 micromatrices de tejido que incluyeron 618 tumores neuroblásticos, que fueron inmunoteñidos con los marcadores anti-CD4, de linfocitos T colaboradores; anti-CD7, de linfocitos T inmaduros; anti-CD8, de linfocitos T citotóxicos; anti-CD20, de linfocitos B; anti-CD11b, de células supresoras; anti-CD11c, de células dendríticas; anti-CD45, marcador general de leucocitos; anti-CD68, de

macrófagos asociados a tumor; y anti-CD163 de macrófagos asociados a tumor tipo M2. Las laminillas inmunoteñidas fueron digitalizadas con un escáner de preparaciones y las imágenes generadas fueron analizadas con distintos algoritmos de análisis de imagen automatizado que permitieron detectar y caracterizar la cantidad de elementos y su intensidad de tinción. Un patólogo analizó el 60% de los casos con el sistema tradicional de conteo, con el fin de validar las herramientas digitales. Los resultados de la cuantificación se relacionaron con la supervivencia y el pronóstico de los pacientes, así como con los distintos subgrupos de neuroblastoma, teniendo en cuenta sus características clínicas, histopatológicas y genéticas.

Los resultados obtenidos que mostraron una gran correlación entre el análisis digital y el análisis visual al microscopio óptico y las propuestas de avance en el ámbito técnico realizadas, permiten resaltar las siguientes conclusiones: 1) asociando la cantidad y tipo de infiltrado inmune mediante análisis de imagen microscópico se mejora la estratificación terapéutica de riesgo de los pacientes afectados de neuroblastoma. El modelo propuesto de reclasificación terapéutica, incluyendo como marcador de mal pronóstico la detección de una baja infiltración de células CD11c⁺, junto con una alta infiltración de células CD68⁺ en las muestras tumorales permitiría aplicar junto con las terapias actuales, una inmunoterapia específica que implicara al infiltrado de dichas células orientada a disminuir el elevado riesgo de muerte y la merma del tiempo de supervivencia global y libre de eventos asociados a dicha infiltración. 2) Las características clinicobiológicas del estadio, estatus de *MYCN* y 11q en neuroblastoma agresivo definen un subgrupo

de pacientes en el que el tiempo de supervivencia global se acorta si sus tumores presentan la combinación de infiltrado de macrófagos CD68^{ALTA} y CD163^{ALTA}. La morfología de las células macrofágicas CD163⁺ también debe ser tomada en consideración. 3) El infiltrado inmune de nuestra cohorte de linfocitos CD8⁺, CD4⁺ o CD7⁺, de células supresoras CD11b⁺ o de células CD45⁺, dependiendo de los factores clinicobiológicos individuales con valor pronóstico, puede ser útil para definir subgrupos de pacientes con respuestas a la inmunoterapia distinta.

Con este estudio demostramos la importancia de cuantificar y tipificar la presencia de células del sistema inmune en los tumores neuroblásticos, mediante técnicas de análisis de imagen, para poder ser usada en la mejora de la estratificación de pacientes con neuroblastoma agresivo y para establecer las nuevas estrategias inmunoterapéuticas.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 El sistema inmune. Una breve visión

I.1.1 Inmunidad innata *versus* adaptativa

A lo largo de la evolución, la presión selectiva impuesta por los microorganismos infecciosos ha provocado el desarrollo, en los animales vertebrados, de dos vertientes inmunes que cooperan para proteger al hospedador de invasiones externas: la inmunidad innata y la adaptativa. El sistema inmune (SI) innato supone la primera línea de defensa interna. Depende de receptores, que no sufren reordenaciones, capaces de reconocer motivos moleculares muy conservados, a lo largo de la evolución, en los organismos patógenos, tales como los lipopolisacáridos, presentes en las paredes celulares de las bacterias gram-negativas, que son reconocidos a través de receptores tipo Toll (*Toll like receptor*; TLRs) de las células inmunes [1]. Las células que intervienen en la inmunidad innata son: células dendríticas (DC), monocitos/macrófagos, mastocitos, granulocitos y células naturales asesinas o *natural killer* (NK). De entre todas ellas, los neutrófilos (subtipo de célula granulocítica) y los macrófagos forman la primera línea de defensa frente a infecciones al ser células fagocíticas. Debido, a que los receptores de las células inmunes reconocen antígenos muy conservados a lo largo de la evolución, su DNA no necesita sufrir reordenaciones para generar múltiples receptores, a diferencia de la inmunidad adaptativa [2], y, por tanto, este tipo de inmunidad es rápida, restringida y específica de muy pocas dianas. De esta manera, numerosos agentes, foráneos y propios escapan a la detección del sistema innato. Por el contrario, la inmunidad adaptativa, cuyos actores

principales son los linfocitos T y B, se caracteriza por su alta especificidad de reconocimiento. Concretamente, se estima que las células B son capaces de reconocer 5×10^{13} moléculas diferentes gracias a un proceso denominado recombinación somática o recombinación de los dominios V(D)J, es decir, fragmentos génicos que sufren multitud de reordenaciones para producir infinidad de receptores de las células B o inmunoglobulinas (llamados anticuerpos). A su vez, los receptores de las células T o TCR, también, se producen por reordenación genética [3]. Cada anticuerpo o receptor es capaz de reconocer una única región molecular o inmunógeno (también llamado antígeno). Además de este proceso, el dominio V de las inmunoglobulinas puede sufrir hipermutación somática, un proceso que incrementa todavía más la variabilidad de receptores capaces de reconocer el inmunógeno [4]. Tras el reconocimiento de un antígeno no propio, normalmente presentado por las DC a través de los complejos de histocompatibilidad, se inicia un entrecruzamiento de información que acaba con la expansión clonal del linfocito que ha reconocido el antígeno extraño, generando así también, memoria inmunológica [5, 6].

I.1.2 Complejo Mayor de Histocompatibilidad

El reconocimiento de los antígenos por parte de los linfocitos se facilita por mediación de proteínas presentes en las membranas de las células del huésped. Estas proteínas se codifican en una región génica conocida como Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) o, en humanos, Antígeno Leucocitario Humano (HLA). Se subdividen en dos tipos:

- a) HLA I. Presentes en todas las células nucleadas del hospedador. Preferentemente incorporan péptidos de 8-10 aminoácidos procedentes de proteínas intracelulares presentes en el citoplasma, que serán los antígenos reconocidos por los linfocitos. Las proteínas del HLA I ensamblarán estos péptidos, para presentarlos en la superficie a los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ [7].
- b) HLA II. Expresadas por las Células Presentadoras de Antígeno (APC), como las células B, las células dendríticas y los monocitos/macrófagos, y capaces de unir péptidos de mayor longitud; 13-17 aminoácidos procedentes de proteínas que han sido endocitadas del exterior, y por tanto de células u organismos reconocidos como extraños. Las proteínas del HLA II son transportadas desde el retículo endoplasmático, donde se forman, hacia los endosomas que contienen los péptidos exógenos. Tras el ensamblado, las HLA II presentarán estos antígenos a los linfocitos reguladores o *helper* T_H CD4⁺ [8].

En el contexto inmune tumoral, las proteínas fagocitadas por las APC, que provienen del medio extracelular, como proteínas de células tumorales apoptóticas, podrían también ser presentadas por las moléculas HLA I, además de la vía clásica HLA II, por un proceso denominado presentación cruzada. Como consecuencia, se evocaría una respuesta T CD8⁺ [9].

I.2 Sistema inmune y cáncer

I.2.1 Inflamación

Desde que Virchow lo postulara inicialmente en el siglo XIX tras ver leucocitos en tejidos neoplásicos [10], no fue hasta el año 2011 cuando se definió como el séptimo *hallmark* (sello distintivo de las células cancerígenas) del cáncer a la presencia de un ambiente inflamatorio [11-13], actualizando el marco conceptual, previamente establecido, de los seis sellos distintivos de las células cancerígenas, a saber: la evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales de inhibición de crecimiento, angiogénesis mantenida e invasión de los tejidos o metástasis [14]. Numerosos estudios, posteriormente, han demostrado la conexión entre un ambiente inflamatorio y el cáncer. Así, el uso de antiinflamatorios no esteroideos se ha asociado con la protección frente a numerosos tipos de cáncer [15, 16], además, diferentes tipos de cáncer se han asociado a condiciones de inflamación crónica [17]. Tal es el caso del cáncer pancreático con la pancreatitis [18], el carcinoma hepatocelular con procesos inflamatorios como la hepatitis, el cáncer de colon con la colitis ulcerosa, etc. [19]. De hecho, la mayoría de estos procesos inflamatorios son causados por agentes infecciosos. En la actualidad numerosos trabajos están relacionando el microbioma o genoma de la microbiota, tanto patogénico como comensal, con el origen y desarrollo del cáncer. En concreto, al menos el 20% del global de todos los tumores podría tener como causa cambios del microbioma [19].

Un ambiente inflamatorio puede originarse, de forma extrínseca, por agentes foráneos, pero también, las células neoplásicas pueden iniciar una cascada de acciones que ponen en marcha a diferentes actores que generan un ambiente inflamatorio por vía intrínseca [17, 20]. Intervienen en el proceso inflamatorio moléculas como las citoquinas o las quimioquinas que son liberadas al entorno extracelular por diferentes tipos celulares, fundamentalmente, las células de la inmunidad innata, entre las que se encuentran los macrófagos asociados a tumor (TAM), las células supresoras de origen mieloide (MDSC) y las DC (aunque también los linfocitos son fuente de dichas moléculas).

I.2.1.1 Macrófagos asociados a tumor (TAM)

Los monocitos circulantes infiltran los tejidos diferenciándose en macrófagos [21]. La infiltración en el tejido tumoral ocurre en respuesta a quimioquinas, por ejemplo, CCL2 [22], VEGF [23], etc. Los macrófagos residentes en el ambiente tumoral, o TAM, sufren cambios fenotípicos diferenciándose o polarizándose en dos tipos: M1 o M2 [24]. Ambos tipos de macrófagos pueden identificarse con el marcador CD68 [25, 26]. Esta polarización puede virar hacia el fenotipo M1 en presencia de citoquinas como el factor estimulador de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el interferón γ (IFN- γ), solos o en combinación con lipopolisacáridos [27]. Esta activación M1 se caracteriza por una gran presentación antigénica (a través del complejo HLA II), una producción de IL-12^{ALTA} y IL-23^{ALTA} y una producción de IL-10^{BAJA}, además de alta producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, TNF- α e IL-6), de óxido nitroso (NO), ferritina y

de especies reactivas de oxígeno (ROS) [28]. Por otra parte, la polarización al fenotipo M2 se da por la acción de citoquinas como IL-4, IL-13 e IL-10 [29], algunas de ellas producidas por linfocitos Th2 CD4⁺ [30]. Este fenotipo M2 se caracteriza por una producción de IL-12^{BAJA}, IL-23^{BAJA} e IL-10^{ALTA}, además de una alta expresión de receptores *scavenger* de hemoglobina como el CD163 [28, 31], y por cambiar a un metabolismo de baja producción de NO, de gran producción de poliaminas y bajos niveles de ferritina [32, 33].

En el ambiente tumoral, la presencia de macrófagos M1 es un evento raro, que se asocia predominantemente a las fases tempranas de la tumorigénesis [27], mientras que el fenotipo M2 es predominante en fases más avanzadas y probablemente, tal y como indican algunas evidencias, el único fenotipo presente de los TAM [23]. Estos TAM M2 se han asociado con un pronóstico desfavorable en cáncer de mama y gástrico [34] y linfoma folicular [35], entre otros. Concretamente, las células CD163⁺ se han asociado con pronóstico desfavorable en tumores hepáticos, cutáneos, cerebrales y de tejidos blandos [36]. Se ha descrito la capacidad de promover la metástasis tumoral, por parte de las células CD163⁺, al producir glucoproteínas que, en asociación con proteínas de la matriz extracelular (MEC), facilitan la migración de las células tumorales [37]. Algunos estudios apuntan a que una elongación de la morfología celular predispone hacia el fenotipo M2, y que esta elongación podría incrementar el efecto de las citoquinas promotoras del tipo M2 y disminuir las del tipo M1 [38]. Esto podría estar indicando cómo cambios en la morfología celular inducidos por la biotensegridad de la MEC podrían alterar la función de estas células, sin embargo, no se

han podido asociar los cambios inducidos en la morfología de estas células con cambios en su genética e inmunofenotipo [39].

I.2.1.2 Células supresoras de origen mieloide (MDSC)

Las MDSCs son una población heterogénea conformada por células inmaduras, progenitoras mieloides, que se caracterizan por no presentar marcadores específicos de maduración mieloide y por tener la capacidad de inmunosuprimir a linfocitos T [40]. Es bien conocido su perfil inmunohistoquímico en ratones como células GR1⁺ CD11b⁺ [41]. Sin embargo, aunque en humanos parece haber controversia sobre el inmunofenotipo de estas células, que podría depender del tipo de tumor al que se asocian, se ha definido en cáncer de próstata a las MDSC como CD11b⁺ CD33^{LOW} HLA-DR⁻ CD3⁻ [42], mientras que en carcinoma renal se vio que al eliminar las células CD11b⁺ del conjunto de MDSC se reestablecía la capacidad proliferativa de los linfocitos, indicando la importancia de este marcador en la identificación de este tipo celular [43].

Las acciones descritas inmunosupresivas que estas células ejercen, principalmente sobre los linfocitos T, son varias:

- i. Eliminación de los nutrientes para los linfocitos, al disminuir la L-arginina vía Arg-1 e iNOS, y conseguir una regulación negativa (disminución) del receptor TCR de los linfocitos T CD8⁺ [43].
- ii. Producción de citoquinas supresoras, como TGF- β , que producirían anergia de las células NK [44].

- iii. Creación de estrés oxidativo mediante la producción de ROS, como el peróxido de hidrógeno producido por la acción de la Arg-1 e iNOS, bloqueando a los linfocitos T [45].
- iv. Interferencia en la migración y viabilidad celular. Las MDSC expresan ADAM17, una metaloproteasa que inhibe la expresión de L-selectina en la superficie de linfocitos inmaduros CD4⁺ y CD8⁺ lo que limita su recirculación a los nódulos linfoides [46]. También, las MDSC expresan galectina 9, que se une a TIM3 en la superficie de los linfocitos T induciendo su apoptosis[47].
- v. Activación de los linfocitos T_{REGS} por mecanismos aún no bien conocidos [48]. Estos linfocitos pueden generar tolerancia de los linfocitos B [49].
- vi. Polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2, al disminuir la producción de IL-12 [50, 51].

Estas células, no obstante pueden entrar en apoptosis por la acción de los linfocitos T activados, a través de moléculas como el ligando de Fas o CD95L (FasL) [52].

I.2.1.3 Células dendríticas (DC)

Estas células, junto a los macrófagos constituyen las APC y, por tanto, tienen un papel pivote entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa [53]. El papel que estas células ejercen en un ambiente tumoral es controvertido. La presencia de DC inmaduras se ha asociado frecuentemente con acciones protumorales, como incrementar la inflamación y promover el crecimiento tumoral [54]. Además, la baja expresión de HLA II de estas células las convierten en débiles inductores

de la inmunidad adaptativa [54]. En el ambiente tumoral del cáncer de ovario, entre otros, las DC tienen un fenotipo inmunosupresor de linfocitos T, que actúa a través del factor de muerte programada, PD-1 [55]. No obstante, las DC pueden madurar y presentar acciones antitumorales, por ejemplo, mediante la acción de hormonas como la T3 [56], o mediante la comunicación con linfocitos iNKT [57]. Es más, en estudios en melanoma se ha comprobado que la falta de infiltración de linfocitos en el tumor podría no ser debida a la falta de antígenos tumorales, sino a la falta de DC maduras [58].

Estas células, tradicionalmente, expresan altos niveles de HLA II y CD11c⁺. La utilización de la positividad de este marcador (CD11c) para la exclusiva identificación de las DC puede tener algunas desventajas: i) no identifica de forma inequívoca a las DC. Por ejemplo, se ha detectado su presencia en otros tipos celulares, como en los eosinófilos de la mucosa del intestino [59], o con algunos macrófagos intestinales [60]; ii) no es capaz de diferenciar entre los tres tipos fundamentales de DC, a saber: cDC (convencionales o clásicas), pDC (plasmocitoides) y moDC (derivadas de monocitos) [61]. Sin embargo, no hay duda de que el marcador CD11c es expresado en todos los tipos de DC, y ha sido tradicionalmente usado para su identificación.

I.2.2 Inmunovigilancia e inmunoescape

En el microambiente tumoral, células cancerígenas y células del sistema inmune coevolucionan a través de una intensa interacción. De manera que, al estar siendo sometidas a una presión selectiva continuada por parte del sistema inmune, las células tumorales sufrirán

muerte celular (inmunovigilancia), se mantendrán en equilibrio, o escaparán del control inmune (inmunoescape). Este modelo de interacción fue bautizado con el término: *immunoediting* [62]. La presión selectiva ejercida por el sistema inmune, probablemente, es la responsable del origen de la heterogeneidad intratumoral o presencia de clones celulares tumorales con diferentes características genéticas [63]. Las células inmunes encargadas de ejercer esta interacción son principalmente los linfocitos T y las NK.

I.2.2.1 Linfocitos T colaboradores (T_H)

Estas células, identificadas globalmente con el marcador CD4, son capaces de regular la respuesta inmunitaria silenciándola o potenciándola. Estas dos vertientes de acción fueron propuestas en el paradigma T_H1/T_H2 [64]. Los linfocitos T_H1 $CD4^+$ se asocian a buen pronóstico de los pacientes con cáncer, al facilitar la activación de linfocitos T_C $CD8^+$ mediante la secreción de citoquinas y la presentación antigénica de las APC. Por otro lado, los linfocitos T_H2 $CD4^+$, que incluyen a los linfocitos T reguladores (Treg) que son $FOXP3^+$, inhiben la función de los linfocitos T_C $CD8^+$, ayudan a la proliferación de los linfocitos B ($CD20^+$) y promueven acciones antiinflamatorias que facilitan el crecimiento tumoral [65].

I.2.2.2 Linfocitos T citotóxicos (T_C)

Los linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos (T_C) inmaduros, originados a partir de su precursor linfoide, se diferencian en linfocitos $CD8^+$ efector (y finalmente en linfocitos T memoria $CD8^+$ $CD45RO^+$) mediante la interacción con diferentes señales que generan cambios

transcripcionales [66] y epigenéticos [67]. Desde hace casi medio siglo, se conoce el modelo de dos señales, que permitió explicar cómo se diferencia lo propio de lo ajeno en la activación de los linfocitos T_C [68], pero este modelo se ha ido actualizando hasta el modelo de cuatro señales:

1. La primera se da a través del TCR (receptor de los linfocitos T) tras el reconocimiento del antígeno presentado por el complejo HLA-1 por las DC [69].
2. La segunda, llamada coestimuladora, ha de provenir entre la interacción del receptor CD28 de los linfocitos T_C con moléculas de las DC como las de la familia B7 para evitar una posible anergia o apoptosis del linfocito [70]. En algunos casos, dependiendo del estado de maduración de las DC, la coestimulación puede ser auxiliada por linfocitos CD4⁺. Por ejemplo, a través de la interacción entre CD40⁺ (expresada por las DC) y su ligando, CD40L⁺ (expresada por los linfocitos T), es posible aumentar la expresión, en las DC, de moléculas que pueden realizar esta coestimulación, como CD80⁺/CD86⁺ [71]. La interacción entre un miembro de la familia B7, la B7-H1 (también llamada PDL1), y su ligando (PD1), se ha definido como clave en el silenciamiento de los linfocitos T_C en el ambiente tumoral [72-74].
3. La tercera, provendría de las citoquinas, como la IL-2, generada por el propio linfocito T_C, la IL-12, producida por las APC y el IFN- γ , producida por linfocitos T CD4⁺, que completan el proceso de conversión en célula efectora linfocito T_C [75].

4. En la actualidad, se ha propuesto que las quimioquinas, como los ligandos de CCR7, CCR5 o CCR4, podrían ser la señal inicial (señal 0) al atraer a los linfocitos CD8⁺ T_C primitivos a los nódulos linfáticos secundarios [76].

Una vez son activados los linfocitos T_C CD8⁺, constituyen células efectoras capaces de ejercer acciones citolíticas en las células reconocidas, a través de la primera señal (HLA-1 con TCR), gracias a la liberación de gránulos que contienen moléculas citolíticas como la perforina, la granzima B o FasL [77], y también gracias a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α o el IFN- γ [78].

La presencia de estos linfocitos CD8⁺ es esencial para la destrucción tumoral [79]. El rol antitumoral, y por tanto de buen pronóstico, de estas células se ha descrito extensamente [62, 80], en cáncer de mama [81], melanoma [82], cáncer colorrectal [83] o pancreático [84], entre otros.

1.2.2.3 Natural killer (NK)

El marcador inmunohistoquímico tradicionalmente utilizado para identificar estas células, el CD56, es expresado también por células tumorales como los neuroblastos (Nb), entre otros. El CD7, se ha considerado como un marcador de precursores celulares de NK y linfocitos T [85].

El poder antitumoral de estas células ha sido demostrado en numerosos modelos [86]. La acción de estas células se da a través del reconocimiento antigénico gracias a las moléculas del complejo HLA-1,

como la molécula CD1d [87]. No obstante, muchos tumores sólidos tienen células tumorales CD1d⁺, y por tanto, no pueden ser diana de estas células inmunes [88]. No obstante, la posible acción antitumoral asociada a estas células puede deberse a su acción contra los TAM presentes en el tumor, que son los únicos tipos celulares que presentan CD1d⁺ [89]. Por otra parte, estas células pueden ejercer un control sobre las células tumorales activando, a través de moléculas como el IFN- γ , a los TAM M1, incluso cuando la inmunidad adaptativa ha sido eliminada en modelos de ratón [90]. De hecho, se ha visto que la acción de las NK puede ser, en función de la isoforma de la proteína NKp30 expresada en su superficie: la secreción de citoquinas tipo T_H1, la citotoxicidad, pero, también, la secreción de IL-10, asociada a acciones inmunosupresoras [91].

I.2.2.4 Linfocitos B

Los linfocitos B CD20⁺ necesitan ser ayudados, en los centros germinales de los nódulos linfoides, por otras células del sistema inmune, principalmente por los linfocitos T_H CD4⁺ foliculares, aunque también linfocitos T_C o las NK, para que puedan madurar en células de memoria y células plasmáticas, secretoras de anticuerpos responsables de la inmunidad humoral [92-94].

A diferencia de los órganos o nódulos linfoides secundarios existentes en el bazo, los ganglios linfáticos y las placas de Peyer que se originan durante la embriogénesis, se considera que los nódulos linfoides terciarios (TLO) han sido formados, en diversos tejidos tumorales y afectos de otras patologías, como resultado de una

demanda creciente de presentación antigénica y, por tanto, como respuesta del sistema inmune a un evento invasivo u hostil [95, 96].

I.3 Técnicas inmunohistoquímicas y de imagen digital

I.3.1 Inmunohistoquímica en las micromatrices de tejido

El uso de técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) en micromatrices de tejido (TMA) tumoral para el estudio de tumores sólidos, como los tumores neuroblásticos (TNB), presenta ventajas importantes como la visualización directa de la expresión de los biomarcadores en regiones histológicas relevantes, que permite ver los falsos negativos, a diferencia de las técnicas bioquímicas con muestras solubles [97]. En segundo lugar, permite el procesado de multitud de muestras tumorales de forma rápida [98]. En tercer lugar, los ensayos con IHQ que son validados pueden ser implementados fácilmente en la práctica clínica [99]. Por último, probablemente la ventaja más importante de esta técnica, respecto a otras técnicas moleculares, es que permite el estudio espacial de la disposición de los diferentes elementos del tumor, al preservarse el contexto tumoral [100].

Estas técnicas tienen como inconveniente la dificultad para discriminar entre subtipos de elementos celulares al poder usar, únicamente, pocos marcadores de forma simultánea en la misma sección de la muestra tumoral.

I.3.2 Técnicas de imagen digital microscópica

Los sistemas de clasificación manuales al microscopio óptico son usados rutinariamente, para la evaluación de los niveles de expresión proteica basados en la intensidad y porcentaje de células teñidas de la tinción IHQ, de manera que se pueden realizar análisis cuantitativos y de patrones de distribución. No obstante, el tiempo requerido para el análisis histopatológico de las preparaciones, la necesidad de una cuantificación y localización de los elementos positivos más objetiva y la necesidad de un método de medición altamente reproducible que permita limitar la variabilidad inter e intra observador, son factores clave que marcan la urgencia del desarrollo de técnicas de análisis de imagen digital [101]. El uso de técnicas digitales, con software que permite automatizar los análisis, permite reducir la subjetividad de los análisis realizados al microscopio óptico por parte de los patólogos [102]. De hecho, el uso de estas herramientas está facilitando el diagnóstico clínico rutinario, o incluso mejorándolo dado su mayor nivel de sensibilidad y objetividad [103, 104]. A pesar de las amplias posibilidades que ofrecen las técnicas de análisis de imagen, su uso no ha sido implementado de manera global en el diagnóstico clínico rutinario debido a la necesidad de validación. Aun así, está ampliando las posibilidades de investigación, fundamentalmente por su gran ventaja del estudio del contexto espacial en los tumores sólidos [105]. Por ejemplo, el estudio de la disposición espacial de las células, construyendo redes de contactos celulares, permite inferir las fuerzas físicas que interactúan en la tumorigénesis [106]. No obstante, además del estudio espacial, estas técnicas son muy útiles para el análisis

cuantitativo de los elementos inmunoteñidos. Así, por ejemplo, en cáncer colorrectal, se han desarrollado herramientas para el conteo de grandes acumulaciones o conglomerados de células inmunes gracias a algoritmos que tienen en cuenta el área de las células marcadas y el área de los conglomerados [107]. También, se han creado algoritmos complejos que permiten un conteo más fidedigno de las células tumorales presentes en el tejido tumoral, separándolas unas de otras en caso de que las células estén en contacto [108].

I.4 Los tumores neuroblásticos

I.4.1 Descripción general

El neuroblastoma (NB) constituye el tumor pediátrico sólido extracraneal más frecuente en la infancia, con unas características clínicas, histopatológicas y genéticas bien delimitadas [109]. En total, supone el 8-10% de los tumores infantiles con una incidencia de 1 por cada 7000 nacidos vivos, representando el 15% de la mortalidad infantil por cáncer [110]. En España, se han diagnosticado una media de 71 niños con neuroblastoma al año entre los años 1980 y 2014, lo que supone el 10 % de todos los tumores infantiles, después de las leucemias (26%) y los tumores del sistema nervioso central (21%) [111]. Los TNB pueden clasificarse histológicamente en diferentes tipos, siendo el NB el subtipo más maligno.

Su origen es embrionario, derivado de las células inmaduras presentes en la cresta neural del sistema nervioso simpático. Se puede originar en cualquier localización de la cadena simpática, ganglios, paraganglios y médula suprarrenal que forman este sistema. Aunque,

prevalentemente se origina en el ganglio paraespinal del abdomen (60%), en la médula suprarrenal (30%) y el resto en los ganglios simpáticos del tórax, cabeza/cuello y pelvis [112-114].

La formación de este tumor es fundamentalmente espontánea. Tan solo el 1-2 % es de origen familiar, siendo las mutaciones del gen *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) las principales responsables encontradas en el 80% de los NB hereditarios. Se han encontrado mutaciones somáticas de este gen en aproximadamente el 14% de los NB de riesgo alto (HR NB) [115].

La sintomatología depende fundamentalmente de la compresión e infiltración de órganos vecinos, metástasis y, en menor frecuencia, de síndromes paraneoplásicos (como el malestar maligno, característico del niño mayor, o el síndrome opsoclono-mioclono, en lactantes con NB localizados y sin amplificación del gen *MYCN*). Existen criterios consensuados para la sospecha diagnóstica tales como el aumento de las catecolaminas (urinarias o séricas, o sus metabolitos), la infiltración de la médula ósea por células del tumor, ecografías (para la detección de metástasis y la valoración del volumen del tumor) y la gammagrafía ósea con metayodobencilguanidina (un isótopo radiactivo que sigue las rutas metabólicas características de las catecolaminas y que es captado por el tumor y sus metástasis en el 86% de los neuroblastomas), siendo el diagnóstico anatomopatológico del tejido tumoral la confirmación del diagnóstico [116].

El NB presenta una enorme heterogeneidad clínica; con casos de regresión o maduración espontánea o como respuesta al tratamiento, así como con casos de progresión rápida de la enfermedad y metástasis

en médula ósea, ganglios linfáticos, huesos, hígado, pulmones, sistema nervioso central y/o piel, con una supervivencia a largo término de menos del 40% a pesar de múltiples y agresivos tratamientos [117]. También presenta una importante heterogeneidad genética intertumoral, con alteraciones genéticas que, algunas de ellas, se correlacionan inversamente, como la amplificación del gen *MYCN* y la delección del cromosoma 11q, identificando subgrupos de tumores avanzados, así como una, cada vez más conocida, heterogeneidad intratumoral, con clones tumorales que tienen amplificación del *MYCN* y clones tumorales que no la presentan [118].

I.4.2 Factores de estratificación pretratamiento de la INRG (International Neuroblastoma Risk Group)

El sistema de estratificación de tratamiento actualmente aceptado de los pacientes con TNB se estableció tras el análisis clinicobiológico de 8.880 TNB, llevado a cabo por el grupo internacional de estudio del neuroblastoma (International Neuroblastoma Risk Group, INRG) en el 2009 [109]. Este sistema, utilizó el tiempo transcurrido hasta un evento (definido como recaída, progresión, muerte o última revisión), llamado supervivencia libre de eventos, EFS (Event Free Survival), para definir los factores de riesgo, que habían intervenido. Los factores que se revelaron estadísticamente importantes conforman la clasificación de la INRG, y son clínicos (edad y estadio), histopatológicos, y genéticos (*MYCN*, delección del 11q y el índice de DNA o ploidía) (**Tabla 1**).

I.4.2.1 Factores clínicos e histopatológicos

I.4.2.1.1 Estadio

El sistema actual de estadificación pre-quirúrgico está constituido por los estadios L1 y L2, localizados, y por los M y Ms, metastásicos (**Tabla 1**). El estadio L1 corresponde con aquellos tumores localizados que no involucran estructuras vitales y que se confinan a un único compartimento. L2 son los tumores localizados que presentan uno o más factores de riesgo definidos por imagen (IDRF) [119]. Los M, son aquellos tumores con metástasis no contiguas con el tumor primario, excepto los Ms, que son tumores pertenecientes a pacientes menores de 18 meses con metástasis confinadas a la piel, hígado y/o médula ósea. Estos estadios se corresponden con el sistema anterior de estadificación quirúrgico (INSS) de manera que el estadio INSS1 equivale al nuevo L1, los INSS2 e INSS3 equivalen al L2, el INSS4 equivale al M y el INSS4S equivale al Ms. Gracias al nuevo sistema de estadificación se corrigen errores como la posibilidad de clasificar como estadio INSS1 o INSS3 a un mismo tumor dependiendo de la habilidad quirúrgica, o la dificultad para estadificar tumores localizados en regresión [120].

I.4.2.1.2 Edad

La edad se ha demostrado como un factor predictivo de gran importancia. Se ha visto como el pronóstico de los pacientes empeora progresivamente a medida que avanza la edad. No obstante, para facilitar los estudios se decidió dicotomizar esta variable, en lugar de tenerla como un factor continuo. Los resultados de la INRG apoyaron estudios previos que indicaban que el mejor punto de corte debía estar

entre los 15 y 19 meses, y no a los 12 meses [121]. Se estableció como límite la edad de 18 meses de manera arbitraria pero dentro del rango, a excepción de los pacientes con tumores diploides, estadio M y *MYCN* no amplificado, en los que se decidió conservar el límite de 12 meses (Tabla 1 pág. 46).

Tabla 1. Esquema de clasificación pretratamiento de la INRG [109].

INRG Stage	Age (months)	Histologic Category	Grade of Tumor Differentiation	<i>MYCN</i>	11q Aberration	Ploidy	Pretreatment Risk Group
L1/L2		GN maturing; GNB intermixed					A Very low
L1		Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA Amp			B Very low K High
L2	< 18	Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA	No		D Low
					Yes		G Intermediate
	≥ 18	GNB nodular; neuroblastoma	Differentiating Poorly differentiated or undifferentiated	NA Amp	No		E Low
					Yes		H Intermediate
M	< 18			NA		Hyperdiploid	F High
	< 12			NA		Diploid	I Intermediate
	12 to < 18			NA		Diploid	J Intermediate
	< 18			Amp			O High
	≥ 18						P High
MS	< 18			NA Amp	No		C Very low
					Yes		Q High
							R High

NA: no amplificado, Amp: amplificado, Very low (riesgo muy bajo): EFS a 5 años > 85%, Low (riesgo bajo): EFS a 5 años 75-85%; Intermediate (Riesgo intermedio); EFS a 5 años 50-75%; High (Riesgo alto): EFS a 5 años < 50% [109]. Resto de abreviaturas en pág. 13.

I.4.2.1.3 Histología del tumor

Los TNB se pueden subdividir en ricos o pobres en estroma Schwanniano, de acuerdo con los estudios de Shimada et al. [122]. Basándose en esta división, los patólogos utilizan, actualmente, el sistema de clasificación internacional: *International Neuroblastoma Pathology Classification* (INPC), que define cuatro categorías histológicas diferentes para los TNB: 1) NB, tumor pobre en estroma Schwanniano; 2) Ganglioneuroblastoma entremezclado o *intermixed*

(iGNB), tumor rico en estroma Schwanniano; 3) Ganglioneuroblastoma nodular (nGNB), tumor con región rica o dominante en estroma Schwanniano y nódulo/s pobre/s en estroma Schwanniano; y 4) Ganglioneuroma (GN), tumor maduro con estroma Schwanniano dominante. Además, existen tres grados de diferenciación de la célula tumoral: indiferenciado (I), pobremente diferenciado (pd) y en diferenciación (d) [123]. En el sistema de estratificación de la INRG, los pacientes con tumores GN y iGNB presentaban un pronóstico muy favorable independientemente de cualquier otro factor. Los tumores pertenecientes al resto de categorías dependieron de los otros factores (**Tabla 1** pág. 46).

I.4.2.2 Genética del tumor

I.4.2.2.1 *MYCN*

El proto-oncogen *MYC*, situado en la región 2p24, es un gen fundamental para el desarrollo embrionario controlando multitud de procesos de proliferación, crecimiento y apoptosis [124]. La amplificación de *MYCN* (MNA) ocurre en el 20-25% de los TNB primarios [125]. Desde las primeras evidencias de que el estatus amplificado del oncogén *MYCN* generaba una rápida progresión de los TNB [126], el estado del gen *MYCN* se incorporó como primer factor genético a ser considerado en las clasificaciones de riesgo y en estudios de NB tales como los del grupo SIOPEN (International Society of Pediatric Oncology Europe Neuroblastoma), o como el COG (Children's Oncology Group) [127]. En la actualidad, los pacientes con tumores MNA se consideran de HR-NB en todos los sistemas de estratificación. El método más sensible de detección de MNA es mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH).

Se requiere una validación a nivel internacional con este método, para incorporar un caso con un diagnóstico correcto del gen a los distintos estudios y ensayos europeos.

I.4.2.2.2 11q

La región 11q23 es la región delecionada más frecuente del genoma de los TNB [128]. La pérdida o deleción de esta región del cromosoma 11 (11qD) se ha correlacionado con los parámetros clínicos de riesgo alto excepto de MNA, con el que se correlaciona inversamente [128]. Sin embargo, se han descrito algunas excepciones con presencia conjunta [129]. De manera directa, se vio que la deleción del 11q disminuía la supervivencia total (overall survival, OS) [130]. En el sistema de estratificación de la INRG se vio su importancia como factor independiente en aquellos pacientes con estadio L2 y estadio Ms, en estos últimos, si el tumor presentaba deleción, los pacientes eran clasificados como de riesgo alto (**Tabla 1** pág. 46).

I.4.2.2.3 Ploidía

El valor pronóstico de la ploidía del tumor (medida como índice de DNA) para los niños menores de 18 meses con estadios M y *MYCN* no amplificado (MNNA) fue demostrado en estudios previos a la INRG [131-133]. En estos casos, según la estratificación de la INRG, índices de DNA tumorales diploides o tetraploides, sitúan a los pacientes en riesgo intermedio frente al riesgo bajo de aquellos pacientes con tumores con índices de DNA hiperdiploides. El hecho de que los tumores hiperdiploides o triploides, MNNA o con muy pocas alteraciones cromosómicas se asocien más con pacientes de edades menores a 1 año,

y estadios localizados indica menor agresividad tumoral [134, 135]. No obstante, aunque la ploidía tumoral se usa como factor pronóstico en la clasificación de la INRG, como podemos ver en la **Tabla 1** pág. 46, no afecta a otros pacientes.

I.4.2.2.3 Otros factores genéticos

El sistema de estratificación de la INRG ha permitido mejorar drásticamente el pronóstico de los pacientes. Aun así, la búsqueda de una terapia cada vez más personalizada pasa por incorporar cada vez más otros biomarcadores tumorales.

Además de la MNA y la 11q D, existen otras alteraciones cromosómicas segmentarias (SCA), recurrentes o típicas en los TNB. Concretamente se han descrito deleciones de los brazos cromosómicos 1p, 3p, 4p y el ya comentado 11q, y ganancias en los brazos cromosómicos 1q, 2p y 17q [136, 137]. Estas SCA típicas han sido relacionadas de manera clara con el pronóstico de los pacientes [136]. Concretamente, la ganancia somática de la región distal del 17q, que ocurre en al menos el 50% de los tumores primarios y, por tanto, es la alteración cromosómica más frecuente, se asocia con marcadores de riesgo alto como edad > 18 meses y MNA [138]. Por otro lado, la pérdida de heterocigosidad (loss of heterozygosity, LOH) del 1p36, acontece en 23-25% de los neuroblastomas primarios y también se asocia con características de riesgo alto como edad > 18 meses, MNA y metástasis [139]. La presencia de estas SCA, no ha sido implementada como factor de estratificación terapéutica hasta los años recientes, debido a problemas metodológicos, de consenso y de interpretación. En la

actualidad, ya se han incorporado los resultados de los análisis con información semi/pangenómica para estratificar los pacientes en estudios de COG, el grupo alemán de oncología pediátrica y hematología y SIOPEN [140]. No obstante, los cambios genéticos responsables de la génesis o progresión tumoral situados en estos locus aún no se han definido [137].

Recientemente, nuevos tipos de alteraciones genéticas que influyen el comportamiento clínico de los TNB están siendo estudiadas. Algunos de estos estudios apuntan a reordenaciones que conllevan un incremento en la activación de *TERT* (transcriptasa reversa telomérica) y a la delección de gen *ATRX* (Alfa-Talasemia con retraso mental ligado a X) en aproximadamente el 23% y el 11% respectivamente de los HR-NB que tienen MNNA y pronóstico muy desfavorable [141]. Otra importante consecuencia de estas reordenaciones cromosómicas en los HR NB, es la activación de la telomerasa en los Nb [142]. Todos estos cambios genéticos inducen un alargamiento alternativo de los telómeros o fenotipo ALT [143]. Otros genes candidatos que son elemento de estudio en la actualidad son: *PRPN11*, *NRAS*, *BRAF*, *NF1* o los de la vía de activación *RAS-MAPK*, entre otros [144]. Además del ya comentado gen *ALK* que, junto con la vía del gen *MYCN*, son clave en la patogénesis del tumor [145]. Uno de los genes descritos como un potencial regulador *upstream* o previo de *MYCN* y, por tanto, con una estrecha relación con el estado de este gen, es *LIN28B* [146].

Otros fenómenos genéticos descritos, ponen de manifiesto una gran inestabilidad genética en determinados subgrupos de los TNB. Tal

es el caso del fenómeno de cromotripsis, un único evento catastrófico asociado con un pronóstico muy desfavorable, en el que los cromosomas presentan numerosas reordenaciones y puntos de ruptura, y que se ha descrito en el 18% de los casos de neuroblastoma con estadios avanzados [147].

I.4.4 El papel del sistema inmune

Como podrá apreciarse a continuación, muchos de los mecanismos de inmunovigilancia e inmunoescape son contrapuestos. Es por esto que, el destino final de las células tumorales dependerá, en gran medida, de la prevalencia cuantitativa de unos mecanismos sobre otros:

I.4.4.1 Inmunovigilancia sobre los neuroblastos

La hipótesis de la inmunovigilancia en TNB se sugirió por primera vez al sospechar que la causa de la regresión tumoral observada en los TNB de pacientes con estadios Ms podría ser la inmunidad [148]. Hipótesis que cobró fuerza tras las observaciones que en los tumores con estos estadios Ms existía una mayor expresión de las proteínas del HLA I respecto al resto de estadios [149]. En línea con este argumento, se vio que pacientes con HR-NB que expresaban moléculas HLA-A2 (un subtipo de moléculas de la familia HLA-2), poseían linfocitos T_C CD8⁺ activados por survivina, capaces de realizar una respuesta a través del IFN- γ [150]. Esta citoquina restituye, por un lado, la expresión de la caspasa-8 en los Nb induciendo su apoptosis y, por otro lado, los defectos presentados en la maquinaria de presentación antigénica, impidiendo el escape tumoral [151-153].

La presencia de antígenos asociados a tumor en los TNB, necesarios para evocar una respuesta inmune por parte de los linfocitos se ha descrito previamente y son, entre otros: MAGE [154], GAGE [155] o NY-ESO-1 [156]. Este último, NY-ESO-1, se ha demostrado que es capaz de inducir la inmunidad humoral por parte de los linfocitos B [157].

El control del crecimiento tumoral de los Nb por parte del sistema inmune también es llevado a cabo por las células NK, capaces de inducir la apoptosis de células CD1d⁺ que, en el contexto del NB, son mayoritariamente TAM CD68⁺ promotores del crecimiento tumoral [89]. Por otra parte, se ha visto que estas células NK pueden controlar a los Nb residuales tras la quimioterapia [91]. Por último, un tipo de célula NK, las iNKT, son capaces de activar a las DC [57].

I.4.4.2 El inmunoescape de los neuroblastos

Probablemente, el principal mecanismo de escape de los Nb a la citotoxicidad de los linfocitos T_C sea alterar el reconocimiento inmune disminuyendo la expresión de las moléculas HLA I, lo que implica un impedimento para la acción de los linfocitos T (sobre todo los T_C) [153, 158-160].

Sin embargo, los Nb poseen otros mecanismos para escapar, no solo a la citotoxicidad de los linfocitos T_C, sino también a la de las células NK, como la inmunosupresión, gracias a citoquinas que pueden ser secretadas de manera directa por los mismos Nb: como PD-1 (B7-H6) capaces de inhibir la acción antitumoral de las NK, no dependientes de las HLA-1 [91], o como FasL, que puede provocar la apoptosis de las células T [161]; o indirecta: como sHLA-G secretada por los macrófagos

inducidos por Nb, capaces de inhibir a las NK o a los linfocitos T_c [162]. De hecho, la presencia de TAM en NB se han relacionado con una reducción en la supervivencia [89, 163]. En concreto, se ha visto que los TAM en TNB pueden colaborar con fibroblastos asociados al cáncer para permitir la progresión tumoral [164]. También se ha demostrado que, en presencia de los Nb, las DC son incapaces de reaccionar al factor antitumoral TNF- α , inhibir la proliferación del linfocitos T, e incluso entran en apoptosis [165].

Otro mecanismo descrito en TNB es la dificultad de las células inmunes efectoras para entrar en el ambiente tumoral, aunque existan antígenos asociados a tumor que pueden ser reconocidos por los linfocitos T circulantes, como la survivina [150].

I.4.5 Estudio del microambiente tumoral neuroblástico como biomarcador terapéutico

Se ha visto que numerosos procesos esenciales en el desarrollo de los TNB, tales como, la diferenciación de las células madre, la maduración de los Nb, la expresión de *MYCN* y de diversos fenotipos de las células tumorales son influenciados por la rigidez de la MEC [166]. En otros estudios, se ha demostrado que el comportamiento de los Nb varía en un ambiente en 3D respecto a uno en 2D, indicando que la regulación de la expresión génica es compleja y depende de la geometría de la matriz, así como de su composición, estructura y propiedades mecánicas [167].

En el microambiente tumoral, así como en el resto del organismo, existe un equilibrio entre las fuerzas de compresión y de tensión, que permite mantener el diseño estructural. Este principio arquitectónico es conocido como tensegridad y fue acuñado por Buckminster Fuller en los años 1960 [168]. Puede aplicarse a cualquier escala del cuerpo, bajo el nombre de biotensegridad, desde el sistema musculoesquelético, hasta la estructura del DNA o las proteínas [169, 170]. De acuerdo con este principio, las estructuras o sistemas tensegrales son estabilizados por elementos continuos, que ejercen tensión, junto con elementos discontinuos que soportan compresión [171]. La célula, como estructura tensegral, es un elemento de tensión y la MEC de resistencia a la compresión. Al mismo tiempo, la célula necesita elementos de tensión continua (provista por los elementos del citoesqueleto tales como los filamentos intermedios y los microfilamentos) y de resistencia a la compresión (provista por otros elementos del citoesqueleto como los microtúbulos). Diversos estudios han demostrado que las células pueden funcionar como estructuras tensegrales independientes, pretensionadas a través de sus estructuras del citoesqueleto [172-174]. Estas células pretensionadas pueden estar preparadas y listas para recibir señales mecánicas y convertirlas en cambios bioquímicos [175].

La MEC puede considerarse como un regulador dinámico y multifuncional que tiene su propio sistema biotensegral con las fibras de reticulina y elásticas actuando como elementos tensionales y con la sustancia fundamental amorfa y las fibras de colágeno como elementos resistentes y compresivos. Se considera que esta red tensegral es un

sistema regulador de las funciones celulares, es decir, de los cambios en la expresión génica [176-178]. En el microambiente tumoral, estas fuerzas mecánicas, ejercidas por todos los elementos celulares y de la MEC, pueden alterar el desarrollo de los tumores. Por lo que se consideran como el noveno *hallmark* del cáncer [179, 180].

Se ha correlacionado la rigidez de la MEC con la invasión tumoral en cáncer de hígado, pancreático y de próstata, indicando una relación recíproca entre el infiltrado celular y las propiedades físicas de la MEC [181-183]. Una MEC rígida permite la migración de las células tumorales hacia el estroma adyacente, a través de fibras de colágeno [184, 185]. Nuestro grupo estudia las características organizativas de diferentes elementos de la MEC (fibras de reticulina, fibras de colágeno I y glucosaminglicanos (GAG)) en los TNB, para poder asociar su biotensegridad, interacción mecánica de elementos estructurales presentes en la matriz extracelular tumoral, con el infiltrado celular tumoral y estromal y el grado de malignidad del tumor [180]. Hemos descrito la asociación de una mayor agresividad tumoral con una MEC poco porosa y reticular, entendiéndose como tal una MEC con gran presencia de fibras de colágeno tipo III con un alto grado de entrecruzamiento y escasez de GAG [186]. Nuestro grupo ha descrito la asociación de una disminución de los GAG, correlacionada con una distribución anormal de la enzima encargada de su síntesis, la B3GALT6, y la delección del cromosoma 1p36, con un pronóstico desfavorable para los pacientes [187]. Recientemente, se ha visto que la presencia de un proteoglicano rico en condritin sulfato presente en la MEC, el neurocan (o NCAN) estimula fenotipos malignos en los Nb [188].

Por último, además de los elementos de la MEC, los elementos vasculares presentes en el tumor pueden favorecer el crecimiento tumoral, generando ambientes hipóxicos [189], facilitando la metástasis de las células tumorales o, por el contrario, la infiltración inmune antitumoral [190]. Se ha podido confirmar como las células del sistema inmune, concretamente los TAM, pueden modular la angiogénesis en modelos con ratón [191]. Nuestro grupo también ha podido demostrar que en los tumores de pacientes con pronóstico desfavorable hay menor cantidad de capilares y mayor cantidad de sinusoides tanto sanguíneos como linfáticos que, hipotéticamente, generan una mayor presión intratumoral [192].

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

General

La infiltración celular inmune en tumores neuroblásticos está relacionada con el microambiente tumoral, es decir, con la organización de los elementos formes de la matriz extracelular, los sistemas vasculares y del sistema nervioso periférico, la presencia de diferentes células estromales, así como de elementos moleculares diversos. Todos estos elementos estarán relacionados, a su vez, con las diferentes características de los pacientes y de sus células tumorales (definidas en la clasificación de la INRG de riesgo). La valoración de la efectividad de la inmunoterapia se sustentará en esta hipótesis.

Específicas

Conseguir asociar la cantidad y tipo del infiltrado inmune con el pronóstico mejorará la estratificación de riesgo pretratamiento de los pacientes afectados de neuroblastoma.

Es posible y adecuado validar el estudio del infiltrado inmune para implantarlo en el diagnóstico rutinario, mediante software de análisis de imagen.

Objetivos

General

Asociar el infiltrado celular inmune en neuroblastoma, detectado mediante técnicas inmunohistoquímicas y cuantificado

mediante técnicas manuales y digitales, a las características clinicobiológicas de los pacientes y sus tumores para mejorar la inmunoterapia.

Específicos

1. Describir las distribuciones del infiltrado celular inmune en los tumores de las diferentes cohortes de pacientes, agrupados según sus características clínico-biológicas.
2. Contrastar los resultados obtenidos manualmente con los obtenidos digitalmente.
3. Definir los tipos celulares inmunes que tienen una influencia favorable y los que tienen una influencia desfavorable en la clasificación de riesgo pretratamiento y en la supervivencia de los pacientes.
4. Evaluar las posibles relaciones de interdependencia, o relaciones causales, entre los marcadores inmunes y las características clínico-biológicas de la INRG.

Consecución de los objetivos y demostración de las hipótesis específicas

Para la consecución de los objetivos propuestos, se realizarán tinciones inmunohistoquímicas, con los marcadores inmunes que servirán para detectar la presencia de linfocitos T y B, células dendríticas, células supresoras de origen mieloide y macrófagos asociados a tumores, de las muestras tumorales biopsiadas de los pacientes para,

ulteriormente, cuantificar objetiva y subjetivamente el número de células positivamente inmunoteñidas y relacionar estas cuantificaciones con las características clinicobiológicas de los pacientes, su riesgo pretratamiento y su supervivencia, mediante análisis estadísticos que permitan obtener conclusiones robustas.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1 Materiales

III.1.1 Imágenes y datos del infiltrado inmune

En este estudio observacional, transversal, se analizaron aproximadamente 12.700 imágenes microscópicas, escaneadas, procedentes de 677 tumores x 2 cilindros + 53 cilindros control + 4 cilindros de otros tumores = 1424 muestras) x 9 marcadores o CD identificativos de subtipos celulares del sistema inmune.

Por cada marcador se obtuvieron al menos 4 variables para las biopsias primarias [objetiva (continua + categórica con 2 categorías + categórica con 3 categorías) + subjetiva]. Todas las biopsias primarias tuvieron dato para las variables objetivas, generando así 33.372 datos (618 biopsias primarias x 2 cilindros x 9 marcadores x 3 variables), mientras que 447 biopsias primarias se analizaron subjetivamente, generando 8.046 datos (447 biopsias primarias x 2 cilindros x 9 marcadores). En total se generaron en este estudio aproximadamente 41.418 datos relacionados con la infiltración de células del sistema inmune. La obtención de los datos queda expuesta en el siguiente apartado.

III.1.2 Muestras en las micromatrices de tejido.

Las imágenes procedían de 33 TMA que contenían, al menos, dos cilindros representativos de 1 mm² por cada biopsia. El total de biopsias correspondientes a tumores primarios de diferentes pacientes fue de 618. Todas las biopsias se agruparon por cohortes anuales: cohorte 1 (ā1), biopsias comprendidas desde el año 1996 al 2007;

cohorte 2 ($\bar{a}2$), desde el año 2007 al 2010; y cohorte 3 ($\bar{a}3$), desde el año 2010 al 2016; y por cohortes de tiempo de almacenaje: tiempo 1 ($t1$), tiempo 2 ($t2$) y tiempo 3 ($t3$) correspondientes a biopsias almacenadas en cortes de parafina durante 5 años, 3 años y 3 meses hasta su inmunotinción, respectivamente. El número correspondiente a cada cohorte queda indicada en la **Tabla 2**. Los tumores incluidos en las cohortes $\bar{a}1$ y $\bar{a}2$ son todos aquellos recibidos en el laboratorio para realizar estudios histopatológicos y genéticos para incluir a los pacientes en los estudios nacionales y europeos, con material de reserva y con adecuada celularidad. Los de la cohorte $\bar{a}3$ son tumores que, además de cumplir las condiciones previamente reseñadas a $\bar{a}1$ y $\bar{a}2$, presentaban alta inestabilidad genética y/o los pacientes fueron incluidos en los estudios de HR-NB de la SIOPEN. Estos últimos quedaron incluidos en la cohorte $t3$. Los tumores incluidos en la cohorte $\bar{a}1$ y $\bar{a}2$ fueron utilizados para diferentes estudios defendidos y publicados de las tesis doctorales de Dra. Marta Piqueras y Dra. Irene Tadeo [193, 194]. El material biológico fue recibido en el Centro de Referencia Nacional de Estudios Biológicos y Patológicos de Neuroblastoma, Departamento de Patología, Universidad de Valencia/ Instituto de Investigación INCLIVA (DP-UV/INCLIVA). Los estudios histológicos y genéticos fueron aprobados por la Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica (SEHOP) (número de archivo: 59C18ABR2002) y por el comité europeo (número de archivo: 2010-021396-81). Los participantes o sus miembros/representantes firmaron el consentimiento informativo por escrito.

Tabla 2. Número de casos pertenecientes a cada cohorte

<i>N</i>	<i>Cohorte anual</i>			<i>Cohorte tiempo almacenaje</i>		
	$\bar{a}1$	$\bar{a}2$	$\bar{a}3$	t1	t2	t3
	420	155	43	282	125	211

Las muestras tumorales fueron agrupadas en cada cohorte según su fecha de entrada. La siguiente figura (**Figura 1**) muestra la relación entre las cohortes anuales, temporales y el número de TMA:

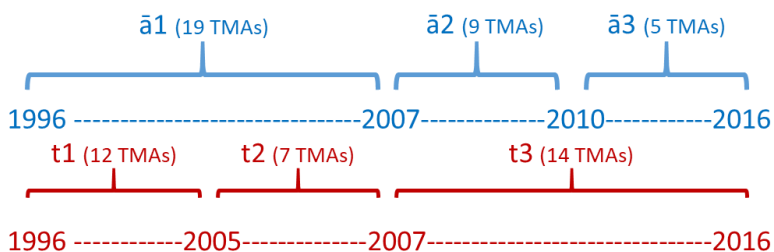


Figura 1. Relación entre los años y las cohortes.

La mayoría de los tejidos se recibieron congelados, aunque algunos se recibieron en medio de cultivo o directamente con bloques de parafina. El material tumoral fue procesado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia. El protocolo seguido para el procesamiento del material tumoral recibido se detalla en la **Figura 2**. Las muestras tumorales se utilizaron para realizar improntas, cultivos celulares (tan solo para las muestras en fresco) y extracción de DNA para técnicas moleculares, fijación en formalina para su conservación en bloques de parafina y su posterior uso en técnicas histológicas y genéticas sobre secciones de tejido y para reserva congelada. Por otro lado, para realizar estudios histológicos de investigación, parte de este material parafinado fue seleccionado para

ser incluido en TMA. Todo el material recibido y el resto de material no usado tras realizar los estudios histológicos y genéticos fue conservado en el Biobanco de TNB del Registro Nacional de Biobancos del ISCIII (Referencia: B0000339) en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Valencia-INCLIVA. Para que los datos resultantes de este trabajo de investigación estuvieran libres de sesgos por la adecuación de la cohorte de tumores y pacientes elegidos, la representatividad de los factores clinicobiológicos utilizados para la clasificación pretratamiento de riesgo de la INRG y las supervivencias de los grupos de riesgo se cumplieron (sección IV. Resultados, páginas 120 a 124) [109].

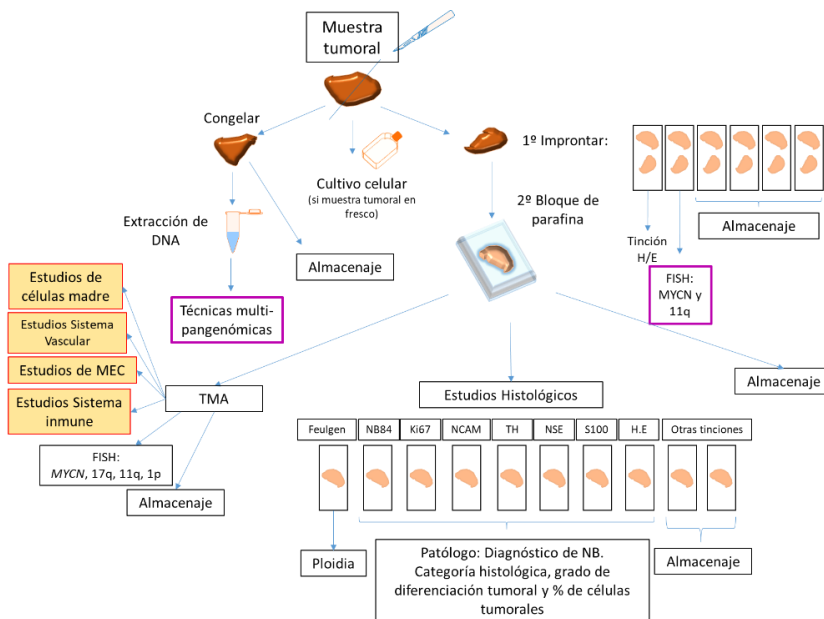


Figura 2. Protocolo de actuación en la recepción de muestras tumorales en el servicio de AP Hospital Clínico de Valencia. El tumor congelado se secciona en dos partes. Una sección se impronta, para realizar la técnica FISH, y, a continuación, se parafina para realizar los estudios histopatológicos y construir TMA (para estudiar el infiltrado celular del sistema inmune, entre otros estudios). La otra sección se congela y se utilizará para técnicas pangenómicas.

En las TMA se incluyeron 53 tejidos normales utilizados como controles: 3 bazos, 1 glándula salivar, 14 hígados, 6 músculos (4 lisos y 2 estriados), 6 placentas y 23 de riñones; y 4 tumores no neuroblásticos: 1 linfoma, 1 estesi-neuroblastoma olfatorio, 1 sarcoma renal y un carcinoma adenocortical.

III.1. 2. 1 Datos clínicos

La información clínica de los pacientes en relación edad, estadio, la supervivencia total acumulada (Overall Survival, OS) y la supervivencia libre de eventos (Event Free Survival, EFS) fue recogida y remitida al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia/INCLIVA (DP-UV/INLIVA) por el Centro de Referencia de Estudios Clínicos del NB, coordinado por la Dra. Victoria Castel y por la Dra. Adela Cañete, en el Hospital La Fe de Valencia. Estos datos, junto con los resultados histopatológicos y genéticos obtenidos se almacenaron para su posterior utilización en la base de datos NEUPAT [195], del DP-UV/INCLIVA.

❖ Estadio

La localización tumoral al diagnóstico fue clasificada siguiendo la INRGSS a partir del 2011 y de la INSS en los años previos [196], pero convertido al sistema de estadificación de la INRG siguiendo la correlación descrita previamente en la introducción [109, 120]. Por lo tanto, el anterior estadio 1 fue reclasificado a estadio L1; los estadios 2 y 3 a L2; el estadio 4 a M; y el estadio 4s a Ms. El número y porcentaje de los estadios correspondientes a los pacientes, divididos por cohortes anuales, se muestran a continuación en la **Tabla 3**:

Tabla 3. Clasificación del estadio de los pacientes cuyos tumores se agrupan en las cohortes anuales.

Estadio INSS	Estadio INRG	Cohortes anuales						Total primarios	
		ā1		ā2		ā3		N	%
		N	%	N	%	N	%		
1	L1	136	33,9	47	31,5	2	4,8	185	31,3
2/3	L2	134	33,4	37	24,8	4	9,5	175	29,6
4	M	103	25,7	52	34,9	35	83,3	190	32,1
4s	Ms	28	7,0	13	8,7	1	2,4	42	7,1
Desconocido		19		6		1		26	
Total		420	100	155	100	43	100	618	100

❖ Edad

La edad de los pacientes se describe en meses. Se clasificó a los pacientes en los subgrupos definidos por la clasificación de la INRG [109], es decir, <18 meses y >18 meses. Nuestra cohorte de pacientes va desde 0 (diagnóstico al nacimiento) hasta los 223 meses, con una media de edad de 25 meses y una mediana de 13 meses. La **Tabla 4** muestra la clasificación de los pacientes según su edad en las diferentes cohortes anuales.

Tabla 4. Clasificación de edad de los pacientes cuyos tumores se agruparon en cohortes anuales.

Edad al diagnóstico (meses)	Cohortes anuales						Total primarios		
	ā1		ā2		ā3		N	%	
	n	%	N	%	N	%			
<12	201	49,1	69	45,1	8	18,6	278	46,0	
12 a <18	42	10,3	15	9,8	6	14,0	63	10,4	
<18	243	59,4	84	54,9	14	32,6	341	56,4	
≥ 18	166	40,6	69	45,1	29	67,4	264	43,6	
Desconocido		11		2		0		13	
Total		420	100	155	100	43	100	618	100

❖ Supervivencia libre de eventos (EFS)

La EFS nos indica si el paciente ha sufrido o no algún evento (recaída/*exitus*). El tiempo EFS (tEFS) es el periodo de tiempo comprendido desde que se diagnostica la enfermedad hasta el primer evento, en caso de recaída o *exitus*, o hasta la última fecha de revisión del paciente, si no ha habido evento. En la **Tabla 5** presenta el número de eventos sufridos por los pacientes en las cohortes anuales.

Tabla 5. Eventos sufridos por los pacientes cuyos tumores se agrupan en cohortes anuales.

Evento	Cohortes anuales						Total primarios	
	ā1		ā2		ā3		N	%
	N	%	N	%	N	%		
No evento	256	67,4	65	59,6	18	46,2	339	64,2
Evento	124	32,6	44	40,4	21	53,8	189	35,8
Desconocido	40		46		4		90	
TOTAL	420		155		43		618	

❖ Supervivencia global (OS)

La OS nos indica si el paciente ha sobrevivido o no al terminar el estudio. El tiempo OS (tOS) es el periodo comprendido desde que se diagnostica la enfermedad hasta la última revisión del paciente o hasta que éste fallece (*exitus*). Todas las muertes fueron consideradas en este estudio. La **Tabla 6** muestra el número de muertes sufridas por los pacientes en las diferentes cohortes anuales.

Tabla 6. Muertes de los pacientes en las diferentes cohortes anuales.

Exitus	Cohortes anuales						Total primarios	
	ā1		ā2		ā3		N	%
	N	%	N	%	N	%		
Vivo	282	74,2	76	69,7	19	48,7	377	71,4
Exitus	98	25,8	33	30,3	20	51,3	151	28,6
Desconocido	40		46		4		90	
TOTAL	420		155		43		618	

III.1. 2. 2 Datos histopatológicos

La categoría histopatológica, el grado de diferenciación y el porcentaje de células tumorales de las muestras fue determinada, utilizando tinciones de HE e inmunohistoquímicas con NB84, TH, NSE, S100 y Ki67, por el patólogo. De los datos recogidos en la base Neupat, la **Tabla 7** recoge la información perteneciente a la categoría histológica de los TNB, de acuerdo con el sistema INPC [13], mientras que la **Tabla 8** recoge la información del grado de diferenciación de las células tumorales en NB y GNBnod en las diferentes cohortes anuales. Por último, la **Tabla 9** recoge el porcentaje de células tumorales en secciones completas tumorales de los tumores incluidos en las TMA y agrupadas por cohortes anuales.

Tabla 7. Clasificación histológica de los TNB

Categoría Histológica	Cohortes anuales						Total primarios	
	ā1		ā2		ā3		N	%
	N	%	N	%	N	%		
GN, GNBe	39	9,7	15	9,7	2	5,0	56	9,4
NB	360	89,1	136	88,3	37	92,5	533	89,1
GNBnod	5	1,2	3	1,9	1	2,5	9	1,5
Desconocido	16		1		3		20	
Total	420	100	155	100	43	100	618	100

Abreviaturas en pág. 13.

Tabla 8. Grado de diferenciación de los Nb

Grado de diferenciación	Cohortes anuales						Total primarios	
	ā1		ā2		ā3		N	%
	N	%	N	%	N	%		
I	52	14,9	19	15,4	9	25,0	80	15,7
pD	245	70,2	94	76,4	26	72,2	365	71,9
Dif	52	14,9	10	8,1	1	2,8	63	12,4
Desconocido	71		32		7		110	
Total	420	100	155	100	43	100	618	100

Abreviaturas en pág. 13

Tabla 9. Porcentaje de células tumorales en las secciones completas

Porcentaje de Nb	Cohortes anuales						Total primarios	
	ā1		ā2		ā3		N	%
	N	%	N	%	N	%		
<60	120	28,6	47	30,3	14	32,6	181	29,3
≥60	300	71,4	108	69,7	29	67,4	437	70,7
Total	420		155		43		606	

III.1. 2. 3 Datos genéticos

La detección del número y tipo de alteraciones genéticas presentes en los TNB se había llevado a cabo mediante FISH y técnicas multilocus/pangenómicas. Los datos analizados en el presente trabajo fueron recogidos de la base Neupat.

Con el fin de facilitar la descripción de los datos genéticos utilizados en combinación con los datos clinicobiológicos y de los resultados de la investigación del infiltrado celular inmune, a continuación, se describen brevemente las técnicas genéticas y nomenclaturas utilizadas.

➤ Hibridación In Situ Fluorescente (FISH)

Las improntas, los cortes de parafina y las TMA fueron usadas para estudiar el número de copias de *MYCN*, y la integridad de las regiones cromosómicas de 1p36, 11q24 y 17q22, mediante la técnica FISH.

Tabla 10. Terminología de los resultados genéticos detectados por FISH en los TNB [197].

Marcador	Estatus	Descripción
<i>MYCN</i>	No amplificación	Mismo número de señales del control (<i>LAF-2q11</i>) y de la sonda (<i>MYCN 2p24</i>)
	Ganancia	Número de señales del gen entre 1 y 4 veces mayor al del control
	Amplificación	Número de señales del gen mayor a 4 veces el número de señales del control. Homogénea: Las células tumorales amplificadas se pueden encontrar en combinación con células que presentan ganancia y disomía. Heterogénea: Se presentan células tumorales amplificadas junto a no amplificadas (diferentes a la disomía)
1p36, 11q	No deleción	Mismo número de señales de la región problema (1p36 o 11q 23) que del control (centrómero 1 o SE11)
	Deleción	Una señal de la región problema con al menos dos señales del control
17q	No ganancia	Mismo número de señales de la región problema (17q22) que del control (17p23)
	Ganancia	Número de señales de la región problema entre 1 y 4 veces superior al del control

El protocolo y la interpretación de los resultados del FISH se llevó a cabo siguiendo las guías europeas, previamente publicadas [197, 198]

(**Figura 3** y **Tabla 10**). Se utilizaron los cócteles de sondas siguientes: *MYCN* (2p24) / *LAF* (2q11); *MLL* (11q23) / *SE 11*; *MPO* (17q22) ISO 17q/*p53* (17p13), (Kreatech, Biotechnology) y 1p36 (*D1Z2*) /centrómero del cromosoma 1 (Qbiogene).

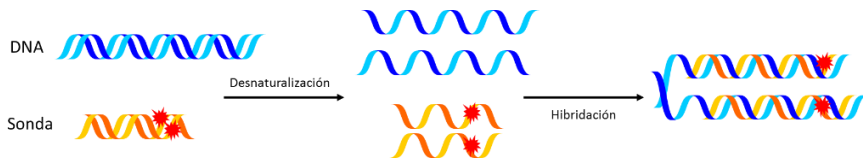


Figura 3. Base molecular de la técnica de FISH. Se emite la señal fluorescente cuando la sonda hibrida con el DNA diana desnaturalizado.

Para realizar el diagnóstico mediante FISH de estas alteraciones genéticas, se habían contado un mínimo de 100 núcleos por cilindros (TMA) o un mínimo de 200 núcleos por cortes de parafina de secciones completas o improntas. Además, se evitó la selección de células solapantes y se realizaron fotos en diferentes planos para asegurar la detección de la señal.

La siguiente figura (**Figura 4**) muestra algunos ejemplos de resultados genéticos obtenidos en el laboratorio mediante esta técnica.

➤ Técnicas genómicas

Las biopsias tumorales con más de un 50% de células tumorales se analizaron mediante técnicas semi o pangenómicas. Para realizar estas técnicas es necesario extraer el DNA de las muestras tumorales congeladas, en fresco o parafinadas. El protocolo de extracción de DNA a partir del material tumoral congelado/fresco o parafinado incluyó la lisis de las células, digestión con proteinasa K y purificación del DNA

precipitándolo con NaCl y EtOH [199]. La extracción del DNA a partir de 5 cortes de parafina de 10 μm , se realizó mediante el mismo protocolo (con mínimas modificaciones: pre-tratamiento a 90°C durante 15 minutos con P-buffer).

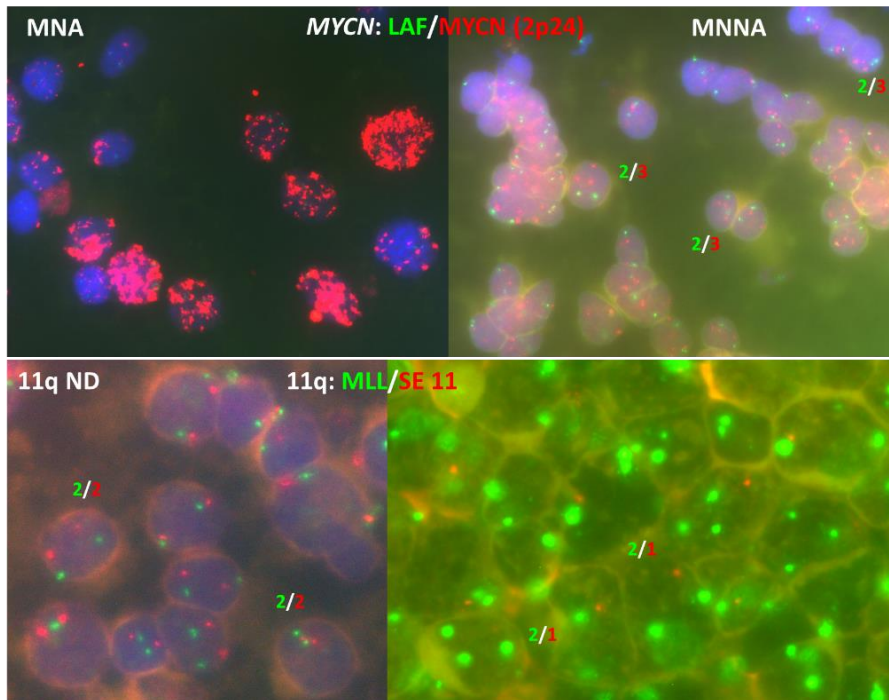


Figura 4. Imágenes microscópicas de FISH en improntas de NB. MNA amplificación, MNNA no amplificación del gen MYCN; 11q ND, no delección y 11q D delección del cromosoma 11q.

- Multiplex-ligand probe amplification (MLPA)

La MLPA se usó como primer método semigenómico en la detección de las SCA más frecuentes en TNB. Esta técnica se llevó a cabo usando el Kit MLPA SALSA (A1-B1) P251/P252/P253 desarrollado por MRC-Holanda en cooperación con la SIOPEN. El MLPA SALSA P251, contiene una mezcla de sondas para los cromosomas 1,3 y 11; el P252 para los

cromosomas 2 y 17; y el P253 para los cromosomas, 4,7, 9, 12 y 14. Cada mezcla, incluye las sondas control que están localizadas en regiones cromosómicas que no están alteradas normalmente en los Nb. En la **Figura 5** y **Figura 6** encontramos un esquema-resumen de la técnica, así como su interpretación de los resultados de acuerdo a las guías Europeas de un caso de laboratorio, respectivamente [200].

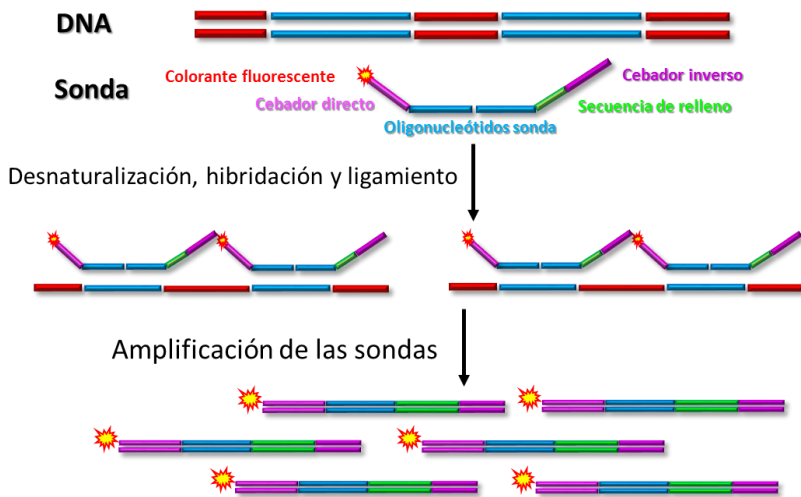


Figura 5. Esquema de la base molecular de la técnica MLPA.

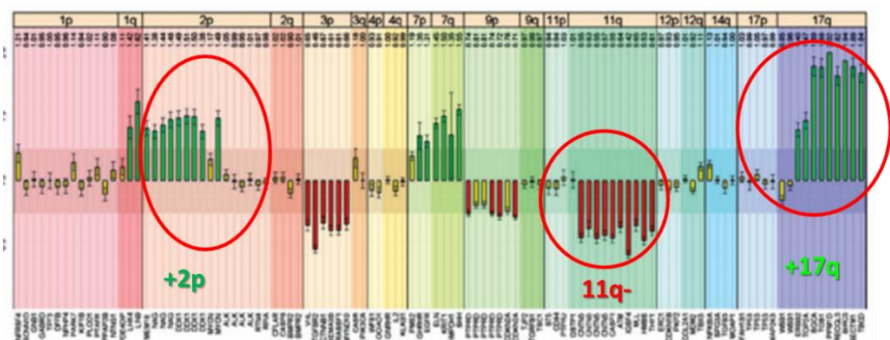


Figura 6. Resultados semigenómicos de un tumor con alteraciones cromosómicas segmentarias, obtenidos mediante la técnica MLPA y el software MLPA-Vizard (Austrian Research Centers).

- Array de Polimorfismo de nucleótido simple (aSNP)

La técnica de aSNP permite un diagnóstico del perfil pangenómico del tumor detallado al tener un gran número de sondas en todos los cromosomas. Para llevar a cabo la técnica se utilizaron tres plataformas: dos de Affymetrix® (con aproximadamente 250.000 y 750.000 sondas de oligonucleótidos) e Illumina® (con aproximadamente 300.000 sondas de oligonucleótidos).

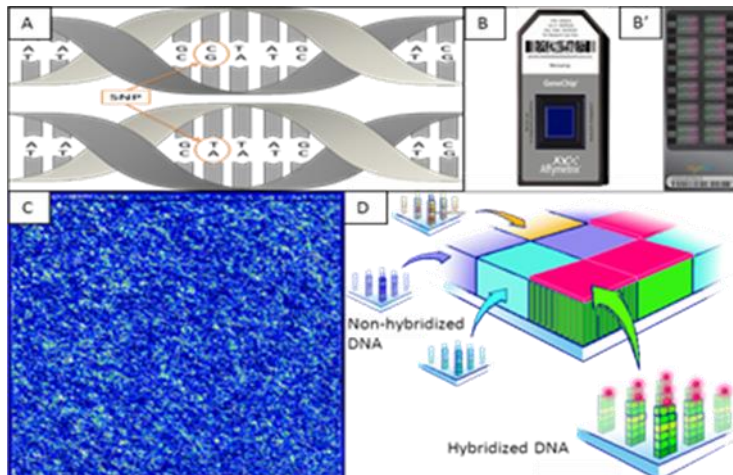


Figura 7. Técnica aSNP. A) Concepto de SNP (polimorfismo en un único nucleótido). B) Chip de microarray de Affimetrix® con 262.256 sondas. B') Chip de microarray de Illumina® con 299.140 sondas. C) Ejemplo de resultado de la hibridación para un chip de Affimetrix®. D) Esquema del proceso molecular para cada sonda.

Affymetrix® (Affymetrix, Inc. Santa Clara CA). Se utilizó las Micromatrices o GeneChips para humanos de 250K y de 750K CytoScan HD y OncoScan HD siguiendo las instrucciones del proveedor. El software utilizado para el análisis de los datos fue el software GDAS (Affymetrix) y los perfiles genómicos fueron generados usando los software CNAG (Copy Number Analyzer for Affymetrix GeneChip Mapping arrays)

Versión 3.0 junto con la función AsCNAR (Allele-specific Copy-Number analysis using Anonymous References) [201].

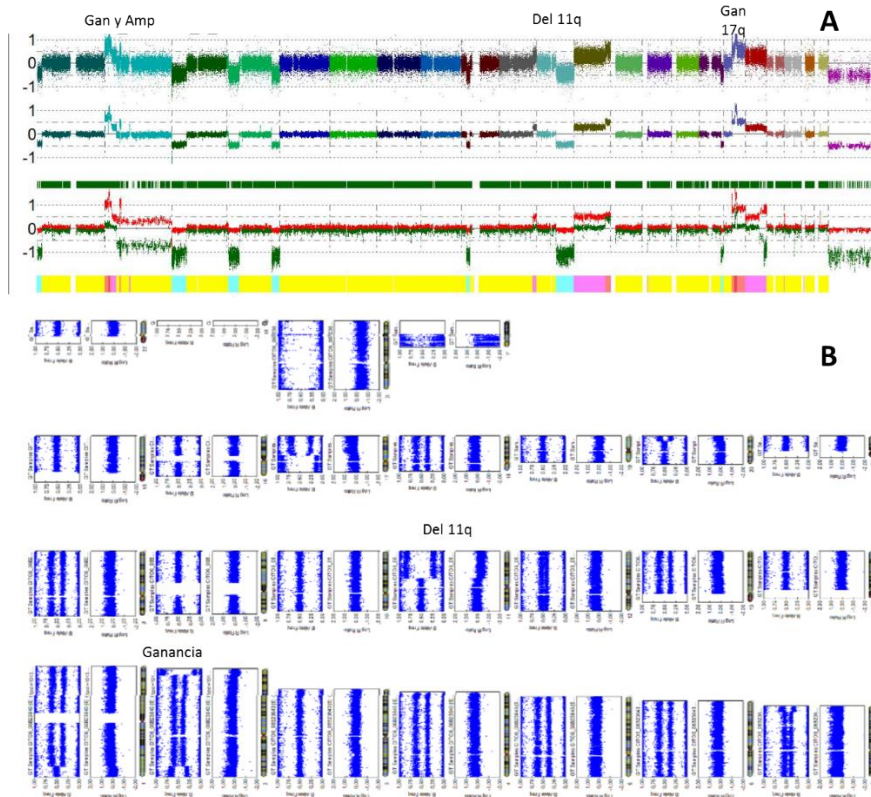


Figura 8. Perfiles genómicos con SCAs. Resultados de la técnica aSNP obtenidos por A) Affimetrix® (de 250.000 oligos); y B) Illumina®, en dos muestras de NB.

Illumina® (Illumina, Inc., San Diego, California, USA). Se utilizó el chip de 12 muestras HumanCytoSNP-12 BeadChip, que incluye 299,140 SNPs. Los datos fueron obtenidos con el software Genome Studio c.2011.1 (Illumina, Inc., San Diego, California, USA), mientras que la

evaluación de los perfiles genéticos se realizó con el software Karyostudio v.1.4 (Illumina, Inc., San Diego, California, USA).

Resultados genéticos

Los resultados genéticos obtenidos mediante las diferentes técnicas se combinaron para ofrecer un diagnóstico genético final. Como resultado de esta combinación, en muchos casos se obtuvieron resultados diferentes entre dos o más técnicas reflejando la heterogeneidad intratumoral de áreas tumorales diferentes. No obstante, a pesar de la posible heterogeneidad en los resultados dados por las diferentes técnicas, el diagnóstico genético final incluyó cualquier alteración detectada por cualquier técnica. Las tablas (**Tabla 11** y **Tabla 12**) muestra los resultados genéticos finales de los TNB elemento de estudio.

La presencia de alteraciones cromosómicas segmentarias, detectadas por FISH o por las técnicas semi o pangenómicas, permiten la clasificación de los tumores en SCA o NCA. Para determinar un perfil genético sin alteraciones cromosómicas segmentarias, aunque con ganancias o pérdidas completas cromosómicas, es necesario que el tumor tenga, como límite inferior, un 50% de Nb y realizar, al menos, una técnica semigenómica como la MLPA, que nos dé información, como mínimo, de los 7 cromosomas prevalentemente alterados en los TNB para poder afirmar la presencia/ausencia de alteraciones cromosómicas segmentarias. En caso contrario, esta información debemos darla como sin resultados aplicables a la clínica.

Tabla 11. Alteraciones genéticas concretas en regiones típicamente involucradas en los TNB agrupadas en las cohortes anuales.

Región	Estatus	Cohortes anuales						Total	
		ā1		ā2		ā3		primarios	
		N	%	N	%	N	%	N	%
MYCN ^a	MNA	58	13,9	15	9,7	19	44,2	92	15,0
	MNNA	359	86,1	140	90,3	24	55,8	523	85,0
	NR	3		0		0		3	
1p	D	118	28,6	20	16,4	13	44,8	151	26,8
	ND	294	71,4	102	83,6	16	55,2	412	73,2
	NR	8		33		14		55	
11q	D	70	18,3	38	24,8	14	33,3	122	21,1
	ND	313	81,7	115	75,2	28	66,7	456	78,9
	NR	37		2		1		40	
17q	G	177	46,2	44	37,3	22	71,0	243	45,7
	NG	206	53,8	74	62,7	9	29,0	289	54,3
	NR	37		37		12		86	
TOTAL		420	100	155	100	43	100	618	100

Tabla 12. Perfil genético de los TNB en las diferentes cohortes anuales.

Perfil genético	Cohortes anuales						Total	
	ā1		ā2		ā3		primarios	
	N	%	N	%	N	%	N	%
NCA	121	36,0	45	40,5	3	9,4	169	35,3
SCA	215	64,0	66	59,5	29	90,6	310	64,7
Desconocido	84		44		11		139	
TOTAL	336	100	111	100	32	100	479	100

III.1. 2. 4 Clasificaciones de riesgo

La combinación de todos los factores anteriormente descritos, forman la clasificación de riesgo de los pacientes (**Tabla 1** pág. 46). Los pacientes los clasificados, de forma simplificada, en riesgo alto (HR) o no alto (no HR). Este último incluye los pacientes clasificados como riesgo

muy bajo, bajo, o intermedio. La clasificación de riesgo realizada en este estudio se realizó en tres variables:

1. Riesgo calculado (RC). Clasificación de los pacientes en HR/no HR, en base a la información recabada por el laboratorio de los factores de la INRG [109].
2. Riesgo real (RR). Clasificación de los pacientes HR/no HR en base a su inclusión o no como pacientes HR en los estudios europeos (HRNB1).
3. Riesgo ultra alto (UHR). Clasificación de los pacientes HR, basada en la variable anterior (RR), en base a si los pacientes HR han muerto antes o a 12 meses tras el diagnóstico.

Su clasificación puede verse en la tabla siguiente (**Tabla 13**):

Tabla 13. Clasificaciones de riesgo de los pacientes en las cohortes anuales y total.

Clasificación	Estatus	Cohortes anuales						Total	
		ā1		ā2		ā3		primarios	
		N	%	N	%	N	%	N	%
RC	No HR	310	74	107	69	4	9	421	68
	HR	109	26	48	31	39	91	196	32
	NR	1		0		0		1	
RR	No HR	362	86	120	77	7	16	489	79
	HR	58	14	35	23	36	84	129	21
	NR	0		0		0		0	
UHR	HR	41	70	26	74	32	89	99	77
	UHR	17	30	9	26	4	11	30	23
	NR	362		0		0		0	

III. 2 Métodos

III.2.1 Construcción de las micromatrices de tejido y procesado

Las TMA de las cohortes 2 y 3 fueron construidas con el material tumoral recogido, descrito previamente y seleccionado por el patólogo. Las TMA de la cohorte 1 habían sido previamente fabricadas [193]. Las muestras tumorales se incluyeron en cada TMA al menos dos veces (dos cilindros). Esto se realizó para tener la mejor representación posible de la histología del tumor, fundamentalmente en aquellos casos con diferencias histológicas en una misma muestra tumoral (heterogeneidad intratumoral). Además, al introducir dos cilindros por muestra se aumentó la probabilidad de no perder el caso durante el procesado de los cortes. El protocolo seguido para la construcción de las TMA tuvo los siguientes pasos:

1. Selección de las muestras para incluir. Se descartaron aquellas muestras no evaluables, o aquellas muestras con escaso material en el bloque de parafina.
2. Selección, por parte del patólogo coordinador de estudios patológicos del centro, de las dos áreas por muestra, en la tinción Hematoxilina eosina (HE) correspondiente al bloque de parafina, más representativas posibles de la histología del tumor.
3. Diseño de una plantilla donde están indicadas todas las muestras y su orientación referenciada en base a dos cilindros

con muestras control que se situaron de forma asimétrica al resto de muestras, para la correcta construcción de la TMA. Por lo general, cada TMA tuvo 6 filas y 10 columnas con dos muestras control independientes en la esquina inferior izquierda. Las muestras que se asignaron a cada TMA siguieron un orden cronológico.

4. Construcción de un bloque de parafina vacío para incorporar las muestras tumorales que portará (bloque receptor).
5. Fijación del bloque receptor a la placa del instrumento manual de construcción de TMA Beecher (Silver Springs, MD, EEUU).
6. Perforación del bloque receptor usando la aguja del instrumento con 1mm de diámetro.
7. Cubrir la placa que porta el bloque receptor con una placa móvil que porta el bloque de parafina con la muestra tumoral, llamado bloque donador.
8. Comparación de la muestra en el bloque de parafina con la tinción de HE para la identificación de las regiones representativas que han sido seleccionadas por el patólogo para incluir en la TMA.
9. Perforación del bloque donador usando la aguja de 1mm de diámetro para guardar la muestra seleccionada en su interior.
10. Mover la placa móvil que porta el bloque donador para dejar expuesto el bloque receptor donde se incluirá el cilindro extraído con la aguja.
11. Mover el bloque receptor 2 mm en el eje de abscisas para separar los cilindros lo suficiente para evitar posibles contaminaciones.

12. Repetición de los pasos 6 a 11 hasta que la fila se termine.
13. Volver al primer cilindro de la fila y mover la placa con el bloque receptor 2 mm en el eje de ordenadas para empezar una nueva fila.
14. Repetir los pasos 6 a 12 hasta que la plantilla quede completada.
15. Incubación del bloque receptor toda la noche a 37°C para asegurar la cohesión entre la parafina del bloque receptor y la parafina de los cilindros incorporados.

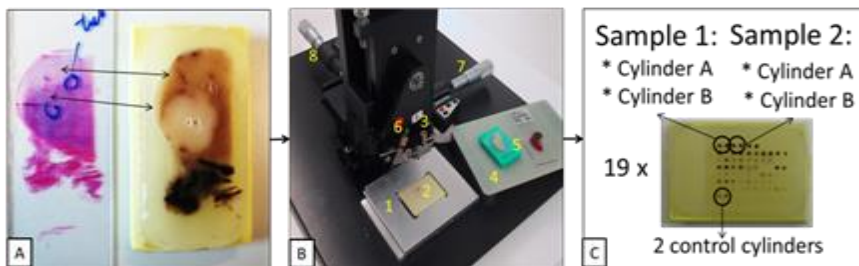


Figura 9. Pasos seguidos durante la construcción de la TMA. A) Selección de las áreas tumorales representativas en la tinción de HE para perforarlas en el bloque donador (ya perforado). B) Instrumento Beecher (Silver Springs, MD) y las diferentes partes que lo componen (1: placa fija; 2: bloque receptor; 3: pequeña aguja para perforar el bloque receptor; 4: placa móvil; 5 bloque donador; 6: aguja grande para extraer los cilindros del bloque donador; 7: rueda para mover el bloque en el eje X; 8: rueda para mover el bloque en el eje Y). C) TMA obtenida tras incluir dos cilindros por muestra con los controles dispuestos asimétricamente.

III.2.2 Secciones e inmunohistoquímica

Los bloques de parafina de las TMA fueron cortados de manera rutinaria. Se realizaron cortes seriados de 3µm para realizar la tinción IHQ, tanto manual como automáticamente, con los siguientes marcadores:

❖ Marcadores de células de linaje linfoide:

1. CD4 es una glucoproteína monomérica de 59 kDa de la superfamilia de las inmunoglobulinas con 4 dominios (D₁ a D₄) extracelulares. Su dominio D₁ interacciona con el dominio β₂ del HLA II de los linfocitos T. Los linfocitos que expresan CD4 (pero son CD8⁻), reconocen específicamente antígenos presentados por HLA II. CD4, por tanto, está presente en los linfocitos T colaboradores y regula la activación de otros linfocitos T, y también de los B [202].
2. CD7 es una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas con un peso molecular de 40 kDa. Su función aún es desconocida, aunque se sabe que su dominio citoplasmático se une a la fosfoinositol 3 kinasa por entrecruzamiento. Se expresa en células hematopoyéticas pluripotenciales, timocitos y células T inmaduras [203, 204].
3. CD8 es una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas, generalmente de 34 KDa, con un dominio extracelular IgV-like funcional en forma de dímeros de cadenas α y β. La afinidad del dominio IgV-like de la cadena α del CD8 por la porción α -3 del HLA I de las células diana mantiene cercano al linfocito T durante la activación antigénica. CD8, por tanto, se expresa en linfocitos citotóxicos y supresores [205].
4. CD20 es una proteína de 33-37 kDa de la familia de proteínas con 4 segmentos transmembrana. Su función es formar un canal de calcio al oligomerizar, por ello está implicada en la regulación de la activación de las células B. Se expresa específicamente en los linfocitos B [206].

❖ Marcadores de células de linaje mieloide:

5. CD11b es la integrina α -M/ β -2, implicada en interacciones adhesivas de monocitos, macrófagos y granulocitos, así como en la captura de partículas intervenidas por el complemento. Al ser de secuencia idéntica al receptor del complemento CR-3, reconoce el péptido R-G-D del péptido C3b del complemento. Además, esta integrina es un receptor del fibrinógeno, factor X e ICAM1. Reconoce los péptidos del fibrinógeno P1 y P2 de la cadena γ . Predominantemente expresada en células de origen mieloide como los monocitos y los granulocitos y en las células supresoras mieloides [207].
6. CD11c es la integrina α -X/ β -2 (familia de las integrinas α), un receptor de fibrinógeno, capaz de reconocer la secuencia G-P-R del fibrinógeno. Media la interacción célula-célula durante los procesos inflamatorios. Por tanto, es fundamental en la adhesión de monocitos y quimiotaxis. Predominantemente expresada en células dendríticas maduras presentadoras de antígeno, pero también en monocitos y granulocitos [208].
7. CD45 es una proteína tirosina fosfatasa presente en todos los leucocitos. Pertenece a una familia compleja de glicoproteínas de alto peso molecular (180 a 220 kDa) y es importante en la regulación de la diferenciación celular leucocitaria [209].

❖ Marcadores de células macrofágicas.

8. CD68 es una glicoproteína transmembrana expresada por macrófagos. Está implicada en las actividades fagocíticas al unirse a lectinas o selectinas específicas de órganos y tejidos [210].

9. CD163 es una proteína de 130 kDa que forma un receptor basurero o *scavenger* con un dominio extracelular, un único segmento transmembrana y una cola citoplasmática capaz de sufrir splicing (cortes). Reconoce los complejos hemoglobina-haptoglobina. Únicamente expresada en el linaje monocito-macrófago [211].

Los datos de cada anticuerpo se presentan en la **Tabla 14**, el color marrón de las inmunotinciones se debe al revelador diaminobenzidina (DAB), mientras que el color azul de la contratinción se debe a la hematoxilina (H). El protocolo de tinción manual, utilizado mayoritariamente en la cohorte ã1, se detalla a continuación:

1. Desparafinación e hidratación de las secciones cortadas.
2. Lavados con agua destilada.
3. Desenmascaramiento antigénico: Con tampón citrato 10 mmol/L, si el pH=6, o con tampón TRIS 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, si el pH=9.
4. Enfriamiento
5. Inhibición de la peroxidasa endógena (con metanol al 3% de H₂O₂).
6. Lavados con tampón TBS.
7. Incubación durante 60 minutos con el anticuerpo primario.
8. Lavados con TBS.
9. Incubación durante 30 minutos con el anticuerpo secundario.
10. Lavados con TBS.
11. Revelado con DAB.
12. Dos lavados con agua destilada.

13. Contratinción con hematoxilina.
14. Lavado con TBS.
15. Deshidratación con alcoholes (70, 80 y 90) y xiloles.
16. Montaje.

Tabla 14. Información comercial de los anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución	pH de Recuperación antigénica	Localización
Anti-CD4	Dako	No diluido	pH Alto	Membrana
Anti-CD7	Dako	1/50	pH Bajo	Membrana
Anti-CD8	Dako	No diluido	pH Alto	Membrana
Anti-CD11b	Novus Biologicals/Abcam	1/100	pH Bajo	Membrana
Anti-CD11c	Novus Biologicals/Abcam	1/100	pH Bajo	Membrana
Anti-CD20	Dako	1/100	pH Alto	Membrana
Anti-CD45	Dako	1/100	pH Alto	Membrana
Anti-CD68	Dako	1/5000	pH Alto	Membrana
Anti-CD163	Novus Biologicals	1/10	pH Bajo	Membrana

El protocolo de tinción automático utilizado mayoritariamente en las cohortes $\bar{a}2$ y $\bar{a}3$ se detalla a continuación:

1. Desparafinación e hidratación de las secciones cortadas.
2. Lavados con agua destilada.
3. Desenmascaramiento antigénico: Con la máquina PT-link (Dako) tampón citrato 10 mmol/L, si el pH=6-6,5, o con tampón TRIS 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, si el pH=9. A temperatura de 96-99°C durante 20 min.
4. Enfriamiento en baño con TBS, de 10.20 min.

5. Autostainer Link 48 (Dako) para la incubación con el anticuerpo primario y anticuerpo secundario (incluyen la contratinción con Hematoxilina). Durante 3-4 horas.
6. Lavados con tampón TBS en la máquina Dako Coverstainer.
7. Deshidratación y montaje

III.2.3 Análisis subjetivo de los marcadores inmunes

III.2.3.1 Análisis cuantitativo

Al microscopio óptico y con la experiencia de dos patólogos expertos en tumores de células pequeñas, redondas y azules, se cuantificó manualmente (método subjetivo) el número de células positivas en cada cilindro de 9 TMA de la cohorte 1 (n=249) y de las 14 TMA de las cohortes 2 y 3 (n= 198) (**Tabla 15**), para realizar la validación de los datos digitales (método objetivo). La evaluación subjetiva se llevó a cabo mediante el sistema tradicional de clasificación HScore, donde se tiene en cuenta el porcentaje de células teñidas, así como la intensidad de la tinción IHQ [212, 213], de manera que el análisis subjetivo clasifica cada caso en alguna de las siguientes categorías:

- Cilindro no informativo: artefacto, reacción cruzada, escaso material, material perdido o no tumor.
- Negativo: No hay células positivas.
- 1+: débil.
- 2+: moderada.
- 3+: alta.

Dado que cada biopsia estaba representada por dos cilindros en las TMA, para poder comparar con el análisis cuantitativo automático (con un único dato objetivo por biopsia, ver apartado III.2.5), se estableció también un único dato subjetivo por biopsia. Para ello, se seleccionó como dato subjetivo final aquél del cilindro más positivo o, si los cilindros presentaban una intensidad muy diferente, se seleccionó como dato subjetivo final el promedio entre los dos datos subjetivos de ambos cilindros.

Tabla 15. Número de TMA analizadas por cada patólogo respecto al total de TMA de cada cohorte

Patólogo	Cohorte	TMA analizadas/total
1	ā1	6/19
	T1	6/12
2	ā1	3/19
	ā2 y ā3	14/14
	T2	3/7
	T3	14/14

En la **Figura 1** (página 67) puede apreciarse la relación entre las cohortes anuales y temporales, así como el número de TMA pertenecientes a cada cohorte.

III.2.3.2. Evaluación de la morfología de los elementos CD163⁺

A la evaluación cuantitativa se incorporó el análisis de la forma, tamaño y distribución de los elementos CD163⁺, generando tres variables categóricas cuya histología se describe en el apartado de resultados.

III.2.3.3. Descripción histológica del infiltrado inmune

Para detectar los TLO se tuvieron en cuenta sus principales características que, fundamentalmente, son idénticas a aquellas de los

nódulos linfoides secundarios [95, 96]. Estas características, y la forma de detectarlas mediante tinción HQ/IHQ se describen en la siguiente tabla (**Tabla 16**).

Todas las muestras tumorales primarias se clasificaron según la presencia/ausencia de posibles TLO. No obstante, en la mayoría de las ocasiones no fue posible detectar todas las características, con lo que no fue posible asegurar que se tratara de una estructura terciaria. Incluso, muchos casos presentaron características atípicas, como la ausencia de elementos CD20⁺ y una alta presencia de elementos CD8⁺ o CD4⁺ en el nódulo. Este hallazgo fue considerado como presencia de posible TLO.

Tabla 16. Características de los TLO y su detección por inmunohistoquímica

Características de los TLO	Detección
Presencia de diferentes regiones ricas en células T y B adyacentes	Linf T: CD4 ⁺ , CD7 ⁺ y CD8 ⁺ Linf B: CD20 ⁺
Vénulas de endotelio alto	CD31 ⁺ y morfología cúbica
Cambios antigénicos de las células B en los centros germinales	Diferentes morfologías de células CD20 ⁺ y CD11c ⁺
Presencia de la enzima AID (deaminasa inducida por activación). Se correlacionó con la presencia de linfocitos T _H 17	CD4 ⁺
Presencia de células dendríticas	CD11c ⁺
Presencia de una red de células reticulares fibroblásticas. Se correlacionó con organización reticular de fibras de reticulina	Tinción de gomori

La siguiente figura (**Figura 10**), ilustra un ejemplo de TLO, en el que se puede apreciar el centro germinal en el que suceden los cambios antigénicos, con células con núcleos más grandes en la parte inferior del nódulo, la presencia de elementos CD11c⁺ (células dendríticas), y CD20⁺ (linfocitos B). Este caso también fue altamente positivo para CD4⁺ y CD8⁺.

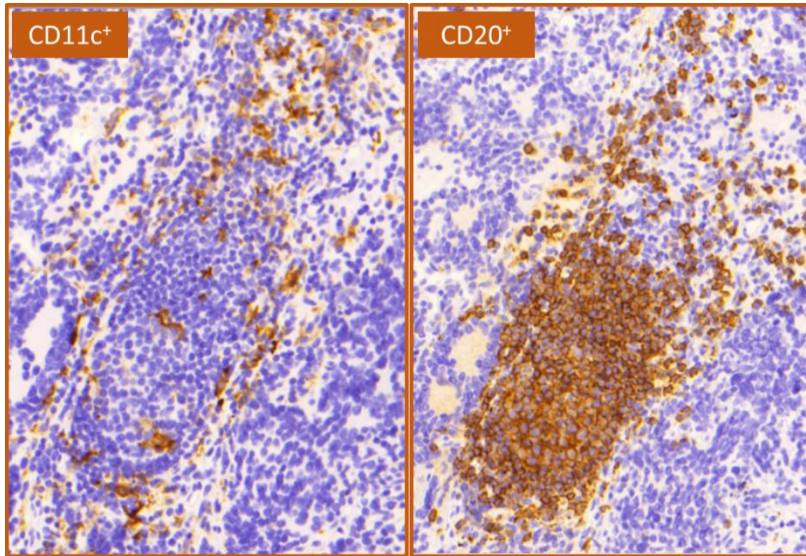


Figura 10. TLO en caso de TNB. Inmunotinciones para CD11c⁺ y CD20⁺.

III.2.4 Análisis digital de los marcadores inmunes

Consideraciones previas:

Antes de pasar a describir el diseño de los algoritmos para cada marcador, así como los métodos de análisis utilizados, ha de tenerse en cuenta lo siguiente:

Dado que el formato generado por el escáner; MRXS, aunque puede abrirse con otro software, como CaseViewer (3DHistech) o ImageScope (Leica Aperio), sólo permite la visualización de las anotaciones realizadas por el Panoramic Viewer (PV) en el propio PV. Por lo que, para realizar cualquier otro análisis de las imágenes con otro software, tales como el Photoshop (Adobe) o el Image Pro Plus (Media Cybernetics), por ejemplo, para generar las imágenes de colocación, fue necesaria la extracción de las imágenes segmentadas o máscaras de

cada cilindro de manera individual. Una vez obtenidas, estas máscaras fueron superpuestas y coloreadas, mediante Photoshop, dando como resultado las imágenes de colocalización.

III.2.4.1 Digitalización

La digitalización de todas las TMA inmunoteñidas con los marcadores inmunes se realizó con el escáner Panoramic MIDI (3D Histech). Este escáner permite digitalizar imágenes con una resolución espacial de $0,50 \mu\text{m}/\text{píxel}$, equivalente a una resolución convencional de 20x, aunque puede llegar hasta 86x (en su nueva versión). Dado que el tamaño de las imágenes escaneadas aumenta considerablemente a grandes resoluciones se seleccionó un aumento de 20x y, por el mismo motivo, las imágenes se guardaron comprimidas en formato JPEG con un factor de calidad de 80. Sin embargo, aunque las imágenes se almacenaron con formato JPEG, los archivos generados por Panoramic MIDI presentan formato MRXS, solo accesible por el software de análisis de imagen de la misma casa comercial: Panoramic Viewer (3D Histech).

III.2.4.2 Segmentación de las imágenes

Una vez escaneadas, las imágenes han de ser correctamente segmentadas. Es decir, con las herramientas proporcionadas por el visor PV, como el software de análisis QuantCenter (QC), se seleccionaron las áreas de interés a analizar. Además de ser un paso requerido para continuar con el análisis digital, es fundamental para evitar incluir en la región a analizar zonas del tejido que puedan artefactar el resultado, como pigmento inespecífico, artefactos, hemorragias, necrosis, plegamientos, etc.

III.2.4.3 Adaptación y validación de los algoritmos

Los pasos requeridos para la adaptación y validación de los algoritmos son los siguientes:

1.- Selección del módulo de análisis

QC presenta diferentes módulos de análisis basados en la localización subcelular del antígeno. Todos los marcadores del sistema inmune estudiados son antígenos de membrana. Por tanto, se escogió el módulo de análisis de membrana “MembraneQuant” para generar los algoritmos y realizar el análisis de todos los marcadores, excepto el marcador CD68⁺ y CD163⁺. Estos marcadores fueron analizados con el modulo nuclear “NuclearQuant” por tener mayor precisión al detectar las células positivas para estos marcadores. Las células que expresan estos marcadores, fundamentalmente macrófagos, poseen grandes dendritas o prolongaciones que dificultaban una más precisa detección por parte del módulo de membrana (**Figura 11**).

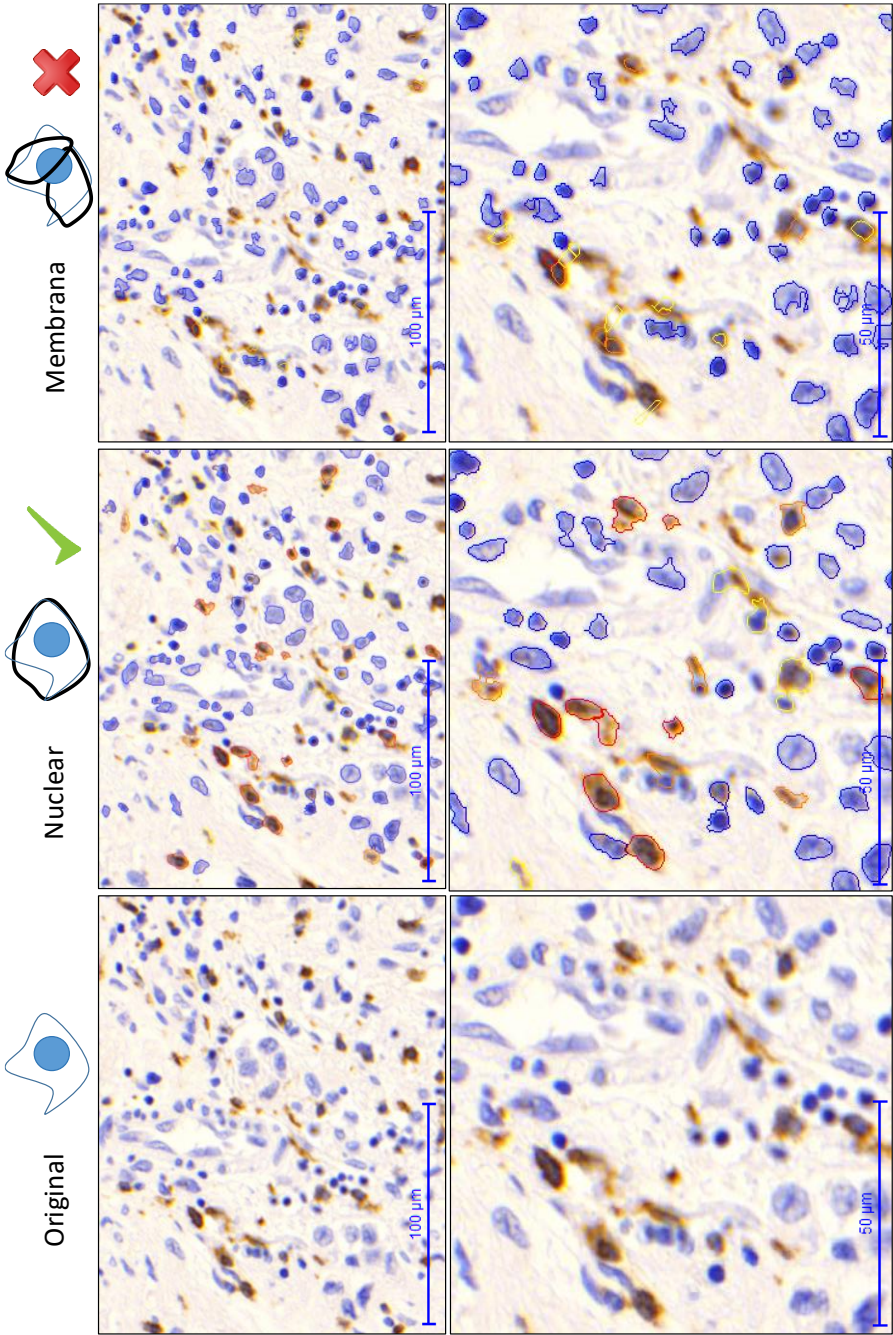


Figura 11. Comparación de los módulos del software QC análisis para elementos CD163+.

2.- Descripción de los parámetros de los algoritmos

Para la detección de los elementos positivos para cada marcador, el diseño de los algoritmos disponibles de QC se realiza mediante la configuración de tres tipos de parámetros: forma, tamaño e intensidad de color. Estos parámetros pueden ajustarse para discriminar los elementos positivos del resto de elementos (negativos o artefactos positivos no celulares). En función del módulo de análisis seleccionado los parámetros pueden ser diferentes.

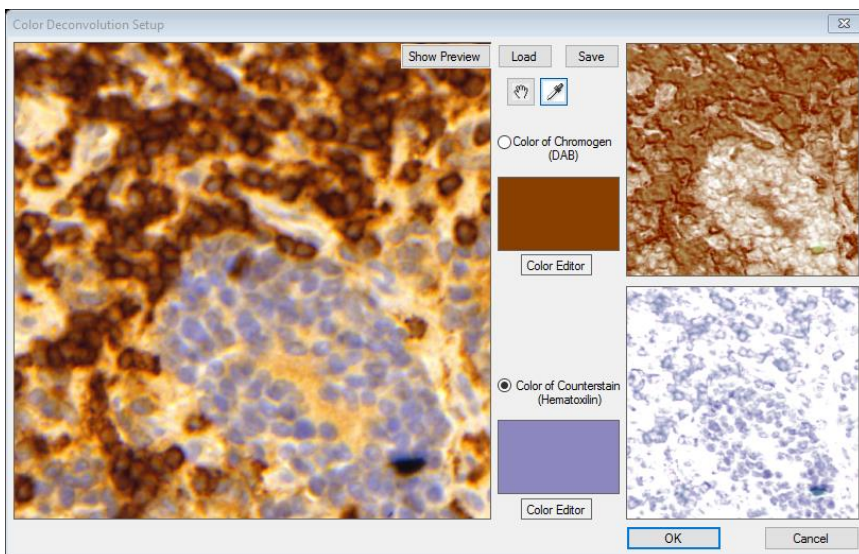


Figura 12. Opción deconvolución de color de QC con los valores de DAB y H seleccionados para los algoritmos del módulo de membrana.

Previamente al ajuste de los parámetros, el módulo QC del visor PV permite elegir, mediante la opción: Deconvolución de color, los valores, en la escala de color rojo, verde y azul (RGB); para el cromógeno, la diaminobenzidina (DAB); y la contratinción, hematoxilina (H) (**Figura 12**). De esta manera, QC detectará los elementos positivos en base a un

único color, determinado en la escala RGB. Sin embargo, con el tipo de parámetro intensidad de color, la selección de colores que serán utilizados en la detección de los elementos queda delimitada en un rango de colores.

- Parámetros del módulo de membrana: MembraneQuant.

El módulo de membrana se basa en la detección de las membranas inmunoteñidas (elementos positivos), por un lado, y la detección de los núcleos sin membranas inmunoteñidas (elementos negativos), por otro lado. Es decir, el módulo de membrana incorpora, además, los parámetros del módulo nuclear para detectar los elementos negativos.

Para detectar los elementos positivos con este módulo, QC cuenta con parámetros de forma, tamaño e intensidad de color. De manera que, en función de los valores asignados por el investigador a cada variable, la detección de las membranas (elementos positivos) varía (**Figura 13**).











Parámetros	Variables	Valor	
		Bajo	Alto
Forma	Redondez		
Tamaño	Área. Membranas en contacto		
	Área (del elemento aislado)		
Intensidad	Borde. Membranas en contacto		
	Media (del elemento aislado)		

Figura 13. Descripción esquemática de los parámetros del módulo de membrana del software QC.

Una vez que han sido ajustados todos los parámetros y las membranas son detectadas, QC permite clasificarlas en función de su intensidad de tinción en diferentes clases: “1+” o intensidad baja, “2+” o intensidad media y “3+” o intensidad alta. Para ello, QC permite seleccionar los valores de intensidad de color que delimitan las diferentes clases. Por último, los elementos negativos serán todos aquellos núcleos detectados que no tengan una membrana positiva asociada y que son detectados con los parámetros del módulo nuclear.

- Parámetros del módulo nuclear: NuclearQuant.

El módulo nuclear se basa en la detección de los núcleos, que podrán estar inmunoteñidos (elementos positivos) o no inmunoteñidos (elementos negativos). Para detectar los elementos positivos con este módulo, QC cuenta con parámetros de forma, tamaño e intensidad de color. De manera que, en función de los valores asignados por el investigador a cada parámetro, la detección de los núcleos varía (**Figura 14**).

Una vez han sido ajustados todos los parámetros y los núcleos son detectados, es posible clasificarlos en función de su intensidad de tinción en diferentes clases, como sucede en el módulo de membrana: negativos, “1+” o de intensidad baja, “2+” o de intensidad media y “3+” o de intensidad alta. Para ello, QC permite seleccionar los valores de intensidad de color que delimitan las diferentes clases. El resto de elementos detectados que no queden dentro de estos valores serán clasificados como elementos negativos.










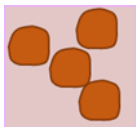


Parámetros	Variables	Valor	
		Bajo	Alto
Forma	Regularidad		
	Circularidad nuclear		
Tamaño	Área mínima nuclear		
	Radio nuclear (rango)		
Intensidad	Contraste mínimo		
	Intensidad mínima		

Figura 14. Descripción esquemática de los parámetros del módulo nuclear del software QC

Explicación de los algoritmos creados

A continuación, se especifican los valores decididos para cada parámetro de los diferentes algoritmos adaptados de los dos módulos de QC esquematizados en la **Figura 13** y **Figura 14**. Los valores se definieron tras la verificación de los resultados de pruebas de ensayo-error en al menos 50 imágenes (2 TMA) por cada algoritmo de cada marcador. Los datos objetivos del número de elementos positivos por

unidad de área fueron revisados subjetivamente con las imágenes, por dos investigadores. Cuando el algoritmo no fue válido se reajustaron los valores y se repitió el paso anterior, cuando el algoritmo fue válido se continuó el análisis en el resto de TMA. Los pasos seguidos se esquematizan en **Figura 15**.

Los valores de los parámetros se indican en el **Anexo: Anexo 1** (página 268).

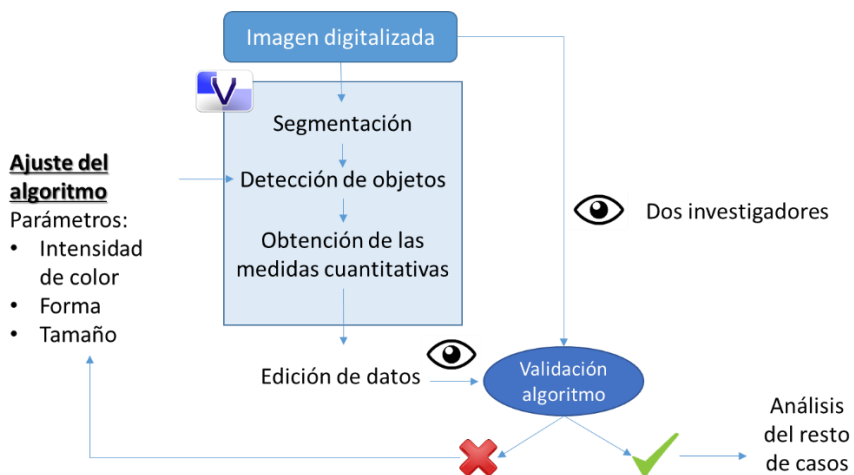


Figura 15. Esquema de validación de los algoritmos.

A continuación, se explica, de manera más detallada, los valores seleccionados para cada parámetro de los algoritmos:

Parámetro: forma

Para el módulo de membrana, la variable que nos define el parámetro de la forma del elemento detectado es la redondez. Para los marcadores CD4⁺, CD8⁺, CD11b⁺ y CD11c⁺, que comparten el mismo algoritmo, así como para CD45⁺ se seleccionó una redondez menor que

para los marcadores CD7⁺ y CD20⁺ (4 frente a 6). Esto se debió a que CD11b⁺, CD11c⁺ y CD45⁺ marcaban células con irregularidades en su membrana. En el caso de CD4⁺ y CD8⁺, que marcaban linfocitos (células esféricas), se comprobó mediante ensayo-error que no existían diferencias entre su valor de redondez de 4 frente al 6.

Para el módulo nuclear, los valores de las variables que definen la forma de los elementos detectados: circularidad nuclear mínima y regularidad, fueron los mismos para todos los marcadores.

Parámetro: tamaño

El área celular definida en los algoritmos fue la misma para los elementos CD4⁺, CD7⁺, CD8⁺, y CD20⁺, CD11b⁺ y CD11c⁺. Definiendo que el elemento (célula) detectado tiene un área aproximadamente circular, el valor para el diámetro celular puede ser calculado mediante la fórmula del área de un círculo (πr^2). De esta manera vemos que el diámetro que definimos para los algoritmos de estos marcadores iba de 3,6 μm a 25,2 μm (valores especificados para el área de 10 y 500 μm^2 , respectivamente; Anexo: **Anexo 1** (página 268). Se obtuvo el radio despejando r de la fórmula para ambas áreas; $10 = \pi r^2$ y $500 = \pi r^2$. El valor resultante del radio se multiplicó por 2 para obtener el diámetro). En el caso del marcador CD45⁺, el diámetro seleccionado comprendió un rango un poco más amplio, de 2,5 μm a 25,2 μm , ya que así pudimos seleccionar elementos positivos más pequeños (como prolongaciones de células dendríticas o macrofágicas).

Para los marcadores de macrófagos (CD68⁺ y CD163⁺), el diámetro fue de 10 a 30 μm con un área superior a 6 μm^2 . Este valor para el área fue un filtro restrictivo para elementos cuya forma no fuera un círculo. A modo de ejemplo, el área de una estructura romboidal con un radio mayor de 5 μm y uno menor de 0,5 μm sería de 5 μm^2 , y por lo tanto descartado al ser un objeto pequeño.

Parámetro: Intensidad de color

Estas variables completan el rango de color RGB, que detectará la H y la DAB de los elementos negativos/positivos, que inicialmente fue determinado por la opción deconvolución de color (**Figura 12**, pág. 97).

Para el módulo de membrana, a mayor valor para la variable intensidad del borde, las membranas en contacto tenían valores RGB mayores y, por tanto, detectó incluso las más tenues. La variable intensidad media, es similar, pero hace referencia a las membranas de los elementos individuales de manera que, a mayor valor, menor intensidad de color seleccionada. En el caso del marcador CD7 estos valores fueron los más elevados puesto que la intensidad de la inmunotinción fue débil en la cohorte anual ã1.

En el caso del módulo nuclear, la variable intensidad mínima nos marcó un punto de corte de 10, por debajo del cual (más oscuro) no se seleccionaron elementos. Mientras que, el parámetro contraste mínimo, con un valor de 2, permitió detectar elementos que contrastaban poco con el fondo. Este valor fue útil cuando hubo escasa presencia de ruido de fondo o tinción inespecífica.

Parámetro: tipo de positividad

Los elementos positivos detectados se pudieron clasificar según su intensidad de color en elementos tipo 1+, 2+ o 3+, permitiendo al investigador seleccionar un tipo de elementos y descartar otros con el fin de validar al máximo el dato objetivo del número de células positivas presentes en la imagen, tras las pruebas de ensayo-error en casos con ruido de fondo. La **Tabla 17** muestra la selección que se hizo del tipo de elementos positivos para cada marcador:

Tabla 17. Tipo de elementos positivos seleccionados, para obtener los datos objetivos finales, para cada marcador en las diferentes cohortes anuales.

Cohorte	CD11b	CD45	CD163	Resto de CD
ā1	3+	3+	2+ y 3+	Total +
ā2 y ā3	Total +	Total +		

Las muestras incluidas en TMA de la cohorte ā1 presentaron una tinción inmunohistoquímica de los marcadores CD11b y CD45 con ruido de fondo (tinción inespecífica). De manera que, los elementos positivos débiles detectados correspondieron a tinción inespecífica (**Figura 16**).

En cuanto al marcador CD163, la presencia de un gran número de posibles prolongaciones celulares que, en ocasiones resultaban difíciles de discriminar frente a pigmentación inespecífica, llevó a los investigadores a restringir los elementos positivos detectados a los tipos 2+ y 3+.

Para el resto de marcadores todos los elementos (1+, 2+ y 3+) fueron tenidos en cuenta para obtener los datos objetivos finales.

Células negativas

El conteo de elementos negativos con el QC se dio en función del módulo seleccionado. Así pues, para el módulo de membrana, el software detectó como elemento negativo a todo núcleo que no tuviera una membrana asociada teñida con la DAB. Por otro lado, para el módulo nuclear, los elementos negativos fueron aquellos núcleos que el software detectara con una intensidad de DAB menor a la seleccionada por el investigador para los objetos positivos 1+.

Una vez cuantificados los elementos negativos por el QC, se procedió, al igual que con los elementos positivos, a calcular la media de elementos negativos por unidad de área.

El valor utilizado de elementos negativos fue un valor genérico para todos los marcadores, que nos pudiera dar una idea de la infiltración celular en estos TNB.

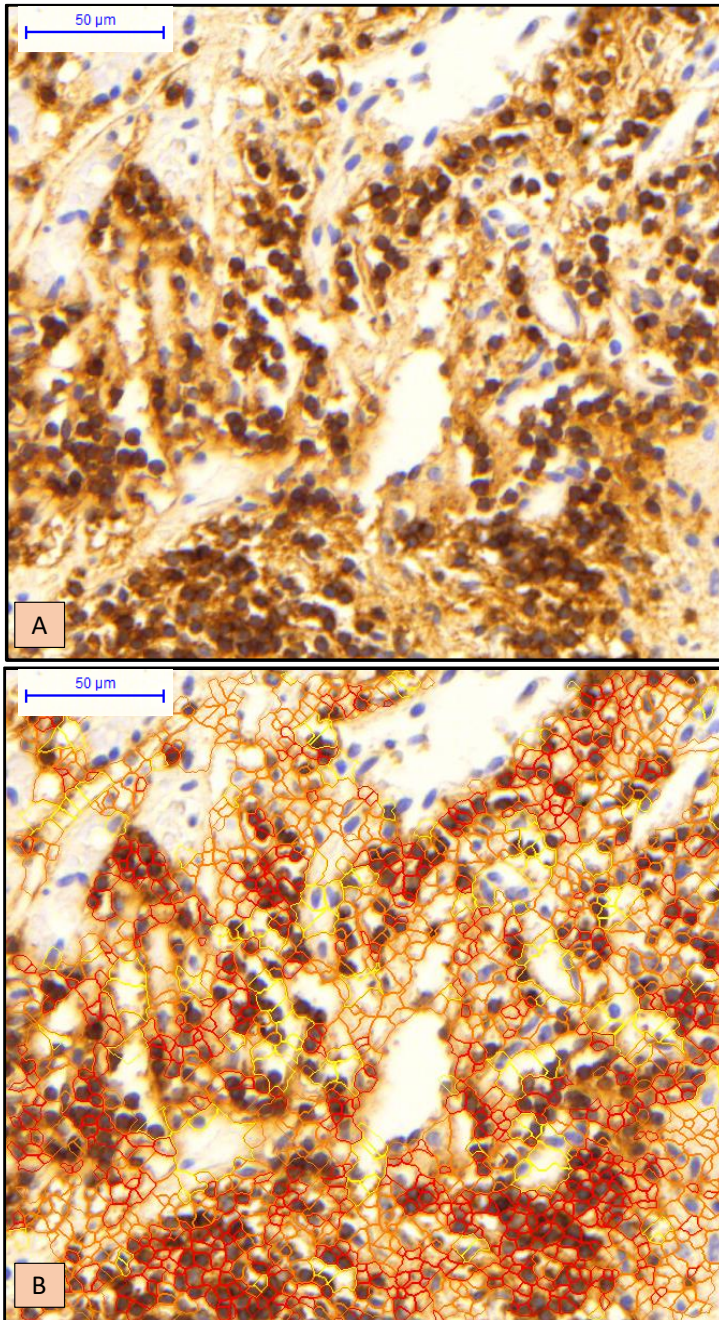


Figura 16. A) Imagen microscópica digital de un TNB teñido con anticuerpo antiCD45. B) Detección de elementos 1+ (amarillos), 2+ (naranjas) y 3+ (rojos). La imagen muestra un mejor ajuste a las células seleccionando los elementos 3+.

III.2.4.4 Tratamiento de los datos cuantitativos objetivos

Los algoritmos adaptados del QC cuantificaron el número de elementos detectados en el área de interés segmentada para cada cilindro. Se calculó el número de elementos/células positivas por unidad de área (mm^2) en cada cilindro y, a continuación, se calculó la media de todos los cilindros para tener el dato bruto, es decir, sin ningún procesamiento, por paciente. Sin embargo, la presencia de medidas correspondientes a artefactos, tales como: pliegues del tejido, ruido de fondo por inmunoreacción cruzada, por tinción inespecífica, fallos en el enfoque del escáner, etc., tuvieron que ser descartadas. Estos falsos datos debidos a errores externos al algoritmo fueron corregidos por el investigador, quién les dio un valor subjetivo utilizando las imágenes separadas y sin segmentar para el número de células/ mm^2 .

Tras la observación y el recuento del número de células positivas por unidad de área de algunos marcadores en las diferentes cohortes, se observaron diferencias en el marcaje inmunohistoquímico entre las cohortes anuales $\bar{a}1$ y $\bar{a}2/\bar{a}3$. Concretamente, los marcadores CD7, CD45, CD68 y CD163 presentaban un mayor número de células positivas por unidad de área en las cohortes $\bar{a}2$ y $\bar{a}3$ respecto a la cohorte $\bar{a}1$. Estas diferencias fueron claramente evidenciadas al comparar las cohortes temporales, en las que se vio que la positividad incrementaba de la manera siguiente: $t1 < t2 < t3$. En cuanto al marcador CD11b esta diferencia fue inversa: la cohorte $\bar{a}2$ presentó menor positividad que la cohorte $\bar{a}1$. Estas diferencias se explican en el apartado: Discusión.

Se corrigieron estas diferencias realizando una transformación lineal de los datos de la cohorte $\bar{a}1$ o de la $\bar{a}2$ en relación a los marcadores previamente reseñados. Esta transformación mantuvo las diferencias de distribución y de dispersión de los datos, con lo que no se alteró el resultado estadístico de los tests no paramétricos de variables no normales (tests aplicados a todos los datos de CD). Para realizar dicha transformación, se multiplicó cada dato por un múltiplo definido como media de la cohorte $\bar{a}2$ entre media de la cohorte $\bar{a}1$, a excepción del marcador CD11b cuyo múltiplo fue el inverso. Gracias a este factor de recodificación, los valores, y por tanto la media, de la cohorte transformada se equiparaban a los de la cohorte que consideramos como correcta tras realizar un ensayo de inmunotinción y comparación en el que varió el tiempo de almacenaje de las TMA. La **Tabla 18** muestra un resumen del proceso de recodificación de estos marcadores y el valor del factor de recodificación.

Tabla 18. Resumen del proceso de recodificación

<i>CD</i>	<i>CD7</i>	<i>CD11b</i>	<i>CD45</i>	<i>CD68</i>	<i>CD163</i>
<i>Cohorte que recodifica</i>	$\bar{a}1$	$\bar{a}2$	$\bar{a}1$	$\bar{a}1$	$\bar{a}1$
<i>Obtención del FR</i>	$\hat{A}2 / \hat{A}1$	$\hat{A}1 / \hat{A}2$	$\hat{A}2 / \hat{A}1$	$\hat{A}2 / \hat{A}1$	$\hat{A}2 / \hat{A}1$
<i>Valor del FR</i>	4,83	4,33	1,94	4,53	4,76

FR (factor de recodificación); \hat{A} (valor promedio de elementos positivos/mm² de la cohorte sin valores extremos).

Dada la poca infiltración inmune, característica en los TNB y de nuestra cohorte de tumores, el análisis estadístico de las variables continuas de las células positivas quedó condicionado por dos razones: la presencia de un alto porcentaje de casos negativos y un alto porcentaje de casos con una infiltración leve para los diferentes CD.

Para abordar este condicionamiento, se categorizaron las variables continuas de las células CD⁺ como: baja/nula, media y alta, utilizando como puntos de corte los cuartiles 2 y 3 de la cohorte anual $\bar{a}1$ o $\bar{a}3$ según el CD (**Tabla 19**), y, además, se simplificó a dos categorías (alta *versus* baja/nula infiltración), dejando como único punto de corte el cuartil 3. De modo que, finalmente, obtuvimos dos variables categóricas.

La decisión de tomar estos valores como puntos de corte se rigió por los siguientes criterios:

- a) Comparación de los datos en todas las cohortes. Los puntos de corte seleccionados fueron aplicables por igual en todas las cohortes.
- b) Minimizar el número de falsos positivos (FP) y negativos (FN) al comparar los resultados con el análisis subjetivo.
- c) Unificar criterios en todos los marcadores.

Tabla 19. Puntos de corte seleccionados para categorizar la variable continua del número de células positivas por unidad de área.

	CD4	CD7	CD8	CD20	CD11b	CD11c	CD45	CD68	CD163
Cohorte	$\bar{a}3$	$\bar{a}1$					$\bar{a}3$		
Q2	8	19	18	10	11	13	99	364	237
Q3	26	48	51	41	30	43	361	596	441

Q, cuartil (Q2: cuartil segundo o mediana, y Q3: tercer cuartil)

Estas categorizaciones sirvieron para facilitar los estudios estadísticos de patrones o modelos de infiltrado celular inmune, al poder combinar las diferentes categorías de infiltración de número de células de los CD, para crear las diferentes combinaciones que fueron estudiadas:

1. CD7^{ALTA} y CD11c^{ALTA}.
2. CD7^{ALTA}, CD45^{ALTA}.
3. CD7^{ALTA}, CD20^{ALTA} y CD11c^{ALTA}.
4. Sin células CD8⁺, CD11c⁺ y CD45⁺ e infiltración CD68^{ALTA}.
5. CD8^{BAJA} y CD68^{ALTA}.
6. CD11b^{ALTA} y CD11c^{BAJA}.
7. CD11b^{ALTA} y CD68^{ALTA}.
8. CD11c^{BAJA} & CD68^{ALTA}.
9. CD45^{ALTA}, CD11b^{BAJA} y CD68^{BAJA}.
10. CD68^{ALTA} & CD163^{ALTA}.
11. CD68^{ALTA} & CD163^{ALTA} & CD11b^{ALTA}.

III.2.7 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS v.22 (IBM statistics). En todos los resultados, solo se tuvo en cuenta como estadísticamente significativo p-valores <0,05. A continuación, se detallan los tests estadísticos realizados para cada análisis.

III.2.7.1. Validación de la cohorte con los datos clínicos y biológicos de la INRG

La representatividad de la cohorte total de pacientes/muestras se realizó mediante la confirmación estadística de la evolución clínica de los pacientes en base a las características clinicobiológicas/genéticas o factores pronósticos [109]. Todas las variables, que forman esta clasificación de riesgo pre-tratamiento, se relacionaron con la EFS y la OS de los pacientes. Seguimientos inferiores a 3 meses sin eventos fueron descartados.

➤ Análisis de supervivencia

Se realizaron test de supervivencia log-rank (con sus curvas Kaplan Meier) en base a la EFS y la OS de los pacientes para todos los factores independientes.

➤ Análisis de supervivencia multivariante

Los factores estadísticamente significativos para los tests anteriores se introdujeron como variables independientes en una regresión de COX para, mediante el método hacia atrás (Wald), ver cuál de ellos resultó ser el más importante para la supervivencia en la cohorte.

III.2.7.2. Estudios de supervivencia

A. Análisis univariante

Para investigar la posible influencia en la supervivencia, expresada como OS y EFS, por parte de las diferentes variables o combinaciones de variables del sistema inmune, se realizaron dos tests: test log-rank (curvas Kaplan Meier) para las variables categóricas, y regresiones de COX para las variables continuas.

B. Análisis multivariante

- a. Todas las variables del sistema inmune fueron introducidas en la regresión de COX, y mediante los métodos hacia atrás y hacia adelante (wald) se buscaron modelos significativos.

- b. Las variables del sistema inmune se introdujeron junto a los factores clínico-biológicos, para ver aquellas variables que ejercían mayor influencia en la supervivencia.

III.2.7.3. Relación entre los factores clínico-biológicos con las variables del sistema inmune

Pruebas de normalidad

Las medias poblacionales de los datos de los CD, medidos de manera continua, de cada población de pacientes agrupados según sus características de la INRG, fueron analizadas mediante test de normalidad (Kolmogorov Smirnov) para utilizar o no los test paramétricos.

Comparación de dos muestras

Para encontrar estas potenciales relaciones, entre el número/grado de infiltración de células del sistema inmune y los factores de la INRG se realizaron dos aproximaciones: Por un lado, se analizaron las variables del SI continuas en un análisis bivalente, bien mediante el test Kruskal Wallis (cuando el factor de la INRG utilizado tenía >2 categorías, como el estadio o el grado de diferenciación del tumor) o bien con el test U-Mann Whitney (cuando el factor de la INRG utilizado tenía únicamente 2 categorías). Por otro lado, las variables objetivas continuas, que fueron categorizadas, y las variables subjetivas se relacionaron con los factores clínicos y genéticos mediante test Chi cuadrado.

Dependencia o causa-efecto entre factores de la INRG y las variables del sistema inmune

Para investigar relaciones de causa-efecto entre los factores clínico-biológicos del tumor con las variables del sistema inmune, se realizaron test de regresión logística binaria teniendo como variable a explicar los factores clínico-biológicos y como variable explicativa las variables del sistema inmune. Se obtuvo el Área Bajo la Curva (AUC) y el porcentaje de sensibilidad/especificidad (S/E) del modelo como parámetros de la capacidad predictiva del modelo. De manera que valores para AUC mayores de 0.8 indicaron una buena capacidad predictiva del modelo obtenido. Además, para las variables del sistema inmune categóricas se realizó una simulación de muestreo con una muestra de entrenamiento (E) del 80% de los casos y una muestra de validación (V) del 20% de los casos. La selección de casos se realizó mediante la función de Bernoulli, que permite seleccionar completamente al azar una muestra perfectamente representativa de la cohorte total. La simulación de muestreo permitió conocer hasta qué punto los resultados de nuestra cohorte fueron extrapolables a la población general de pacientes. De este modo, se consideró como buenos modelos pronóstico aquellos con valores de AUC por encima de 0,8 en las cohortes de E y de V.

Clasificación de riesgo en base a los factores de la INRG y/o las variables del sistema inmune

El mismo análisis de regresión logística binaria se aplicó a las variables de RC, RR y UHR explicadas en la página 82. Estas variables de

riesgo, a diferencia del resto de factores clínico-biológicos que son variables independientes, son variables dependientes del resto de factores de la INRG y, por tanto, también podrían depender o estar influidos por el infiltrado inmune.

Para poder examinar la calidad de los resultados de los tests de regresión logística binaria, se realizaron curvas ROC de los modelos de regresión, y se obtuvieron su especificidades y sensibilidades.

IV. RESULTADOS

IV.1 Características de los factores clínico-biológicos de la cohorte total

Los resultados del presente trabajo respecto a las células del sistema inmune requieren una cohorte de pacientes cuyos tumores cumplan las características clinicobiológicas definidas por la INRG. Las tablas siguientes (**Tabla 20** y **Tabla 21**), nos dan información sobre el número de casos, la media y el intervalo de confianza del tiempo de EFS (tEFS) global, a 5 y a 10 años, y el tiempo de OS (tOS) global, a 5 y 10 años de los factores clínicos de los pacientes: estadio, edad, histopatología; los factores genéticos del tumor (*MYCN*, 11q, 1p, 17q, perfil genómico); y la clasificación de riesgo de los pacientes de la INRG. En el presente estudio, el 34% de los pacientes (n=175) sufrieron evento (recaída o exitus) con una media de $137,9 \pm 4,7$ meses (IC al 95%: 128,7-147,0), la EFS a 5 años de $64,5 \pm 2,2$ meses, y la EFS a 10 años de $61,8 \pm 2,5$ meses, siendo el mínimo de 0 y el máximo de 211 meses. Por otro lado, el 28% de los pacientes (n=149) sufrieron *exitus* con una media de $168,2 \pm 7,5$ meses (IC al 95%: 153,6-182,8), la OS a 5 años de $70,3 \pm 2,2$ y la OS a 10 años de $65,6 \pm 2,7$ meses, siendo el mínimo de 0 y el máximo de 157 meses. La mediana de seguimiento de los pacientes fue de 54 meses (4,5 años).

Por otra parte, la representación gráfica de estas tablas de estos factores clinicobiológicos en la cohorte de estudio queda reflejada en las curvas Kaplan Meier de las páginas 120 a 124.

Tabla 20. Estadísticos descriptivos de los factores clínicos y genéticos respecto a la EFS.

Factor	N total	N eventos	Media	tEFS				
				95% IC	5 AÑOS (%)	10 AÑOS (%)		
Total	514	175	137,9	128,7	147,0	64,5±2,2	61,8±2,5	
Estadio	L1 & L2	297	51	175,5	166,5	184,6	82,3±2,3	81,2±2,4
	M	175	116	66,4	54,0	78,7	31,5±3,8	26,8±4,2
	Ms	37	8	97,4	83,6	111,3	79,6±7,0	74,9±8,0
Edad (meses)	<18	290	58	169,5	159,7	179,4	79,5±2,5	78,1±2,6
	≥ 18	223	117	81,9	71,4	92,4	45,0±3,6	40,8±4,2
Cat. Hist	GN, GNBe	41	6	142,8	124,8	160,9	82,7±6,6	82,7±6,6
	NB, GNBnod	455	162	136,0	126,7	145,3	63,0±2,4	60,1±2,7
Dif. Tum	I	70	47	71,1	52,1	90,2	34,2±5,8	30,4±5,7
	pD	308	90	126,1	117,1	135,2	69,1±2,8	66,0±3,3
	Dif	47	8	152,4	133,1	171,6	81,4±6,0	81,4±6,0
MYCN	MNNA	427	116	151,3	141,3	161,3	71,5±2,3	68,6±2,8
	MNA	84	58	55,9	40,5	71,3	29,1±5,1	27,1±5,2
11Q	ND	374	97	156,8	147,2	166,0	73,2±2,4	71,6±2,5
	D	105	68	65,2	49,1	81,3	34,4±4,9	26,1±7,0
1p	ND	336	77	163,3	153,8	172,8	76,0±2,4	74,7±2,6
	D	135	78	82,6	67,7	97,5	41,1±4,4	38,1±4,6
17q	NG	225	37	177,0	166,7	187,3	82,4±2,7	82,4±2,7
	G	217	112	96,0	84,1	107,9	48,7±3,5	44,9±3,8
Perfil genético	NCA	138	15	158,5	149,3	167,8	87,8±3,0	87,8±3,0
	SCA	271	133	110,2	97,8	122,6	50,8±3,2	47,7±3,4
RR	No HR	386	87	160,9	150,7	171,1	77,5±2,2	74,3±2,8
	HR	128	88	57,0	44,9	69,0	25,6±4,2	24,2±4,2

Tabla 21. Estadísticos descriptivos de los factores clínicos y genéticos respecto a la OS.

Factor	N total	N eventos	tOS					
			Media	95% IC		5 AÑOS (%)	10 años (%)	
Total	526	149	168,2	153,6	182,8	70,3±2,2	65,6±2,7	
Estadio	L1 & L2	304	34	221,4	212,4	230,5	87,5±0,2	87,5±0,2
	M	178	109	78,2	65,6	90,9	39,0±3,9	28,7±4,5
	Ms	39	6	103,6	91,4	115,7	82,3±6,7	82,3±6,7
Edad (meses)	<18	297	39	216,6	206,6	226,5	86,5±2,1	85,1±2,3
	≥ 18	228	110	98,7	86,0	111,5	49,6±3,6	41,6±4,5
Cat. Hist	GN, GNBe	42	6	143,2	125,5	160,9	85,1±6,3	85,1±6,3
	NB, GNBnod	465	136	170,6	158,8	182,5	69,4±2,3	64,1±2,9
Dif. Tum	I	73	46	79,2	60,3	98,1	37,1±5,9	31,9±6,1
	pD	315	71	150,7	141,2	160,1	76,0±2,6	71,9±3,5
	Dif	47	5	164,1	148,4	179,7	88,1±5,1	88,1±5,1
MYCN	MNNA	435	88	184,0	165,1	202,9	78,9±2,2	73,6±3,0
	MNA	88	60	59,1	44,3	73,9	28,4±5,1	26,4±5,1
11Q	ND	383	80	195,6	184,9	206,3	78,0±2,2	75,7±2,6
	D	108	60	88,9	71,5	106,3	44,5±5,1	32,4±7,5
1p	ND	340	51	204,6	191,0	218,2	84,5±2,1	79,8±3,4
	D	141	79	90,1	75,1	105,0	42,7±4,4	39,2±4,5
17q	NG	229	26	220,7	210,0	231,3	87,2±2,4	87,2±2,4
	G	223	99	112,2	99,6	124,7	56,1±3,5	50,2±4,0
Perfil genético	NCA	141	9	166,5	159,2	173,8	92,9±2,3	92,9±2,3
	SCA	279	118	140,4	123,5	157,3	57,3±3,1	52,4±3,6
RR	No HR	397	66	192,9	168,7	217,1	82,4±2,0	79,0±3,3
	HR	129	83	67,3	55,6	79,1	34,5±4,6	23,9±4,8

❖ Estadío

Los pacientes con estadios localizados (L1 o L2) y Ms tuvieron mejor supervivencia comparados con aquellos con estadio M.

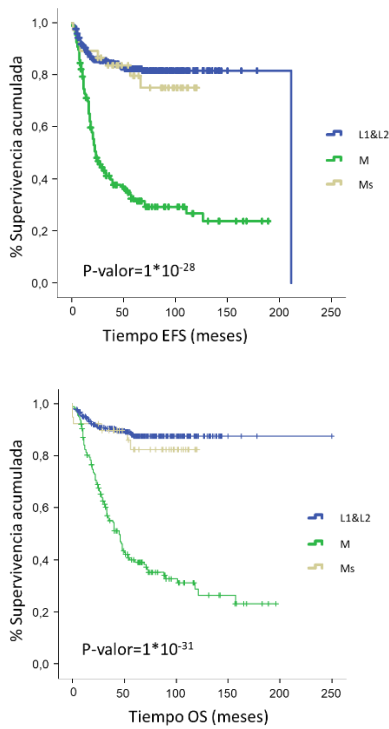


Figura 17. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier que muestran la influencia del estadio de los pacientes en la supervivencia medida como EFS (gráfica superior) y OS (gráfica inferior)

❖ Edad

Los pacientes menores de 18 meses de edad tuvieron mejor supervivencia comparados con aquellos mayores de 18 meses de edad.

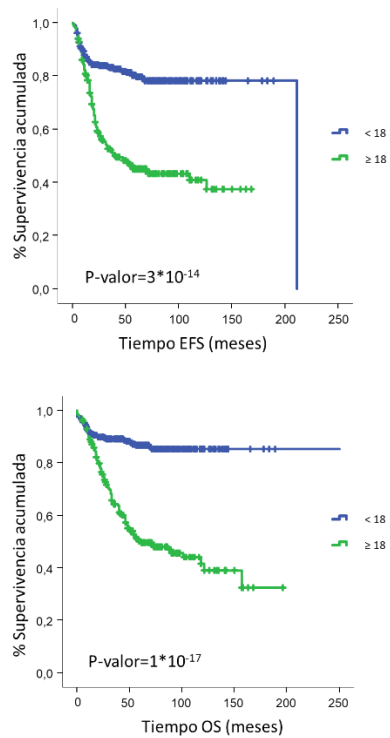


Figura 18. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier que muestran la influencia de la edad de los pacientes sobre la supervivencia medida como EFS (gráfica superior) y OS (gráfica inferior).

❖ Categoría histológica de los tumores

Los pacientes con GN o GNBe entremezclados presentaron mejor supervivencia que los pacientes con NB o GNBe nodulares.

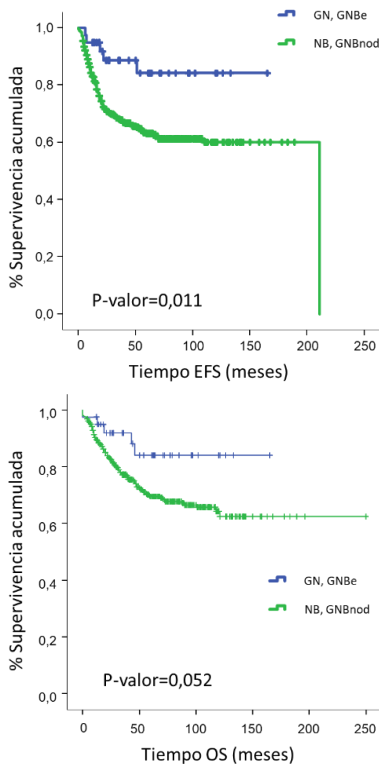


Figura 19. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier que muestran la influencia de la categoría histológica sobre la supervivencia de los pacientes medida como EFS (la OS no resultó significativa, pero muestra la misma tendencia).

❖ Grado de diferenciación de las células tumorales

Los pacientes con tumores en diferenciación tuvieron mejor supervivencia comparados con tumores pobremente diferenciados y estos a su vez mejor que los indiferenciados.

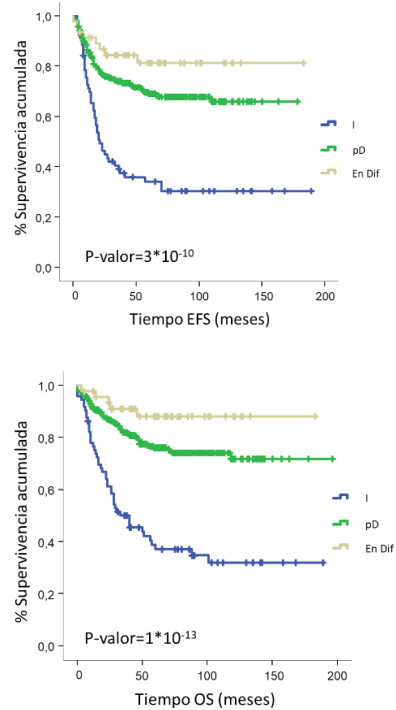


Figura 20. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier que muestran la influencia del grado de diferenciación tumoral sobre la supervivencia medida como EFS (gráfica superior) y OS (gráfica inferior).

❖ *MYCN*

Los pacientes con tumores no amplificados tuvieron mejor supervivencia que aquellos con tumores amplificados.

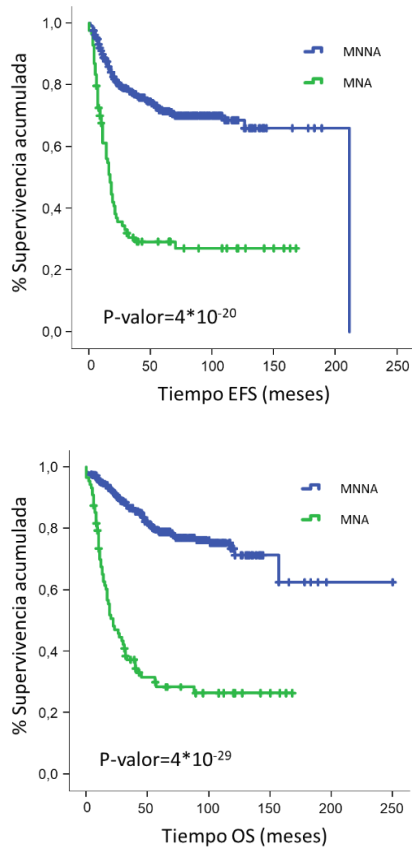


Figura 21. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier que muestran la influencia del status del gen *MYCN* sobre la supervivencia de los pacientes medida como EFS (gráfica superior) y OS (gráfica inferior).

❖ 11q

Los pacientes con tumores sin la delección del 11q tuvieron mejor supervivencia que aquellos con la delección.

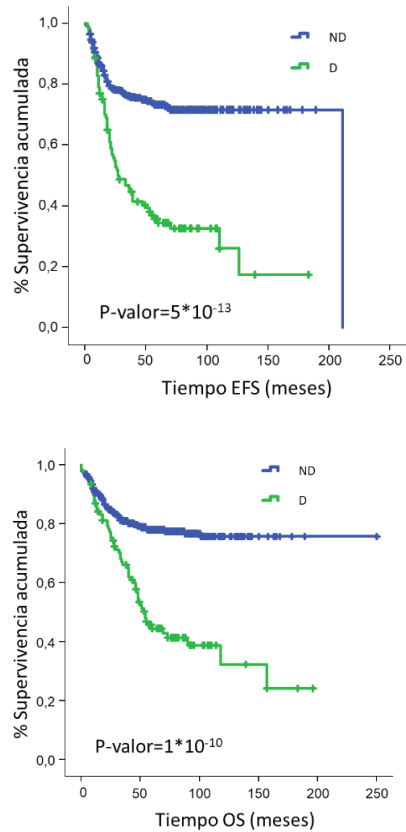


Figura 22. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier que muestran la influencia del status del cromosoma 11q sobre la supervivencia de los pacientes medida como EFS (gráfica superior) y OS (gráfica inferior).

❖ 17q

Los pacientes con tumores sin la ganancia del 17q tuvieron mejor supervivencia que aquellos con la ganancia.

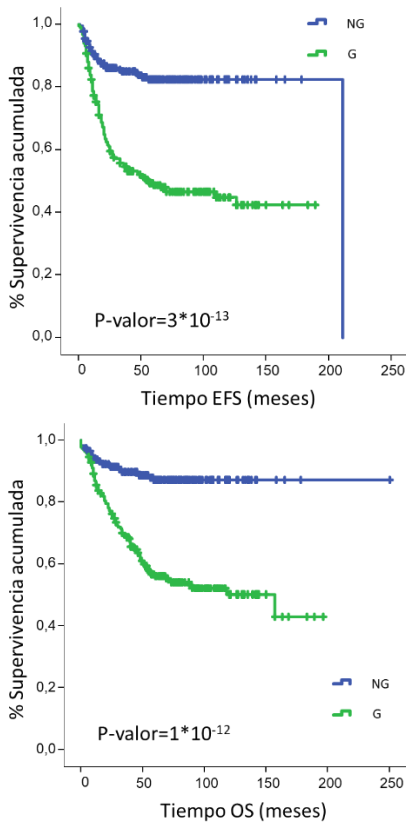


Figura 23. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier que muestran la influencia del status del cromosoma 17q sobre la supervivencia de los pacientes medida como EFS (gráfica superior) y OS (gráfica inferior).

❖ 1p

Los pacientes con tumores sin la delección del 1p tuvieron mejor supervivencia que aquellos con la delección.

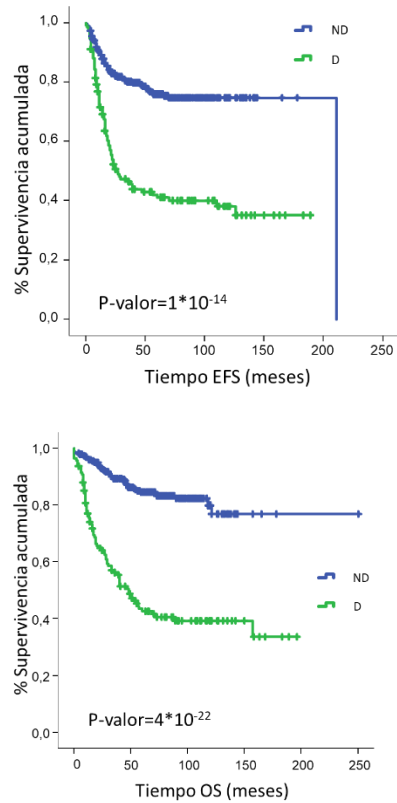


Figura 24. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier que muestran la influencia del status del cromosoma 1p sobre la supervivencia de los pacientes medida como EFS (gráfica superior) y OS (gráfica inferior).

❖ Perfil genómico

Los pacientes con NCAs tuvieron mejor supervivencia de aquellos con SCAs.

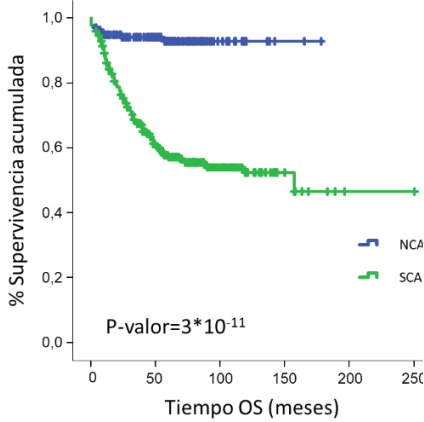
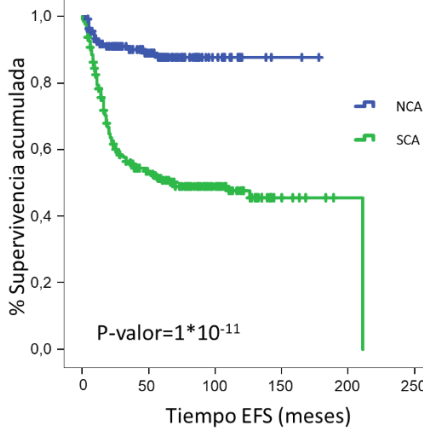


Figura 25. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier que muestran la influencia de las alteraciones cromosómicas sobre la supervivencia de los pacientes medida como EFS (gráfica superior) y OS (gráfica inferior).

❖ Riesgo (real)

Los pacientes pertenecientes a la categoría de riesgo no alto tuvieron mayor tiempo de supervivencia frente a los de riesgo alto.

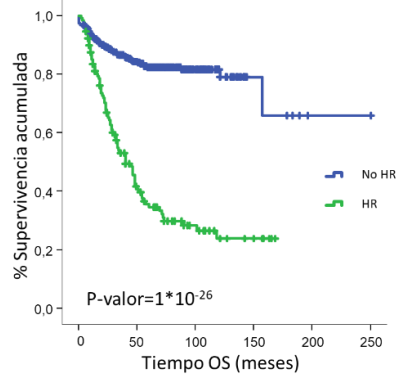
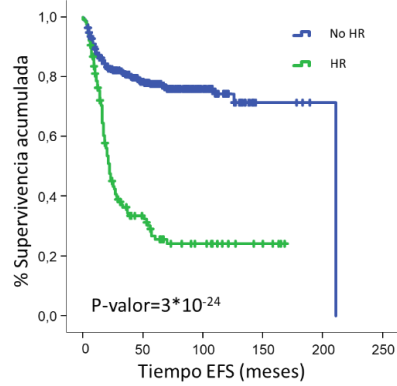


Figura 26. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier medida como EFS (gráfica superior) y OS (gráfica inferior) para las cohortes de bajo y riesgo alto (HR).

IV.2 Descripción histológica del infiltrado inmune

Se distinguieron diferentes distribuciones espaciales de las células marcadas con los diferentes CD, de manera que se clasificaron en nódulos o acúmulos redondos u ovoides (TLOs), nichos perivasculares, áreas ricas en estroma y en disposición difusa. Todas estas distribuciones se observaron en relación peri y/o intranidos de los Nb. Además, los macrófagos siguieron distribuciones espaciales diferentes y presentaron múltiples morfologías.

IV.2.1 Morfología celular

No se observaron diferencias en la forma celular de los elementos positivos detectados con los marcadores CD4, CD7, CD8, CD20, CD11c, CD11b, CD45 y CD68, pero, sin embargo, si se apreciaron diferentes morfologías para los macrófagos CD163⁺. De manera que estos macrófagos pudieron ser divididos en diferentes morfologías: redonda (Rd) (**Figura 27**) y estrellada (**Figura 28**); y diferentes tamaños: grandes, medianos y pequeños:

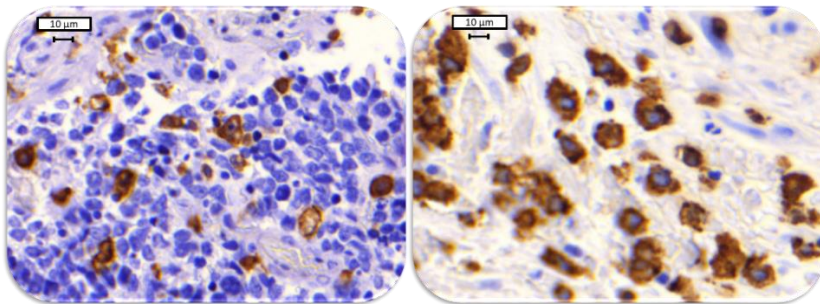


Figura 27. Imágenes microscópicas digitales no segmentadas de TNB con TAM CD163⁺ con morfología redonda

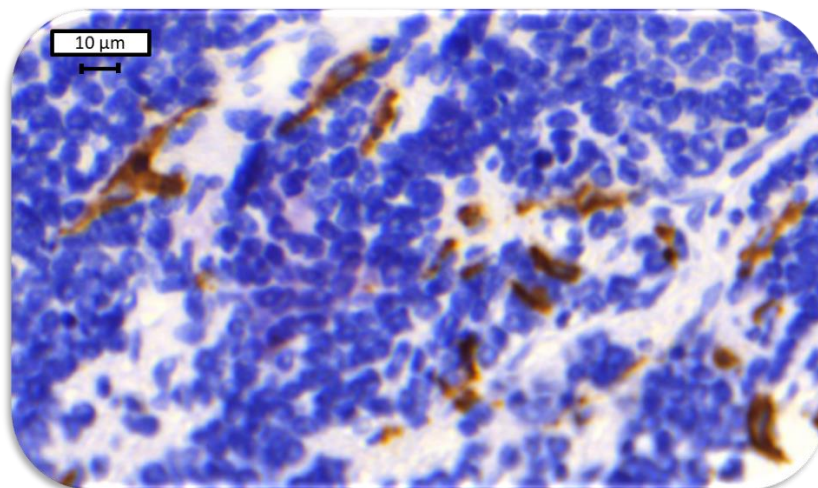


Figura 28. Imágenes microscópicas digitales no segmentadas de TNB con TAM CD163⁺ con morfología estrellada.

La forma de estas células se relacionó significativamente con el número de elementos positivos detectados en las muestras, de manera que cuando éstos presentaban morfologías redondas se detectaba mayor cantidad de elementos CD163⁺ (p-valor>0,001). Estos resultados pueden verse en la siguiente tabla:

Tabla 22. Relación entre el número de elementos CD163⁺ y su morfología.

Morfología CD163 ⁺	Estrellada	Redonda
Media ± D.T	331 ± 467	603 ± 1120
Mediana ± Rango intercuartílico	190 ± 371	275 ± 533

IV.2.2 Nódulos linfoides terciarios

En general, cuando el número de linfocitos era elevado su agrupación en TLO en relación con los nidos de Nb era frecuente. La composición de estos nódulos variaba, pudiendo encontrar nódulos en los que predominaban los linfocitos B (**Figura 30**) y nódulos en los que predominaban linfocitos T (**Figura 29**).

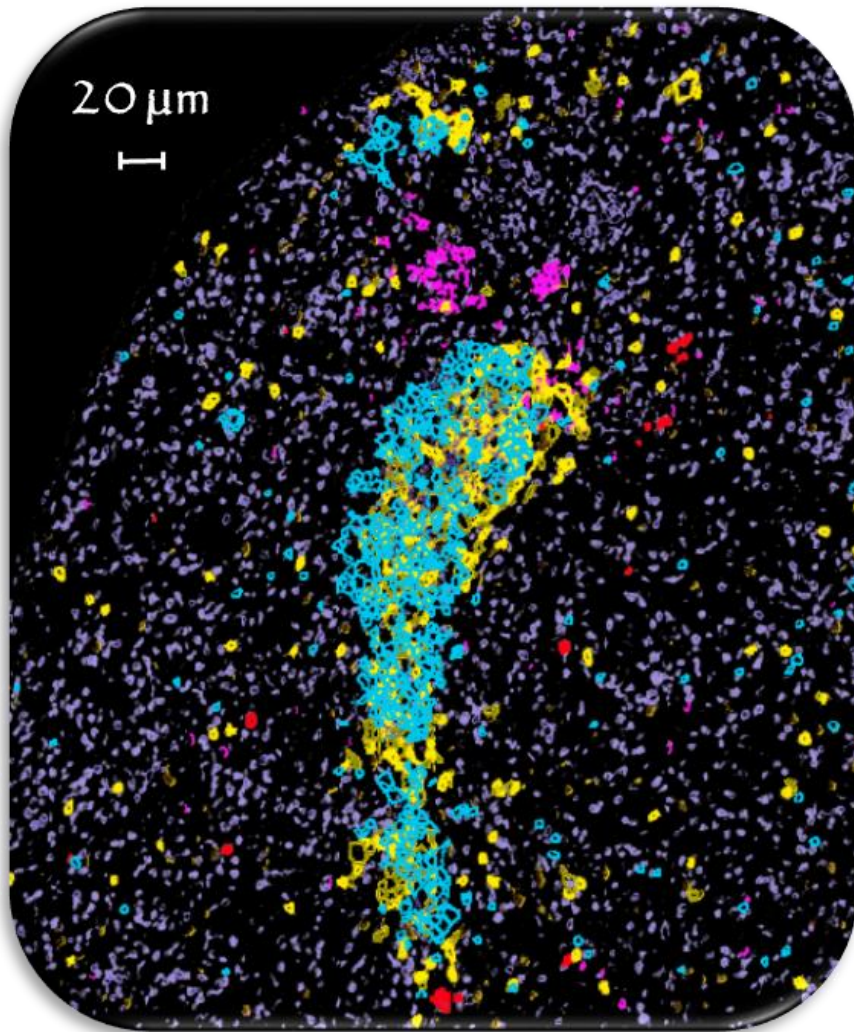


Figura 29. Imagen microscópica digital segmentada o máscaras mostrando un nódulo linfoide compuesto principalmente de linfocitos T donde se encuentran conjuntamente células $CD4^+$ (amarillo), $CD7^+$ (rosa), $CD8^+$ (azul) y linfocitos B $CD20^+$ (rojo). Los Nb en azul pálido.

La principal distribución encontrada de los linfocitos B ($CD20^+$) fue formando nódulos de diferentes tamaños. Estos nódulos se encontraron dispuestos entre el estroma, cerca de nidos de Nb (Figura 31) o entre los Nb (Figura 32).

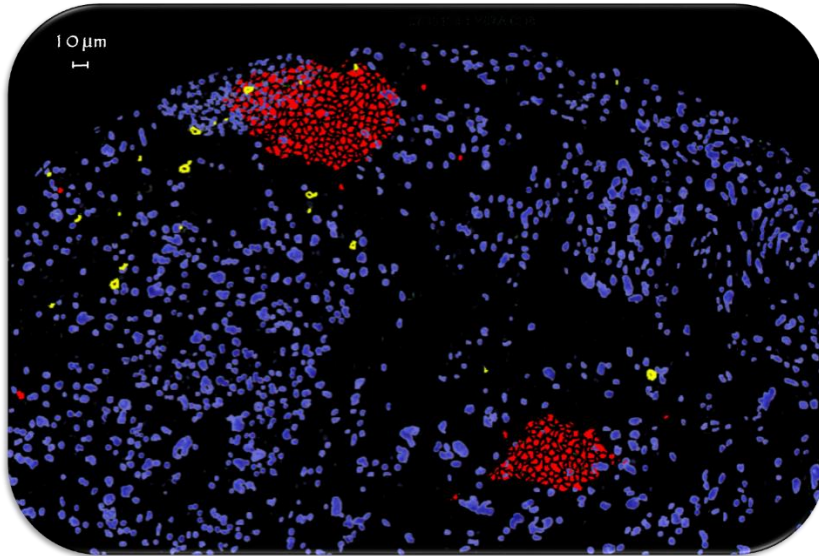


Figura 30. Imagen microscópica digital segmentada o máscaras de un cilindro tumoral que muestra un nódulo linfoide compuesto principalmente de linfocitos B ($CD20^+$, en rojo) junto con células $CD8^+$ (amarillo). Fue negativo para $CD4$ y $CD7$. Los Nb se marcaron en azul pálido.

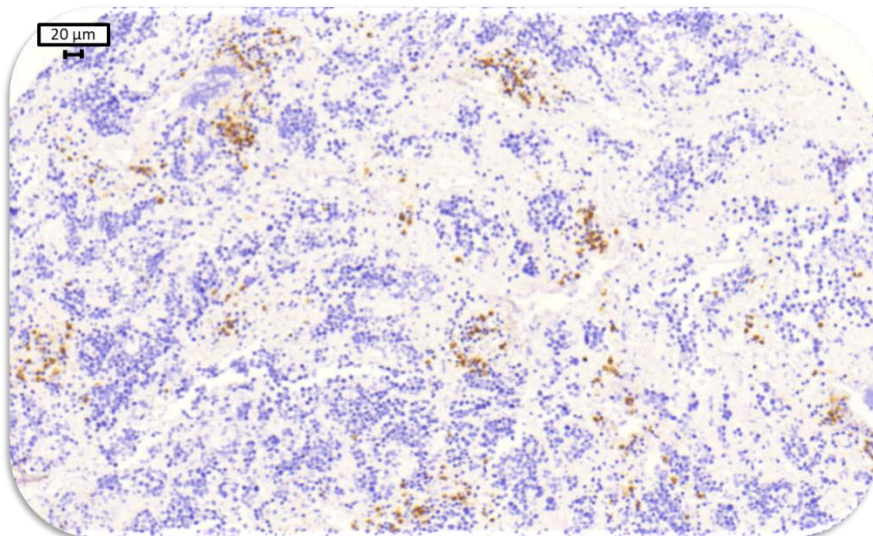


Figura 31. Imagen microscópica digital de nódulos de células $CD20^+$ dispuestos por el estroma y rodeando los nidos de Nb.

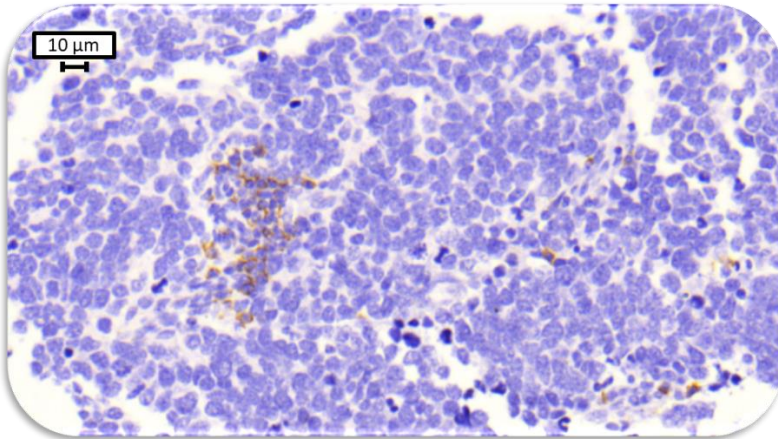


Figura 32. Imagen microscópica digital no segmentada de nódulos de células CD20⁺ dispuesto entre los nidos de Nb.

Cuando el tamaño de los nódulos era grande, los linfocitos solían verse acompañados por células dendríticas CD11c⁺ y TAM CD163⁺ (Figura 30, Figura 29 y Figura 33), además de TAM CD68⁺.

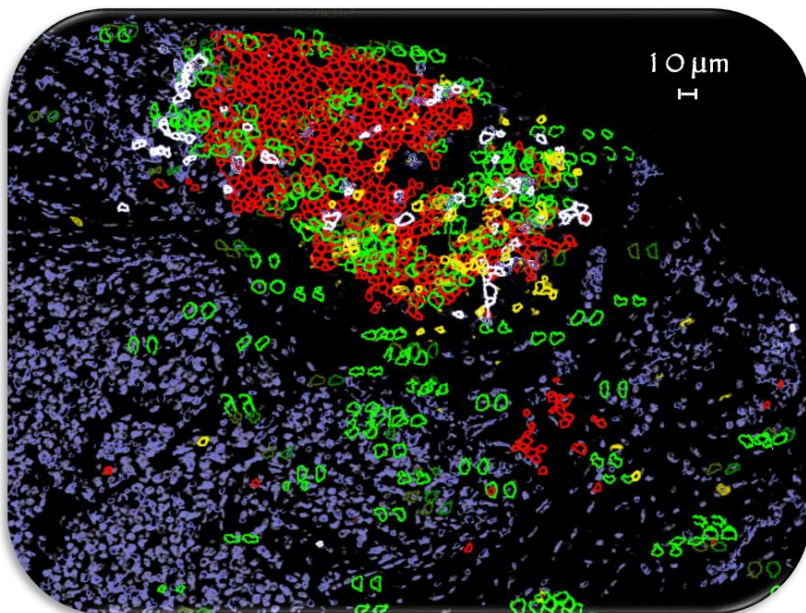


Figura 33. Imagen microscópica digital segmentada o máscaras de un TLO predominantemente compuesto de linfocitos B (CD20⁺, rojo). Se presentan TAM (CD163⁺, verde), DC (CD11c⁺, blanco) y linfocitos T (CD8⁺, amarillo)

La presencia de células $CD11b^+$ también fue un hallazgo común en los centros germinales de las formaciones nodulares (**Figura 34**).

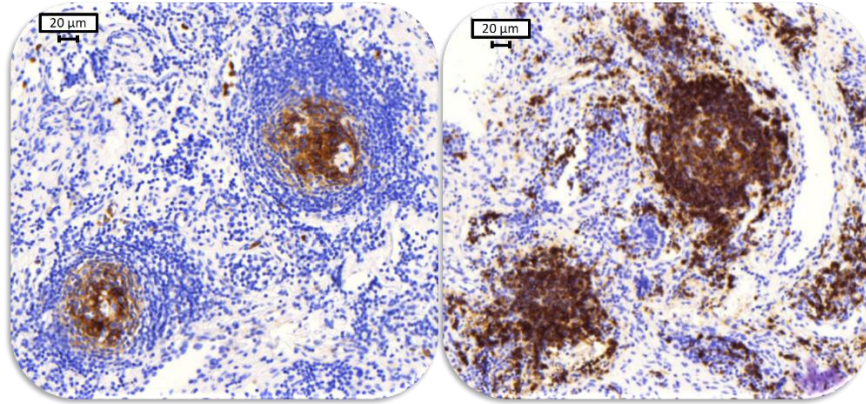


Figura 34. Imagen microscópica digital no segmentada donde vemos $CD11b^+$ (imagen izquierda) y $CD20^+$ (imagen derecha) formando parte de los centros germinales.

Estas estructuras nodulares deben conllevar una amplificación del número de contactos entre los linfocitos y las células presentadoras de antígeno (células $CD11c^+$, $CD68^+$ o $CD163^+$). La siguiente figura muestra con detalle estos contactos (**Figura 35**).

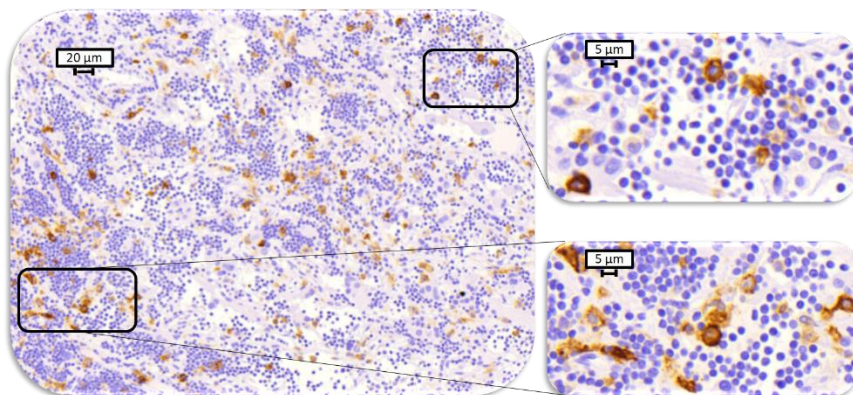


Figura 35. Imágenes microscópicas no segmentadas, destacando las DC $CD11c^+$ en contacto con los linfocitos T y B.

IV.2.3 Nichos perivasculares-perinidos

Además de las estructuras nodulares, fue común encontrar nichos cercanos a estructuras vasculares de células inmunes, especialmente células presentadoras de antígeno, aunque también linfocitos T (mayoritariamente $CD4^+$, pero alguno también $CD8^+$) y algunos linfocitos B $CD20^+$. Algunos ejemplos pueden verse en las siguientes figuras: $CD4^+$ (**Figura 36**) o $CD8^+$ (**Figura 37**).

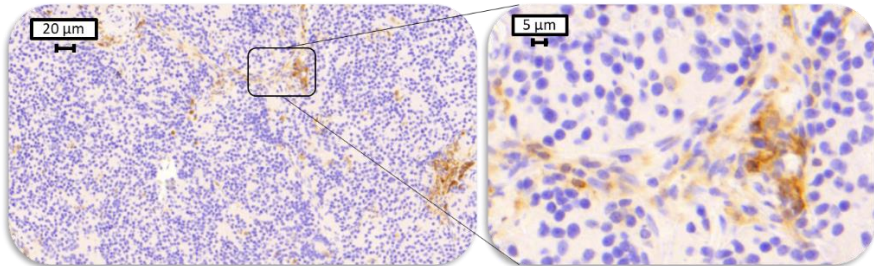


Figura 36. Imagen microscópica digital no segmentada de un TNB con nichos perivasculares de linfocitos T.

Un gran número de las estructuras se localizaron alrededor de los nidos tumorales con células inmunes dispuestas a modo de vainas (**Figura 36** y **Figura 38**).

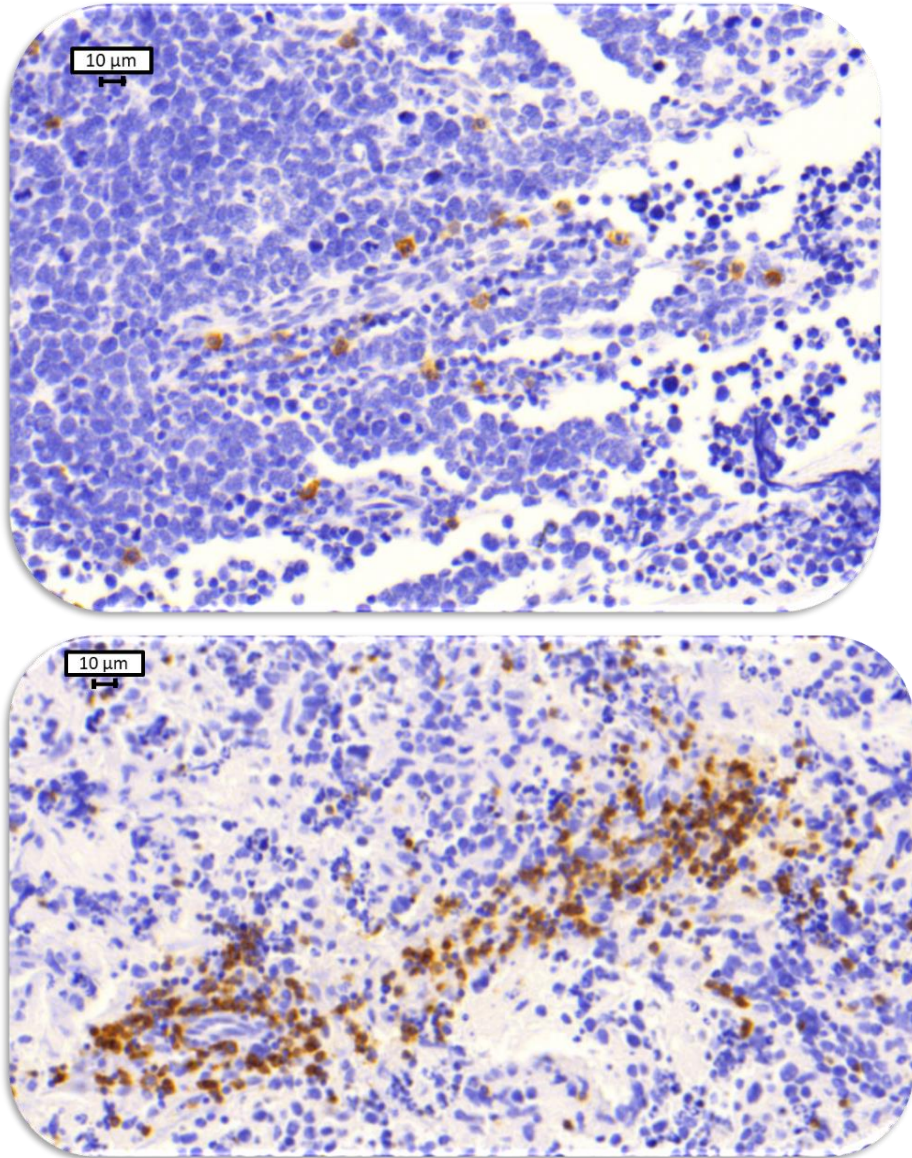


Figura 37. Imagen microscópica digital no segmentada de un TNB con nicho perivascular de linfocitos CD8⁺.

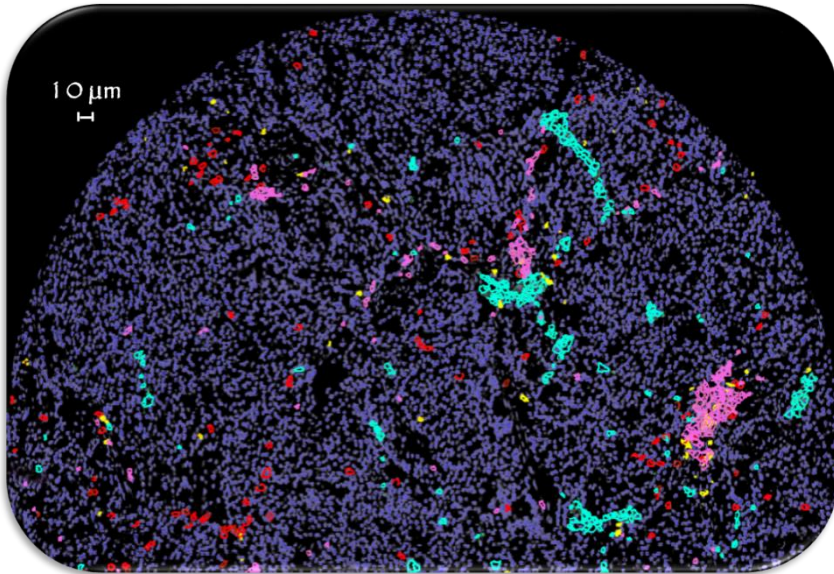


Figura 38. Imagen microscópica digital segmentada de nidos de Nb rodeados por células vasculares e inmunes: CD4⁺ (rosa), CD8⁺ (amarillo), CD11c⁺ (azul claro) y CD163⁺ (rojo).

La figura anterior (**Figura 38**) permite ver la disposición de varias células con distintos CD⁺ a la vez, al estar formada por un montaje de colocación de los diferentes cortes de tejido. Para apreciar la disposición concreta de las células positivas de un CD respecto a las células tumorales y estructuras tisulares se recurrió a la imagen de un único corte. Las siguientes figuras (**Figura 39 y Figura 40**) muestran distintas áreas del corte para detectar las células CD11c⁺ y CD45⁺, respectivamente, de la imagen anterior. De esta manera, puede observarse la disposición de estas células alrededor de los nidos tumorales.

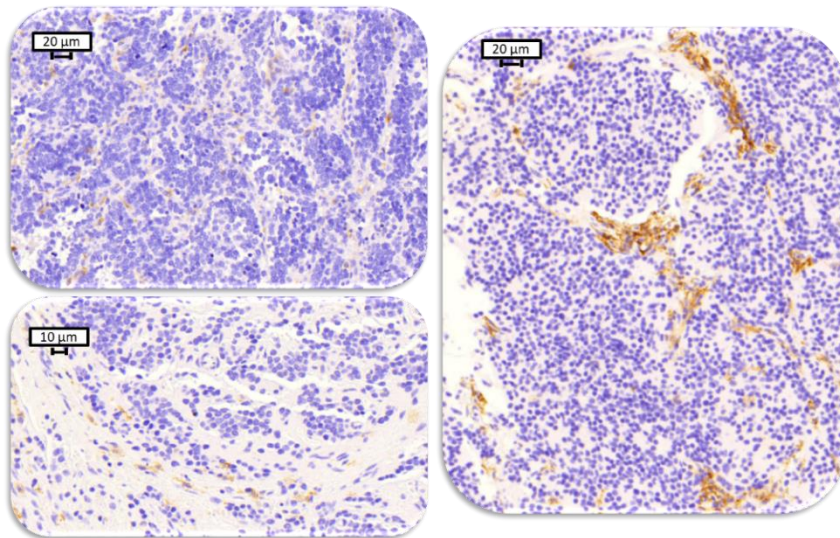


Figura 39. DC CD11c⁺ dispuestas en nichos perivasculares.

Otros ejemplos de esta distribución común en nichos perivasculares de las células del sistema inmune quedan ejemplarizadas en las siguientes figuras (**Figura 41 a Figura 44**).

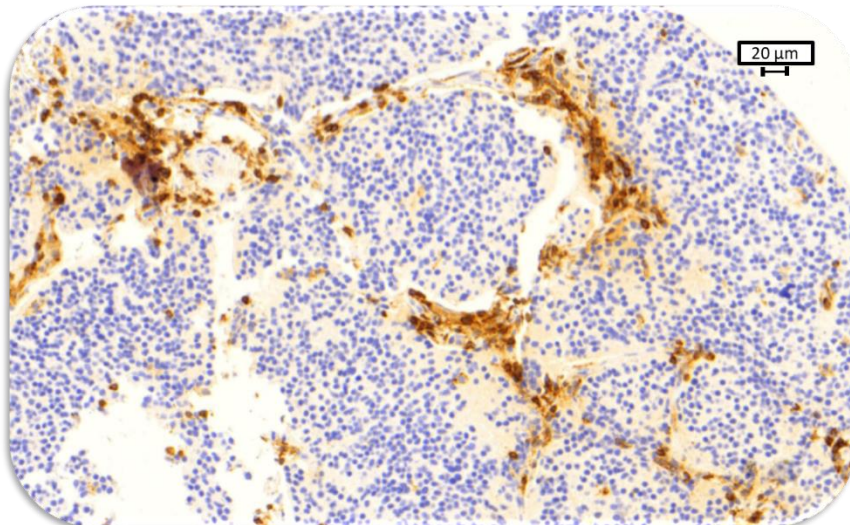


Figura 40. Imagen microscópica digital no segmentada de leucocitos (CD45⁺) dispuestos rodeando nidos de Nb formando nichos perivasculares.

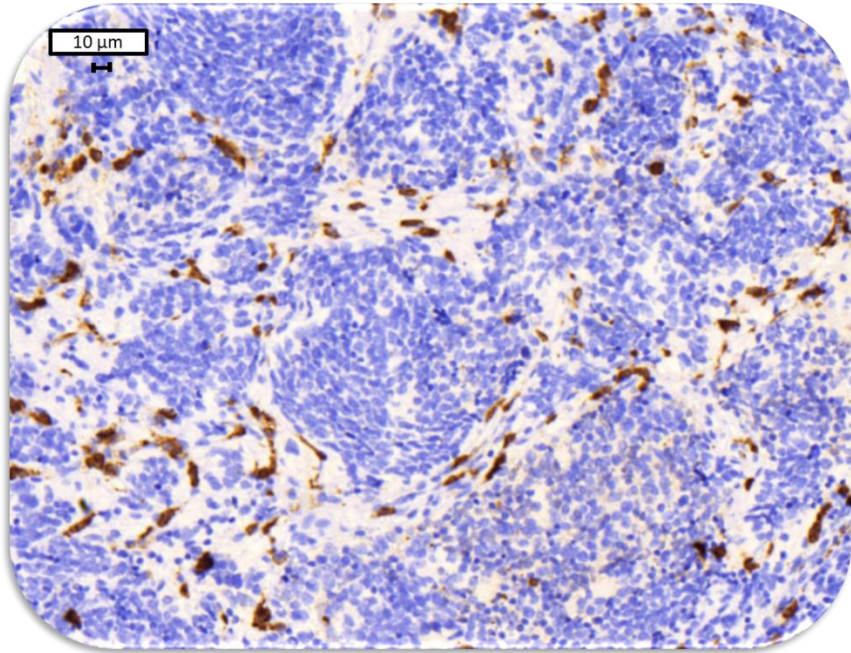


Figura 41. Imagen microscópica digital no segmentada de TAM CD163⁺ dispuestos en nichos perivascuales en la periferia de nidos de Nb.

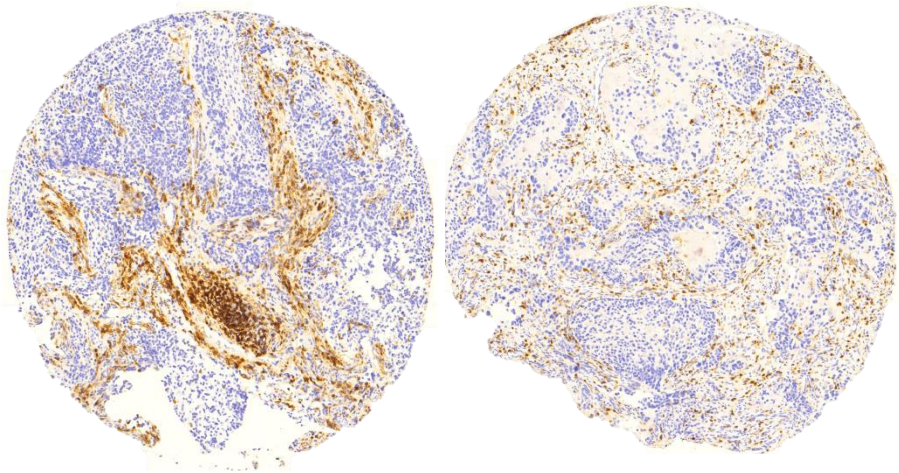


Figura 42. Imagen microscópica digital no segmentada de leucocitos CD45⁺ rodeando nichos de Nb de localización perivascular.

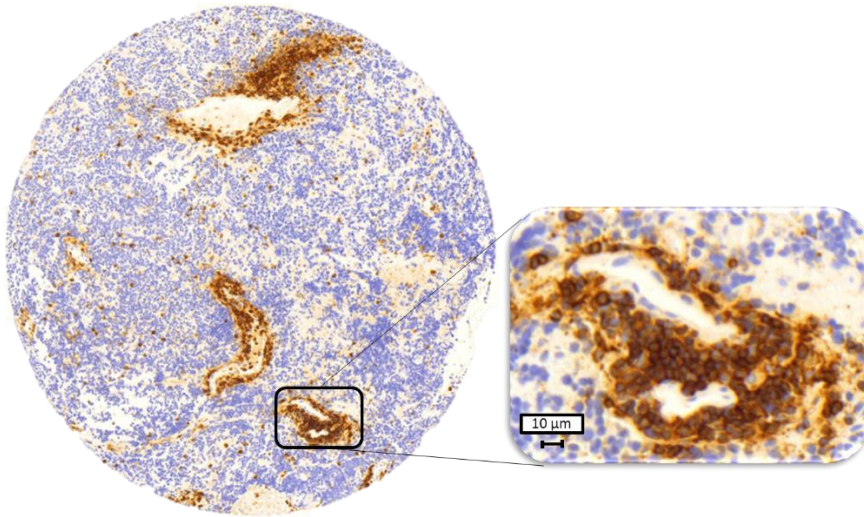


Figura 43. Imagen microscópica digital no segmentada de NB con nichos perivascuales de CD45⁺.

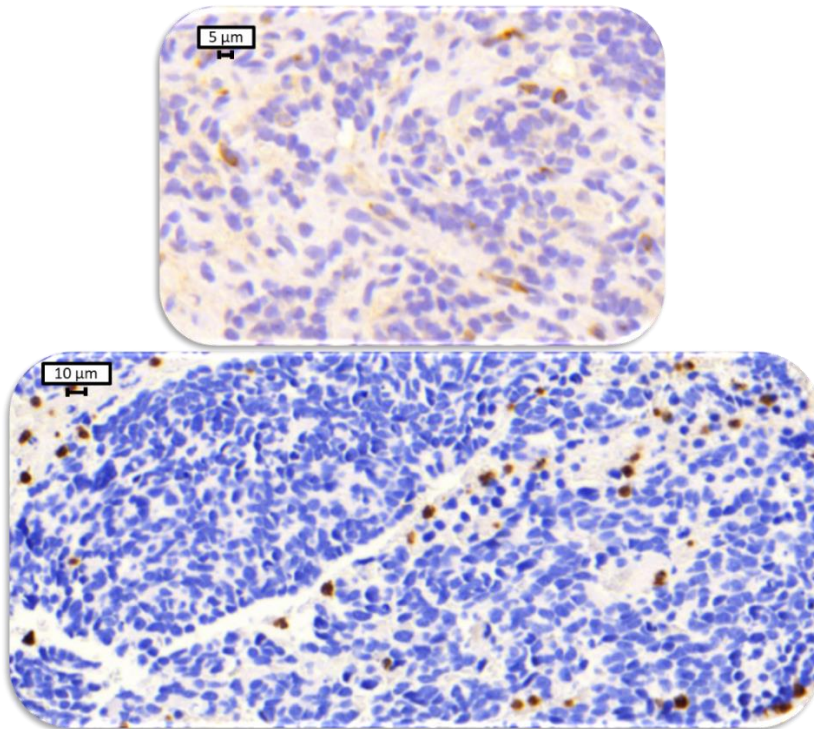


Figura 44. Imagen microscópica digital no segmentada de células CD11b⁺ rodeando los nidos de Nb.

IV.2.4 Distribuciones específicas estromales

Por último, aunque no fue lo común, pudimos encontrar linfocitos en áreas ricas de estroma (**Figura 45 y Figura 46**).

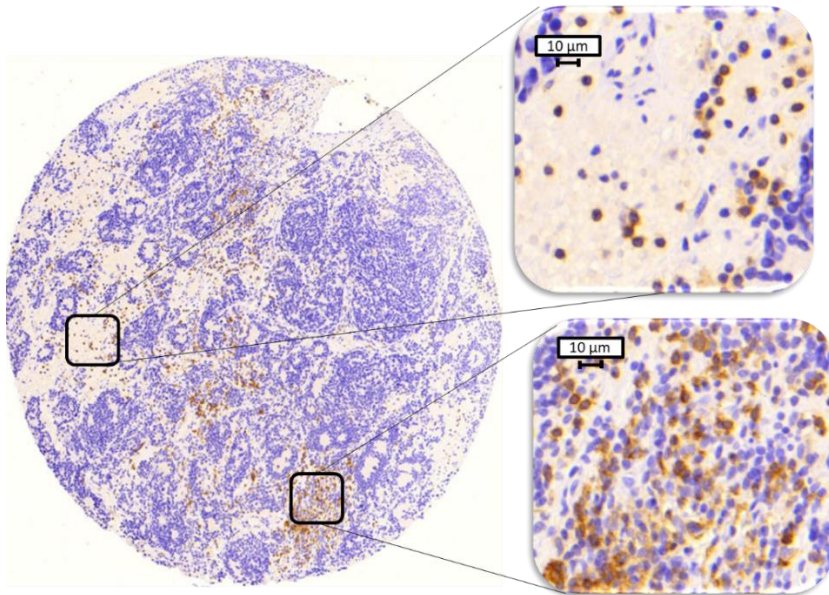


Figura 45. Ejemplo de TNB con linfocitos CD4⁺ estromales y en nódulos.

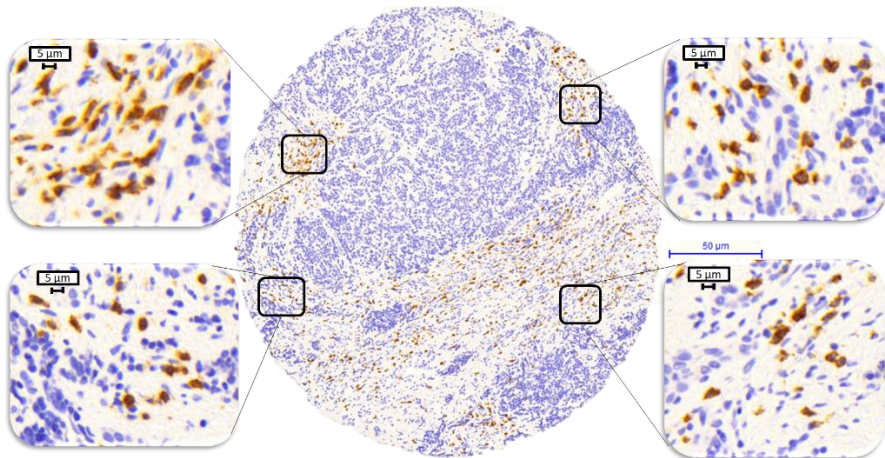


Figura 46. Ejemplo de células CD8⁺ en áreas ricas en estroma.

También, se observó distribución, en el espacio rico estromal, de elementos CD68⁺ y CD163⁺, coexistiendo con una mayor presencia de elementos CD4⁺ y CD11c⁺.

IV.2.5 Distribución difusa

Tanto las células CD11b⁺ (**Figura 47**), como los macrófagos se encontraron distribuidos, en la inmensa mayoría de los casos, de manera dispersa mezcladas entre los Nb.

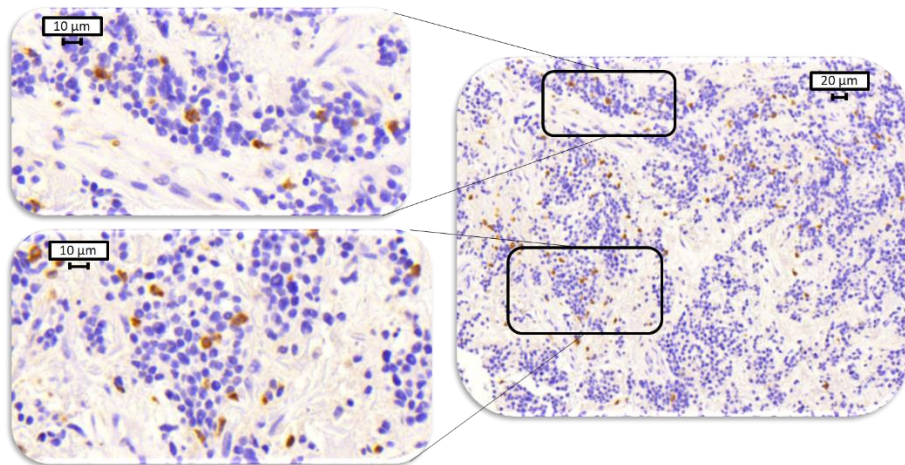


Figura 47. Imágenes microscópicas digitales de TNB con células CD11b⁺ distribuidas de manera dispersa entre los Nb.

IV.2.6 Patrón específico

Se pudo observar en algunos tejidos tumorales una distribución específica de los elementos CD163⁺, caracterizada por un bajo número de elementos CD163⁺ (de uno a pocos elementos) próximos a los nidos tumorales. La presencia de linfocitos, células dendríticas o supresoras mieloides en estas zonas fue prácticamente negativa (**Figura 48**).

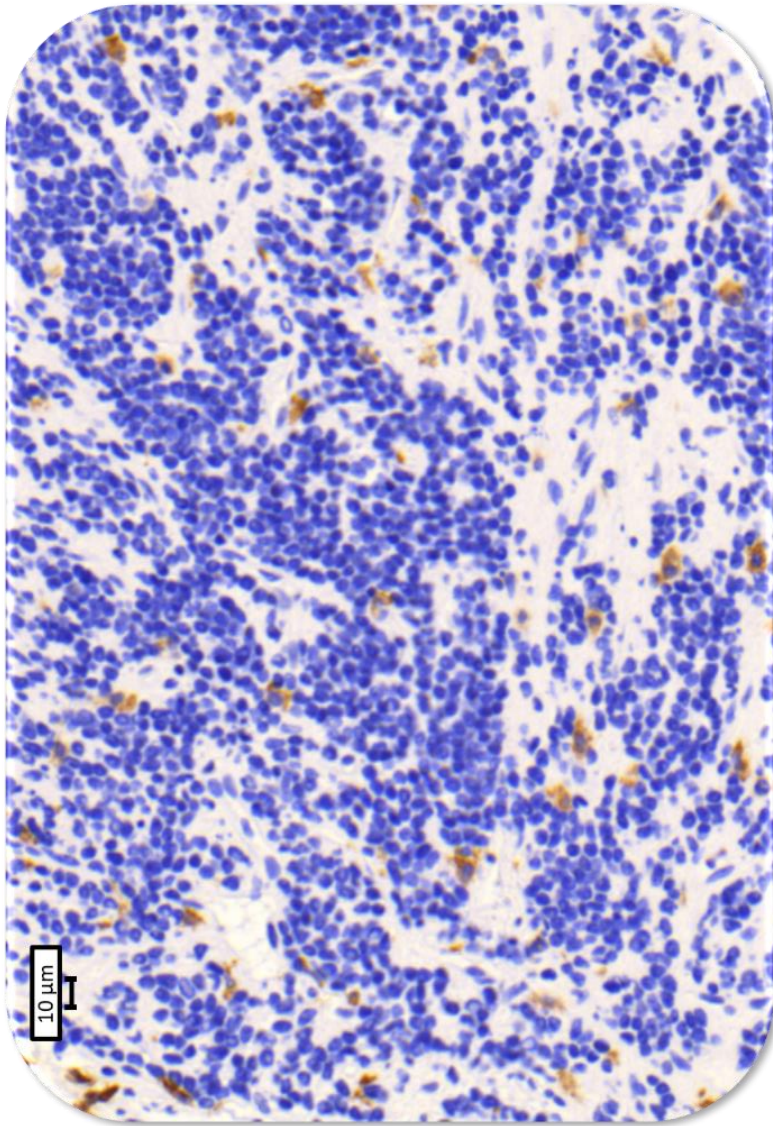


Figura 48. Imagen microscópica digital no segmentada de un TNB con distribución de elementos CD163⁺ en patrón específico.

IV.3 Comparación entre análisis manual y digital

Se analizó en profundidad la correlación entre las variables objetivas (principalmente, la objetiva rango (R)) con la variable subjetiva (S). Esta correlación fue magnífica para todos los marcadores. Esto se pudo apreciar estadísticamente (con $p\text{-valor} < 1 \cdot 10^{-40}$ en todos los marcadores, excepto para CD11b, que tuvo un $p\text{-valor} = 1 \cdot 10^{-24}$), y mediante los porcentajes de sensibilidad y especificidad alcanzados por el método subjetivo, mostrados en la siguiente tabla (**Tabla 23**):

Tabla 23. Número de casos y porcentajes de sensibilidad y especificidad del método subjetivo, en base al método objetivo rango, para cada CD.

	CD4	CD7	CD8	CD20	CD11b	CD11c	CD45	CD68	CD163
VP	107	197	286	240	158	258	395	318	360
VN	284	156	110	151	177	93	20	87	54
FP	0	0	0	2	2	0	0	0	0
FN	23	42	18	4	31	11	0	0	0
S	82,3	82,4	94,1	98,4	83,6	95,9	100,0	100,0	100,0
E	100,0	100,0	100,0	98,7	98,9	100,0	100,0	100,0	100,0

Abreviaturas en pág. 13.

Con el fin de explicar más concretamente la procedencia de los FN y FP para el método subjetivo de los diferentes marcadores, se presenta a continuación la tabla comparativa entre el número de células de las diferentes categorías para el método objetivo rango y el H Score subjetivo (**Tabla 24**):

Tabla 24. Comparación del número de casos entre las categorías de los métodos objetivo rango frente a subjetivo.

R	S				Total	
	0	1	2	3		
CD4	0 (0 a 8)	284	30	0	0	314
	1 (9 a 25)	23	36	2	0	61
	2 (>26)	0	18	21	8	47
TOTAL		307	84	23	8	422
CD7	0 (0 a 18)	156	33	0	0	189
	1 (19 a 47)	31	41	0	0	72
	2 (>48)	11	77	46	11	145
TOTAL		198	151	46	11	406
CD8	0 (0 a 18)	110	92	2	0	204
	1 (19 a 50)	17	66	12	0	95
	2 (>51)	1	27	58	29	115
TOTAL		128	185	72	29	414
CD20	0 (0 a 9)	151	68	0	0	219
	1 (10 a 40)	4	51	17	0	72
	2 (>41)	0	25	43	38	106
TOTAL		155	144	60	38	397
CD11b	0 (0 a 10)	177	56	11	0	244
	1 (11 a 29)	23	30	7	1	61
	2 (>30)	8	35	21	9	73
TOTAL		208	121	39	10	378
CD11c	0 (0 a 12)	93	77	0	0	170
	1 (13 a 42)	10	56	10	0	76
	2 (>43)	1	38	56	21	116
TOTAL		104	171	66	21	362
CD45	0 (0 a 98)	20	102	9	0	131
	1 (99 a 360)	0	53	52	2	107
	2 (>361)	0	13	58	106	177
TOTAL		20	168	119	108	415
CD68	0 (0 a 363)	87	157	45	0	289
	1 (364 a 595)	0	8	45	0	53
	2 (>596)	0	5	34	24	63
TOTAL		87	170	124	24	405
CD163	0 (0 a 236)	54	94	50	0	198
	1 (237 a 440)	0	30	47	5	82
	2 (>441)	0	15	50	69	134
TOTAL		54	139	147	74	414

La presencia de FN para el método subjetivo en los diferentes marcadores se explica por alguna de las siguientes situaciones:

a) Casos con un bajo número de células/elementos positivos, que pueden escaparse en el conteo rutinario al microscopio óptico en las muestras con un gran número de células negativas. Este es el caso de:

- a. CD4: Todos los FN (N=23) con 9 a 15 elementos CD4⁺.
- b. CD8: N=15 FN de R=1 y S=0 que tuvieron de 19 a 31 elementos CD8⁺.
- c. CD20: todos los FN (N=4) con 12 a 20 elementos CD20⁺.
- d. CD11b: N=14 FN de R=1 y S=0 con 11 a 29 elementos CD11b⁺; y N=1 FN de R=2 y S=0 con 34 elementos CD11b⁺.
- e. CD11c: N=4 FN de R=1 y S=0 con 13 a 15 elementos; y N=4 FN de R=1 y S=0 de 20 a 24 elementos CD11c⁺.

Este resultado también se dio para los CD que fueron recodificados y que, tras esta recodificación, el número de elementos positivos, no pudo corresponder con el análisis subjetivo. Así encontramos que sin aplicar la recodificación existieron:

- f. CD7: N= 28 FN de 4 a 9 elementos CD7⁺ de R=1 y S=0, y todos los FN (N=11) de R=2 y el S=0 que tuvieron de 10 a 14 elementos CD7⁺.
- g. CD11b: N=9 FN de R=1 y S=0 con 3 a 5 elementos CD11b⁺; y N=5 FN de R=2 y S=0, de 7 a 20 elementos CD11b⁺.

b) Casos con contratinción H muy intensa y tinción DAB que no contrasta lo suficiente (débil en comparación con H) como para apreciarse fácilmente de manera rutinaria al microscopio óptico.

- a. CD7: N=3 FN de 19 a 32 elementos CD7⁺.

c) Casos con pigmento inespecífico, que puede alterar el conteo sobre todo del software de análisis.

- a. CD8: N=2 FN de R=1 y S=0 con 38 y 45 elementos CD8⁺.
 - b. CD11b: N=2 FN de R=2 y S=0 con 32 y 35 elementos CD11b⁺.
 - c. CD11c: N=2 FN de R=1 y S=0 con 38 y 40 elementos CD11c⁺.
- d) Casos con muestra tumoral en la TMA muy escasa que provoca que el cálculo del número de elementos positivos por unidad de área incremente mucho frente al número de elementos que podrían cuantificarse subjetivamente.
- a. CD8: N=1 FN de R=2 y S=0 con 60 elementos CD8⁺.
 - b. CD11c: N=1 FN de R=2 y S=0 con 43 elementos CD11c⁺.

Si atendemos a los resultados mostrados en la **Tabla 23** se puede notar la presencia de 2 FP para el conteo subjetivo en los marcadores CD20⁺ y CD11b⁺, es decir, S=1 y R=0 (en los que el conteo del análisis objetivo continuo da un valor de 0 elementos positivos). La causa de estos resultados fue el bajo contraste entre la H y la DAB, capaz de provocar errores en el conteo automático por parte del software de análisis.

Por otro lado, aunque pudiera parecer que existieron numerosos FP para el método subjetivo (R=0 y S=+), se puede apreciar en la **Tabla 24**, que esto no fue así, ya que todos los casos que fueron R=0 y positivos subjetivamente presentaron algún elemento positivo en la variable objetiva continua.

Por último, otro aspecto que vale la pena comentar para destacar la buena correlación entre ambos análisis es el bajo número de casos de falsa alta infiltración, que corresponderían a casos rango=1 y subjetivo=3, que tan solo se dio en casos que han sido recodificados.

Para validar el método objetivo en base al método subjetivo, además de los tests estadísticos realizados, se observó una gran concordancia en los resultados obtenidos por ambos métodos. De manera que, entre estos dos métodos de análisis podemos apreciar:

- a) Sensibilidad (detección correcta de los casos verdaderamente positivos). Las discrepancias máximas observadas entre las cuantificaciones realizadas por el software de análisis y el patólogo fueron debidas al análisis de algunas muestras tumorales con poca área, lo que provocó que la medida final objetiva (por unidad de área) fuera discrepante a la medida final subjetiva. Aun así, pudimos ver como estos porcentajes de sensibilidad/especificidad fueron muy elevados, ya que el número de casos que fueron discrepantes por encima de los 20 elementos positivos detectados fue ínfimo (un total de 15 imágenes dentro de las más de 8.000 imágenes analizadas subjetivamente), hecho que muestra el gran nivel de concordancia.
- b) Especificidad (detección correcta de los casos verdaderamente negativos). Tanto las variables objetivas (continuas) como subjetivas cuantificaron un mayor porcentaje de casos positivos en la cohorte $\bar{a}3$ que en la cohorte $\bar{a}2$ en todos los marcadores excepto $CD11c^+$ y $CD45^+$.
- c) Correlación en la positividad (entre los casos de alta y baja infiltración de ambos métodos). Solo 8 de entre todos los casos y todos los CD fueron rango=1 y subjetivo=3. Cinco de ellos fueron para el marcador $CD163$, con multitud de prolongaciones que

pudieron dificultar ambos análisis. El resto de casos subjetivo=3 fueron rango=2, indicando una concordancia real.

IV.4 Estadísticos descriptivos

Tras la descripción histológica del infiltrado inmune, objeto de este estudio, a continuación, se describen las variables de los marcadores: objetiva continua, objetivo rango (categórica) y subjetiva (categórica).

Las siguientes tablas muestran el porcentaje de casos positivos en cada cohorte (**Tabla 25**) y los estadísticos descriptivos de cada cohorte (**Tabla 26**) en los diferentes marcadores. La media de las células CD⁺ presentes en las células tumorales fue de 5720 y la mediana de 5369.

Atendiendo a la cohorte total, en estas tablas pudimos apreciar que el marcador CD4 fue el más negativo en todas sus variables (objetivos continuo y rango, y subjetivo), seguido del marcador CD11b. Por otro lado, el marcador CD45 fue el más positivo, tanto en porcentaje de casos (**Tabla 25**) como en estadísticos descriptivos, como la media (**Tabla 26**).

El marcador CD7 fue el que mayor media de células por unidad de área y desviación estándar presentó de la familia de los linfocitos T y el que tuvo los cuartiles más elevados del conjunto de linfocitos, en las diferentes cohortes (**Tabla 26**).

Tabla 25. Porcentaje de casos positivos de cada marcador inmune en las diferentes cohortes.

OBJETIVO CONTINUO	TOTAL	ā1	ā2	ā3	T1	T2	T3
CD4	64	61	67	81	53	78	71
CD7	80	74	96	83	71	79	93
CD8	89	89	89	84	87	95	87
CD20	77	81	67	72	77	89	70
CD11b	74	81	50	91	79	84	60
CD11c	86	86	85	96	84	89	86
CD45	98	97	98	100	99	94	98
CD68	94	91	99	100	87	98	99
CD163	93	89	100	100	87	94	100
OBJETIVO RANGO	TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
CD4	25	22	26	48	15	40	31
CD7	48	40	63	60	34	49	64
CD8	49	47	55	54	45	53	53
CD20	42	43	40	36	40	49	41
CD11b	37	41	25	41	44	36	28
CD11c	50	45	60	62	39	60	58
CD45	65	64	68	60	65	61	66
CD68	27	20	35	64	10	35	43
CD163	46	33	78	62	25	47	76
SUBJETIVO	TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
CD4	27	20	30	55	14	36	35
CD7	51	33	74	63	29	33	73
CD8	69	59	82	80	50	85	95
CD20	61	66	54	59	62	73	57
CD11b	45	56	23	72	62	38	34
CD11c	71	65	78	85	66	64	78
CD45	95	97	91	100	96	98	93
CD68	79	61	99	100	54	73	99
CD163	87	78	99	97	75	84	98

Atendiendo a las cohortes anuales, se pudo apreciar una mayor infiltración en la cohorte ā3 (con tumores con factores desfavorables para el pronóstico) de los marcadores CD4, CD11b, CD11c, CD68 y CD163, tanto en porcentaje de casos positivos, de las variables objetiva continua y subjetiva, como en estadísticos descriptivos (media y cuartiles). Los marcadores CD7 y CD8 también tuvieron mayor

infiltración en la cohorte $\bar{a}3$ atendiendo a los descriptivos de sus variables objetivas continuas (**Tabla 26**), aunque no se reflejara en porcentaje de casos positivos (**Tabla 25**), que fue en el sentido $\bar{a}2 > \bar{a}3$, coincidentes con los subjetivos, indicando de nuevo, no solo concordancia, sino también, especificidad entre ambos análisis, capaz de discernir los verdaderos negativos. Tan solo los marcadores CD20 y CD45 no presentaron mayor infiltración en la cohorte $\bar{a}3$. Si nos fijamos en las variables objetivas continuas del marcador CD20, vemos que se obtuvo mayor infiltración en general en la cohorte $\bar{a}2$, atendiendo a los cuartiles, pero con algunos casos muy positivos en la cohorte $\bar{a}1$ (a partir del cuartil 3). Un comportamiento muy similar se obtuvo para CD45. Esto fue debido a la tinción inespecífica que no fue contrarrestada en su totalidad por la selección única de los elementos de intensidad alta o 3+ en esta cohorte (**Tabla 17**, pág. 104). Esto no se reflejó en los porcentajes de casos positivos, ya que no nos aportan información sobre la distribución ni dispersión estadística, con lo que tienen menor importancia que los estadísticos descriptivos. Así, por ejemplo, un marcador que tuviera una única célula en todos los casos tendría un 100% de positividad, pero no tendría una infiltración relevante. Sin embargo, sí nos pueden indicar la concordancia entre los análisis objetivo y subjetivo y la sensibilidad y especificidad de ambos métodos. Así pues, todos los marcadores, excepto CD11c y CD45, tuvieron el mismo orden de porcentaje entre sus cohortes tanto objetiva como subjetiva, indicando el alto grado de concordancia y sensibilidad/especificidad.

Tabla 26. Estadísticos descriptivos de los diferentes CD en las diferentes cohortes.

CD	Estadísticos (Nº célt/mm ²)	COHORTE TOTAL	C. Diag. Anual.			C. Proc. Mat.		
			ā1	ā2	ā3	T1	T2	T3
CD4	Media	34	31	29	71	12	66	37
	D.T	96	87	69	182	37	132	106
	1	2	2	2	5	2	3	2
	Cuartiles	2	5	5	4	10	4	10
	3	15	14	15	50	10	41	17
CD7	Media	135	117	151	208	19	20	162
	D.T	421	452	366	377	71	56	365
	1	10	10	9	14	2	2	10
	Cuartiles	2	24	19	46	50	3	5
	3	82	58	117	126	10	12	120
CD8	Media	67	68	63	83	60	86	65
	D.T	178	199	114	141	214	173	117
	1	7	6	6	13	5	7	8
	Cuartiles	2	21	20	26	38	20	23
	3	58	55	61	84	50	76	63
CD20	Media	149	169	115	66	148	223	100
	D.T	619	715	340	109	586	945	293
	1	3	3	3	4	3	4	3
	Cuartiles	2	13	11	23	11	12	23
	3	60	53	81	71	51	54	72
CD11b	Media	36	31	43	67	34	25	25
	D.T	85	52	133	164	58	42	90
	1	4	5	4	5	5	3	2
	Cuartiles	2	11	11	9	10	13	9
	3	32	30	35	44	33	26	15
CD11c	Media	74	58	105	117	38	102	102
	D.T	154	131	189	212	74	200	188
	1	5	5	10	3	4	8	7
	Cuartiles	2	17	14	32	21	10	31
	3	65	51	98	129	32	94	109
CD45	Media	959	995	950	662	415	758	855
	D.T	2800	3185	1945	1041	1137	2484	1743
	1	62	62	71	57	31	31	69
	Cuartiles	2	204	191	255	135	105	79
	3	727	664	884	1072	363	329	836
CD68	Media	337	281	394	654	37	91	431
	D.T	484	474	459	541	63	131	475
	1	59	32	167	236	5	14	171
	Cuartiles	2	184	113	265	529	15	45
	3	423	319	437	1004	44	111	480
CD163	Media	453	444	486	421	68	127	457
	D.T	762	894	409	319	181	189	383
	1	48	24	249	180	5	11	232
	Cuartiles	2	236	119	377	315	15	50
	3	519	455	566	594	54	146	545

Por otro lado, atendiendo a las cohortes temporales, se pudo observar, en aquellos marcadores que fueron recodificados (CD7, CD45, CD68 y CD163), un aumento progresivo en la positividad (media) en las cohortes temporales como sigue: $t_1 < t_2 < t_3$. Observando un aumento drástico en la última cohorte (t_3). Este suceso no ocurrió en el resto de marcadores que no fueron recodificados, a saber: CD4, CD8, CD20 y CD11c. En estos casos, atendiendo a las medias de las variables objetivas continuas, la cohorte t_2 tuvo mayor infiltración que el resto de cohortes temporales. Sin embargo, el valor más alto de los cuartiles, en los marcadores CD8, CD20 y CD11c, se alternó entre las cohortes t_2 y el t_3 . Mientras que, el marcador CD4 tuvo mayor infiltración en la cohorte t_2 para todos los cuartiles. Esto nos indicó la presencia de un grupo de tumores con alta infiltración perteneciente a la cohorte t_2 , dentro de la cohorte \bar{a}_1 , además de un grupo de tumores con alta infiltración en la cohorte \bar{a}_3 , dentro de la cohorte t_3 .

Para describir cada uno de los marcadores con mayor profundidad, las tablas de los anexos (Anexo 2-Anexo 10) muestran la información de las variables objetivas continuas, rango y subjetivas. Atendiendo a estos anexos, observamos un porcentaje de casos positivos similar para la variable objetiva rango y la subjetiva en los marcadores con poca positividad: CD4 y CD7, pero fue distinto en el resto de marcadores que presentaron mayor positividad. Esto se debió a que, por ejemplo, para el marcador CD68, el rango negativo (o baja infiltración) comprendió aquellos casos que tuvieron de 0 a 363 elementos CD68, mientras que el análisis subjetivo daba como tumores positivos aquellos casos en los que se podía identificar, al menos, una

célula CD68. Por otro lado, también pudimos observar que, cuando los rangos de baja infiltración fueron comprendidos entre 0 y 17 células (todos los marcadores excepto CD45, CD68 y CD163), el análisis subjetivo clasificó menos casos de alta infiltración que el análisis objetivo rango. Por lo tanto, el análisis subjetivo fue más restrictivo al asignar casos con alta infiltración.

IV.5 Patrones inmunes morfológicos y cuantitativos (unitarios y combinados)

Los patrones inmunes estudiados se clasificaron en morfológicos, si los parámetros analizados fueron forma y tamaño de las células inmunes, o cuantitativos, si tan sólo se contó el número de células por unidad de área. Estos últimos se analizaron unitaria o individualmente, es decir, cada CD por separado, o en combinaciones de varios CD y/o factores de la INRG. En resumen:

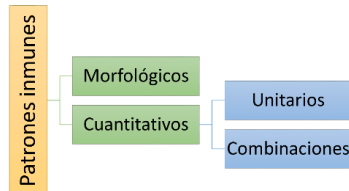


Figura 49. Tipo de patrones inmunes analizados.

Cada uno de estos patrones inmunes se asoció con la información clinicobiológica de los pacientes y sus tumores, en el orden que sigue:

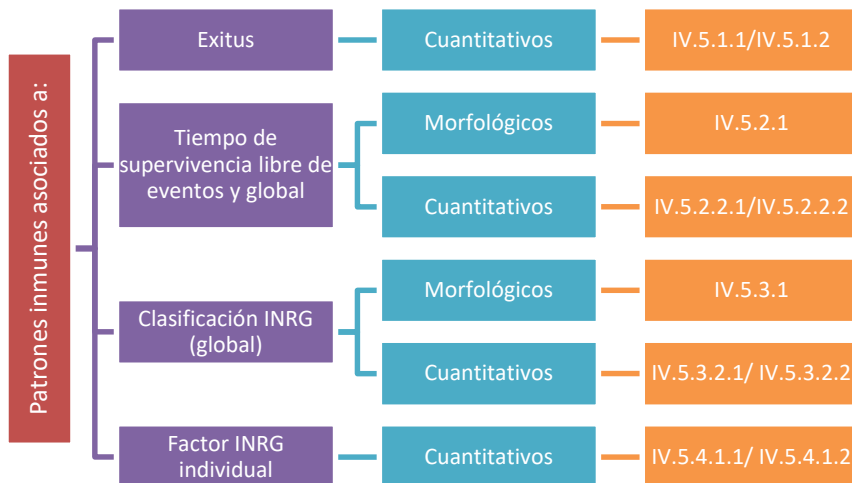


Figura 50. Asociaciones realizadas entre los patrones inmunes y la información clinicobiológica explicadas en cada subpartado de los resultados.

Por otro lado, para interpretar cómo influye cada variable que ha resultado significativa en los modelos de regresión se ha de tener en cuenta que:

1. Las variables explicativas que resultan significativas influyen en la probabilidad de que se dé el evento. El evento fue definido, para las regresiones de supervivencia (regresiones de COX), como recaída o exitus, y para las regresiones logísticas binarias, como la categoría de riesgo y factor clinicobiológico de peor pronóstico para el paciente (Ejemplo: pertenecer a la cohorte de riesgo alto, ser >18 meses, tener MNA, delección del 11q, etc.).
2. El sentido de influencia de las variables explicativas (es decir, si favorecen o no que se dé el evento) viene dado por el valor para el Hazard Ratio (HDR), para las regresiones de supervivencia (COX) o el valor del Odd Ratio (OR), para las regresiones logísticas binarias (además del intervalo de confianza).
3. Los valores de HDR/OR son referidos a una de las categorías de la variable explicativa (categoría de referencia), la cual es indicada en el modelo. De manera que valores de HDR/OR < 1 disminuyen la probabilidad de que ocurra el evento si se pertenece a la categoría de referencia, mientras que, valores HDR/OR >1 aumentan la probabilidad de que ocurra el evento si se pertenece a la categoría de referencia. A modo de ejemplo: si establecemos, para el factor *MYCN*, ser un tumor amplificado como categoría de referencia, esta variable explicativa será expresada como: *MYCN (MNA)*, y un valor para el HDR>1, nos indicará que tener MNA aumenta la probabilidad de evento (exitus o recaída). Pero también nos está indicando que

no tener MNA disminuye la probabilidad de evento, ya que es la categoría inversa a la categoría de referencia.

4. Para variables explicativas con más de 2 categorías, los valores HDR/OR de las categorías de referencia han de ser dados, necesariamente, en comparación con una de las otras categorías de la variable explicativa (la denominaremos categoría de base). En principio, se estableció que aquella categoría de mejor pronóstico sirviera como categoría de base, o en el caso de los marcadores inmunes la categoría con menor infiltración. A modo de ejemplo: para la variable explicativa "Estadio del tumor", se estableció que las categorías de referencia fueran "M" y "Ms", en comparación con la categoría de base "L" (de mejor pronóstico). De manera que un $HDR > 1$ para la categoría de referencia "M" indicaría que pertenecer a esta categoría respecto a la categoría "L" aumenta la probabilidad de que ocurra el evento.
5. Todas las variables continuas resultaron tener distribución no normal, con lo que se aplicaron los test estadísticos no paramétricos correspondientes.

IV.5.1 Patrones inmunes cuantitativos asociados al exitus

IV.5.1.1 Patrones celulares inmunes cuantitativos unitarios

En primer lugar, se estudió qué marcadores inmunes, de manera individual, podían estar relacionados con el riesgo de los pacientes de sufrir exitus. Los marcadores inmunes CD11b, CD68 y CD163 resultaron significativos en sus variables objetivas continuas y rango (tanto

tricotómicas como dicotómicas), además de la variable subjetiva para el CD11b. De manera que, a mayor infiltración de cualquiera de estos marcadores, aumentó el riesgo de sufrir exitus. Por otro lado, el marcador CD11c también resultó significativo para su variable objetiva rango dicotómico y subjetiva de manera que una menor infiltración de este marcador se relacionó con el riesgo de sufrir exitus.

IV.5.1.2 Patrones celulares inmunes cuantitativos combinados

Con esta información obtenida del análisis individual de cada marcador inmune, se procedió a realizar análisis multivariantes en los que podríamos ver si alguna combinación de marcadores inmunes podía estar relacionado con el riesgo de exitus. Tan solo los marcadores CD11c y CD68 resultaron significativos en combinación para las variables rango (tanto di, como tricotómicas). Al combinar ambos marcadores (con sus variables rango dicotómicas) con el resto de factores de la INRG se obtuvo el modelo mostrado en la siguiente tabla (**Tabla 27**):

Tabla 27. Modelo de riesgo de exitus en base a los marcadores inmunes medidos en sus variables rango dicotómicas y los factores de la INRG (Ref: Exitus).

	OR (95% IC)	p-valor	AUC	S/E	N
<i>CD11c (A)</i>	0,261 (0,070-0,968)	0,045			
<i>CD68 (A)</i>	3,690 (0,930-14,642)	0,053			
Dif Tum (Ref:I)		0,056	E:	E:	E:
Dif Tum (pD)	0,263 (0,076-0,911)	0,035	0,819	74,3/ 90,2	131
Dif Tum (En dif)	0,084 (0,007-1,063)	0,056			
Estadio (Ref:L)		<0,001			
Estadio (M)	10,865 (3,71-31,81)	<0,000		V:	
Estadio (Ms)	0,285 (0,030-2,690)	0,273	V:	76,2/ 88,7	V:
Perfil Gen (SCA)	5,453 (1,071-27,76)	0,041	0,897		43
<i>MYCN (MNA)</i>	4,886 (2,729-8,747)	<0,000			

Abreviaturas en pág. 13. S/E para punto de corte de 0,4.

Si bien el marcador CD68 no resultó significativo por debajo de un p-valor de 0,05, si fue suficientemente importante para ser no ser descartado por el modelo. A la vista de los resultados, podemos ver como tumores con una infiltración baja de CD11c⁺ aumenta en 3,8 veces (1/0,261) el riesgo de sufrir exitus de los pacientes respecto a CD11c^{ALTA}, mientras que tener infiltración CD68^{ALTA} (OR>1) aumenta el riesgo de sufrir exitus en 3,69 veces. También observamos como pacientes con tumores I (respecto a pD), estadio M (respecto a L), con SCA (frente a NCA) y MNA (frente a MNNA) tienen un riesgo de 3,8; 10,8; 5,4 y 4,8 veces mayor de sufrir exitus, respectivamente, de manera que, al igual que en la clasificación de la INRG, pacientes con estos factores (estadio M, Nb indiferenciados, con SCAs o MNA) tienen un pronóstico más desfavorable.

A pesar de haber obtenido un p-valor de 0,053, para el marcador CD68 en el modelo anterior, éste se combinó junto a CD11c de manera que se definieron N=37 casos con un patrón combinado CD11c^{BAJA}CD68^{ALTA} frente al resto (N=581) y se obtuvo el siguiente modelo que consolidó la importancia de CD68 para la supervivencia:

Tabla 28. Modelo de riesgo de exitus en base a la combinación CD11c^{BAJA}&CD68^{ALTA} y los factores de la INRG (Ref. Exitus).

	OR (95% IC)	p-valor	AUC	S/E	N
<i>CD11c^{BAJA}CD68^{ALTA}</i>	15,617 (3,00-81,29)	0,001			
<i>Edad 18 (>18)</i>	4,580 (2,194-9,562)	<0,000		E:	
Estadio (Ref:L)		<0,000	E:	86,0/	E:
Estadio (M)	6,843 (3,235-14,48)	<0,000	0,907	84,1	210
Estadio (Ms)	2,088 (0,503-8,66)	0,310			
Dif Tum (Ref:I)		0,021	V:	V:	V:
Dif Tum (pD)	0,307 (0,126-0,746)	0,009	0,822	79,3/	70
Dif Tum (En dif)	0,181 (0,032-1,009)	0,051		76,6	
<i>MYCN (MNA)</i>	3,716 (1,728-7,991)	0,001			

Abreviaturas en pág. 13. S/E para punto de corte de p=0,3.

La **Tabla 28** muestra la importancia de ambos marcadores para la supervivencia de los pacientes en un modelo con gran capacidad predictiva (valores de AUC por encima de 0,9 para la muestra de entrenamiento y de 0,8 para la de validación). Así pues, presentar una infiltración tipo CD11c^{BAJA}CD68^{ALTA}, aumentó en 15 veces la probabilidad de exitus, una probabilidad más de 4 veces mayor que ser MNA, que la aumentó en 3,7 veces. De nuevo tener estadio M y ser un NB I aumentó el riesgo de exitus en 6,8 y 3,2 (1/0,307) veces, respectivamente. La **Figura 56** de la pág. 165 ilustra este patrón de infiltración en un paciente HR.

Por último, se obtuvo un modelo muy similar pero únicamente con la variable rango de tres categorías para el marcador CD11c, descartando el CD68 (resultado no mostrado en la tabla).

IV.5.2 Patrones inmunes asociados al tiempo de supervivencia libre de eventos y global

IV.5.2.1 Patrones inmunes morfológicos de las células CD163⁺

La morfología de los elementos CD163⁺ descrita en la descripción histológica (apartado IV.2, pág. 126), resultó ser un factor independiente en la supervivencia de los pacientes. La **Figura 51** muestra como pacientes con tumores infiltrados con elementos CD163⁺ con morfología estrellada presentaron mayor supervivencia que tumores con elementos CD163⁺ redondos, concretamente a los 120 meses (10 años) la supervivencia de los pacientes con tumores con células CD163⁺ redondas fue del 55%, mientras que la de los pacientes con células CD163⁺ estrelladas fue de casi el 80%.

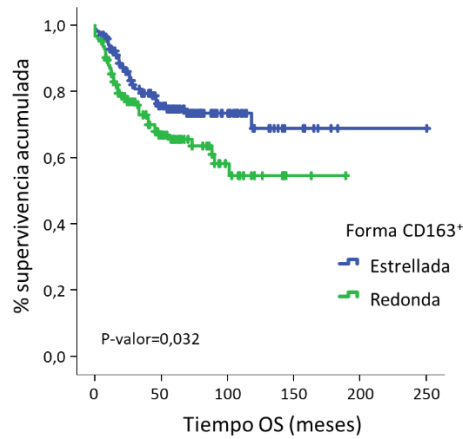


Figura 51. Curva Kaplan-Meier para la OS de los pacientes en base a la morfología de los elementos CD163⁺.

Por otra parte, la **Figura 52** muestra como pacientes con tumores infiltrados con elementos CD163⁺ grandes presentaron menor supervivencia que tumores con elementos CD163⁺ pequeños. Concretamente, la supervivencia de los pacientes con tumores con células CD163⁺ grandes a los 120 meses (10 años), fue del 45% aproximadamente, mientras que las de pacientes con tumores con células CD163⁺ pequeñas fue casi del 80% para la OS.

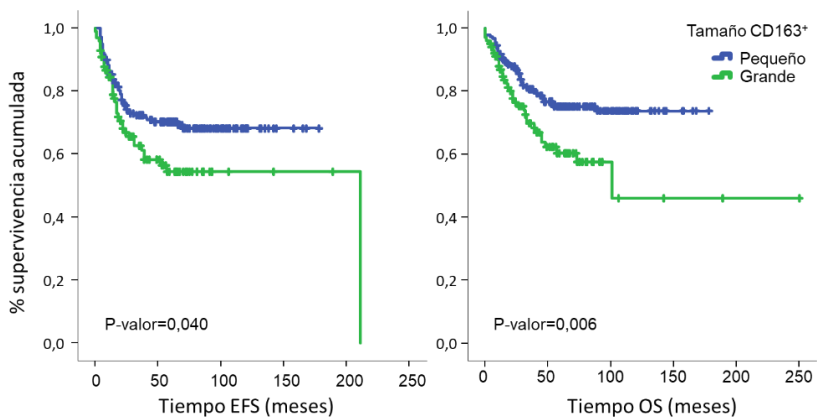


Figura 52. Curva Kaplan-Meier de supervivencia (OS imagen izquierda, EFS imagen derecha) de los pacientes en base a tamaño de los elementos CD163⁺.

Los análisis estadísticos no mostraron ninguna influencia de la distribución espacial (en nichos peritumorales o intratumoral) de los elementos CD163⁺ en la supervivencia de los pacientes.

IV.5.2.2 Patrones inmunes cuantitativos unitarios

Una vez vistos los marcadores inmunes que podían estar asociados al exitus, se procedió a estudiar qué marcadores inmunes, además de los factores de la INRG, podían estar influyendo el tiempo de sufrir un evento (definido como recaída o exitus). Es decir, se estudió la supervivencia a lo largo del tiempo en base a los marcadores inmunes y factores de la INRG.

En primer lugar, se vio como afectaba cada marcador inmune, de manera individual, al tiempo de supervivencia de los pacientes. Así se obtuvo que los siguientes marcadores fueron significativamente influyentes:

- El marcador CD11b con cualquiera de los tres métodos: Objetivo continuo (OS; p-valor=0,003, EFS; p-valor=0,022), Rango (OS; p-valor=0,024) o subjetivo (EFS; p-valor=0,016). De manera que a mayor infiltración CD11b⁺ menor supervivencia.
- El marcador CD45, medido subjetivamente, influía en la supervivencia de los pacientes (OS, p-valor=0,007; EFS, p-valor=0,009). De manera que pacientes con una infiltración CD45⁻, BAJA o MEDIA tuvieron menor supervivencia que aquellos con infiltración CD45^{ALTA}.
- El marcador CD68 medido con cualquiera de los tres métodos resultó significativo: Objetivo continuo (OS; p-valor=3*10⁻⁶, EFS;

p-valor= $2 \cdot 10^{-8}$), Rango (OS; p-valor= $1 \cdot 10^{-5}$, EFS; p-valor= $2 \cdot 10^{-4}$) o subjetivo (OS; p-valor=0,041). De manera que a mayor infiltración CD68⁺ menor supervivencia.

- El marcador CD163 medido con los métodos objetivos: Continuo (OS; p-valor=0,027) y rango (OS; p-valor=0,004, EFS; p-valor=0,044). De manera que a mayor infiltración CD163⁺ menor supervivencia.

IV.5.2.3 Patrones inmunes cuantitativos combinados

Una vez, vistos los marcadores individualmente influyentes se procedió a los análisis multivariantes para la búsqueda de patrones o modelos de marcadores inmunes influyentes en la supervivencia:

1. Tener un patrón de infiltración CD11c^{BAJA} & CD68^{ALTA} disminuye la supervivencia.

Este primer modelo fue obtenido con la variable objetiva rango dicotomizada (baja vs alta infiltración), y resultó significativo para la supervivencia total (OS) con un p-valor de $8 \cdot 10^{-7}$, y para la supervivencia libre de eventos (EFS) con un p-valor global de $1,4 \cdot 10^{-5}$. Los modelos para la OS y EFS se muestran en la **Tabla 29**.

Tabla 29. Modelo de supervivencia en base a las variables objetivas rango dicotómicas (Ref OS: Exitus, Ref EFS: Evento).

Supervivencia	CD	HDR (95% IC)	p-valor
OS	CD11c (A)	0,508 (0,319-0,809)	0,004
	CD68 (A)	2,906 (1,904-4,434)	<0,000
EFS	CD11c (A)	0,552 (0,362-0,842)	0,006
	CD68 (A)	2,482 (1,655-3,721)	<0,000

Abreviaturas en pág. 13.

En este primer modelo, la supervivencia de un paciente con infiltración CD68^{ALTA} se multiplica por $1/2,906 = 0,34$, es decir, se reduce un 66% respecto a uno con infiltración CD68^{NO ALTA}. De la misma manera, un paciente con infiltración CD11c^{NO ALTA} no alargó su supervivencia (OS) 1,96 veces ($1/0,508$) respecto a uno con infiltración CD11c^{ALTA}.

El mismo modelo resultó significativo con las variables rango (tricotómicas), para la OS ($p\text{-valor} = 1 \cdot 10^{-6}$); y para la EFS ($p\text{-valor} = 7,6 \cdot 10^{-5}$) (**Tabla 30**):

Tabla 30. Modelo de supervivencia con las variables objetivas rango tricotómicas (Ref OS: Exitus, Ref EFS: Evento).

Supervivencia	CD	HDR (95% IC)	p-valor
OS	<i>CD11c</i>		0,006
	<i>CD11c(M)</i>	1,036 (0,670-1,604)	0,873
	<i>CD11c(A)</i>	0,469 (0,284-0,775)	0,003
	<i>CD68</i>		0,000
	<i>CD68 (M)</i>	1,919 (1,073-3,431)	0,028
	<i>CD68(A)</i>	3,243 (2,093-5,026)	0,000
EFS	<i>CD11c</i>		0,011
	<i>CD11c(M)</i>	1,146 (0,762-1,721)	0,513
	<i>CD11c(A)</i>	0,556 (0,351-0,881)	0,012
	<i>CD68</i>		0,000
	<i>CD68 (M)</i>	1,314 (0,731-2,363)	0,361
	<i>CD68(A)</i>	2,579 (1,699-3,917)	0,000

Abreviaturas en pág. 13.

Ambos modelos, obtenidos con diferentes variables de rango, muestran la influencia negativa de una infiltración CD11c^{NO ALTA}. Según los resultados mostrados, presentar infiltración CD11c^{NO ALTA} disminuyó el tiempo de supervivencia (OS) de los pacientes a más de la mitad

respecto a una infiltración CD11c^{ALTA} (la supervivencia fue 1/0,469=2,13 veces menor). En cuanto al marcador CD68, ahora pudimos apreciar que, tanto una infiltración CD68^{MEDIA} como la CD68^{ALTA}, acortaron el tiempo de supervivencia (OS) a casi la mitad (1/1,919) o la tercera parte (1/3,243), respectivamente, respecto a una infiltración CD68^{BAJA}. Resultados similares se obtuvieron para la EFS.

Este modelo cobró gran importancia al incorporar todos los factores de la INRG, ya que estos dos marcadores siguieron resultando significativos. Y, aunque únicamente lo fueron para la OS y las variables rango dicotómicas, tuvieron una gran significatividad con un p-valor de $4,9 \times 10^{-38}$. Los valores del Hazard Ratio y del intervalo de confianza pueden verse en la **Tabla 31**.

Tabla 31. Modelo de supervivencia (OS) en base a las variables objetivas rango dicotómicas y los factores de la INRG (Ref: Exitus).

	HDR (95% IC)	p-valor
<i>CD11c (A)</i>	0,548 (0,322-0,934)	0,027
<i>CD68 (A)</i>	1,718 (1,029-2,870)	0,039
Estadio		0,000
Estadio M	3,355 (2,072-5,434)	<0,000
Estadio Ms	0,990 (0,381-2,574)	0,983
<i>MYCN (MNA)</i>	4,886 (2,729-8,747)	<0,000
11q (D)	2,652 (1,580-4,451)	<0,000
1p (D)	1,526 (0,926-2,514)	0,098

Abreviaturas en pág. 13.

En este modelo, el comportamiento de estos dos marcadores fue el mismo al descrito en los modelos anteriores, al igual que los factores de la INRG (aunque sin el grado de diferenciación tumoral y con alteraciones del 11q y 1p). Pertenecer a el estadio M, tener MNA, 11q del o 1p del disminuyeron la supervivencia de los pacientes en un 70%, un 80%, un 63% y un 35% respectivamente. Un comportamiento que,

también se vio con la combinación $CD11c^{BAJA}CD68^{ALTA}$ **Figura 53**, donde además de influir en el riesgo de exitus (visto en el apartado anterior), también influyó en el tiempo de supervivencia:

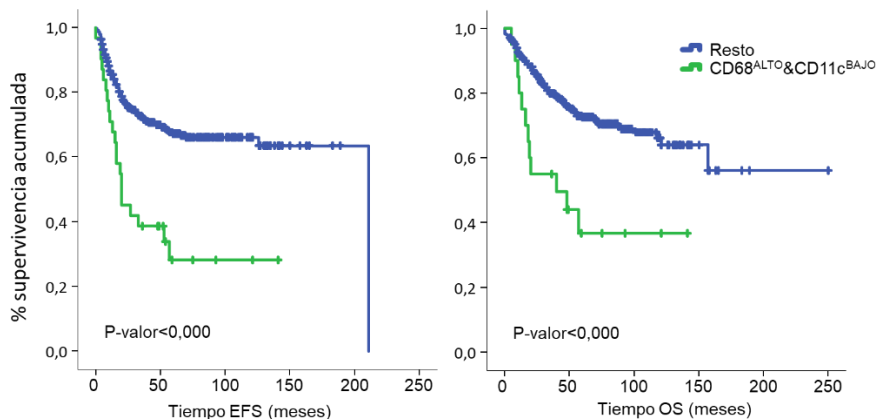


Figura 53. Curvas Kaplan-Meier (OS y EFS) de pacientes con la combinación de marcadores inmunes $CD68^{ALTO}$ y $CD11c^{BAJO}$.

En la **Figura 53** podemos apreciar como a un tiempo de unos 60 meses (5 años), la supervivencia, tanto OS como EFS, de los pacientes con esta combinación decayó a menos del 40%, mientras que los pacientes sin esta combinación fue de más del 70%. La **Figura 56-A** de la pág. 165 ilustra este patrón de infiltración en un paciente HR.

2. Tener un patrón de infiltración con TAM^{ALTOS} ($CD68^{ALTA}$ y $CD163^{ALTA}$) disminuyó el tiempo de supervivencia.

Una infiltración alta de macrófagos (Infiltración $CD68^{ALTA}$ y $CD163^{ALTA}$ para las variables rango) acortó la supervivencia de los pacientes medida como OS y como EFS. La siguiente figura (**Figura 54**) muestra las curvas Kaplan-Meier obtenidas tras realizar los test de supervivencia log-Rank con esta combinación de marcadores. En ella podemos ver como la

supervivencia de los pacientes es menor con una infiltración alta de estos dos marcadores.

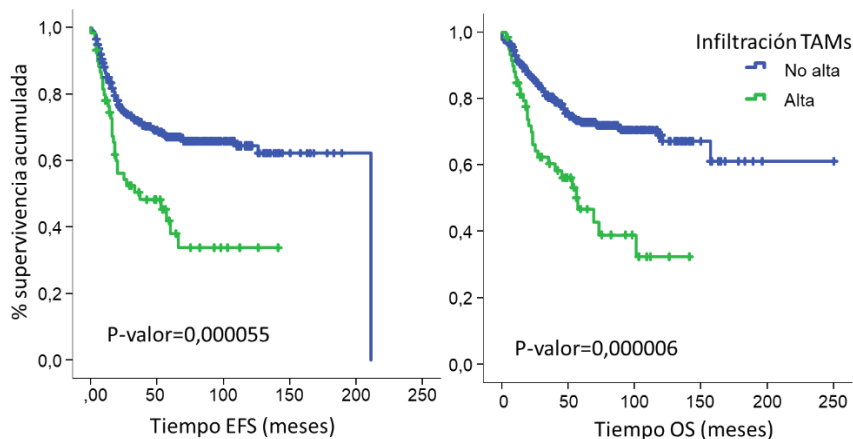


Figura 54. Curvas Kaplan-Meier para la OS y la EFS de pacientes con alta vs no alta infiltración de TAM.

Como puede verse en la figura anterior, la supervivencia (OS) a los 120 meses (10 años) de los pacientes con este patrón de infiltración cayó hasta casi el 30%, mientras que para los pacientes sin este patrón de infiltración en sus tumores fue del 70% aproximadamente. Por otro lado, al incorporar al análisis de supervivencia el resto de factores de la INRG, este modelo también resultó significativo para la OS (p -valor= $8 \cdot 10^{-42}$) (**Tabla 32**):

Tabla 32. Modelo de supervivencia (OS) en base a las variables inmunes y factores de la INRG (Ref: Exitus).

	HDR (95% IC)	p-valor
TAM ^{Altos}	1,651 (1,019-2,674)	0,042
Estadio M	3,117 (1,961-4,954)	<0,000
Estadio Ms	1,224 (0,508-2,905)	0,652
MYCN	3,845 (2,361-6,262)	<0,000
11q	2,224 (1,432-3,454)	<0,000
1p	1,715 (1,083-2,715)	0,021

Abreviaturas en pág. 13.

La probabilidad de sufrir exitus fue 1,6 veces mayor si hubo infiltración TAM^{ALTOS} (HDR>1, aumenta la probabilidad de exitus). Además, como ya se ha descrito, los factores de la INRG influyeron en la supervivencia de la manera descrita en la bibliografía: El tiempo de supervivencia disminuyó en 3,1 veces en los tumores con estadios M en lugar de L, o 3,8 veces si el tumor tuvo MNA, 2,224 veces si fue 11q delecionado, o 1,7 veces si fue 1p delecionado.

La **Figura 56-B** de la pág. **165** ilustra este patrón de infiltración en el tumor de un paciente HR.

Así mismo, no tener o tener pocos TAM (infiltración baja) aumentó el tiempo de supervivencia de los pacientes (**Figura 55**).

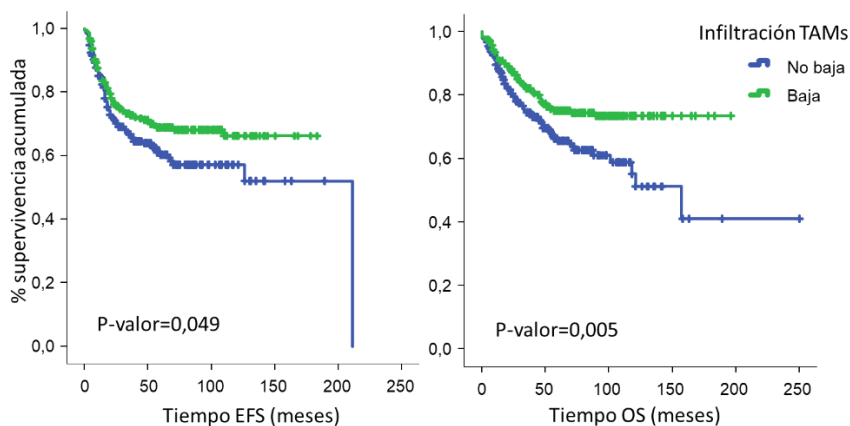


Figura 55. Curvas Kaplan-Meier para la OS y la EFS de pacientes con baja vs no baja infiltración de TAM.

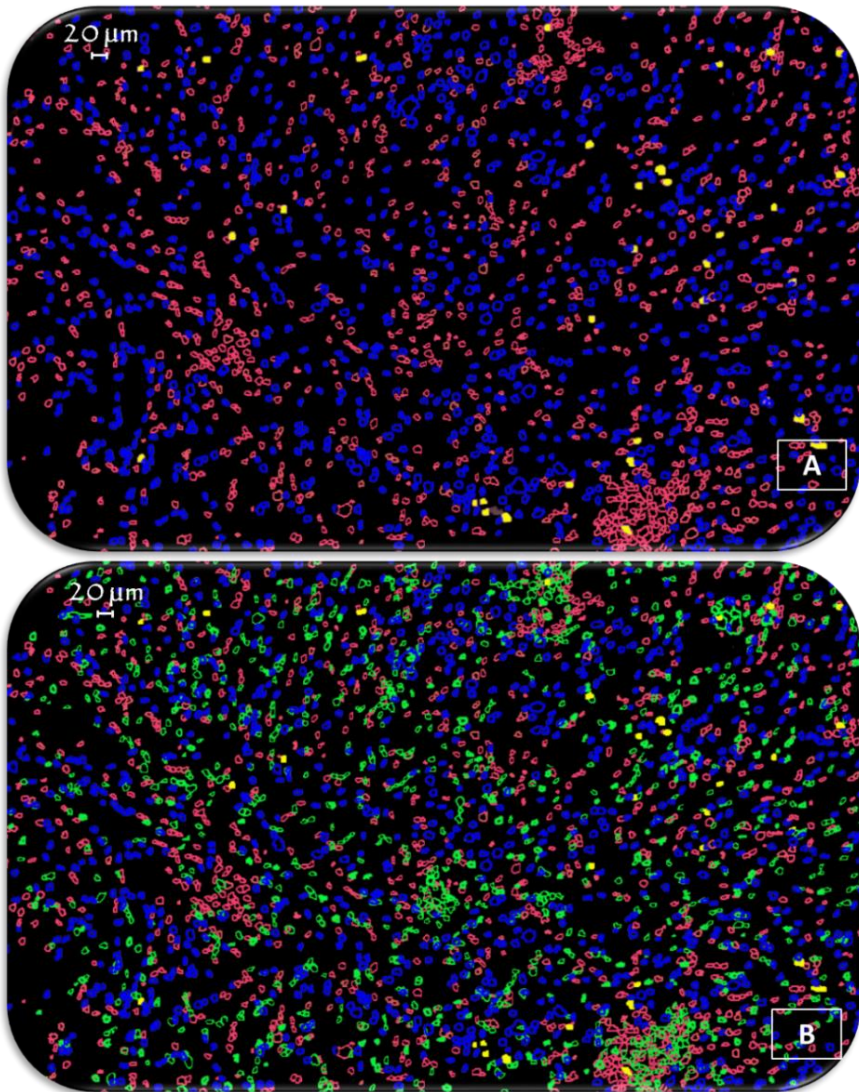


Figura 56. Imagen microscópica digital segmentada o máscaras del infiltrado inmune de un tumor perteneciente a un paciente que sufrió exitus. Figura A: células dendríticas CD11c⁺, (amarillo) y TAM CD68⁺ (rojo). Figura B: TAM CD68⁺ (rojo), y CD163⁺ (verde). En ambas figuras se muestran los neuroblastos (azul).

3. Tener un patrón de infiltración TAM^{ALTOS} (CD68^{ALTA} y CD163^{ALTA}) y CD11b^{ALTA} disminuyó el tiempo de supervivencia. Su valor desaparece al incorporar los factores de la INRG.

Este modelo constituye una variante del modelo anterior que incorpora una infiltración alta de CD11b⁺. De manera que, pacientes con esta nueva combinación presentan, de nuevo, una menor supervivencia medida como OS y EFS (**Figura 57**). Si bien el número de los casos con alta infiltración para estos tres marcadores fue excesivamente pequeño (n=15).

Esta variante del modelo anterior muestra como la supervivencia (OS) a los 60 meses (5 años) de los pacientes con este patrón de infiltración cayó hasta el 40%, mientras que para los pacientes sin este patrón de infiltración en sus tumores fue de más del 70%.

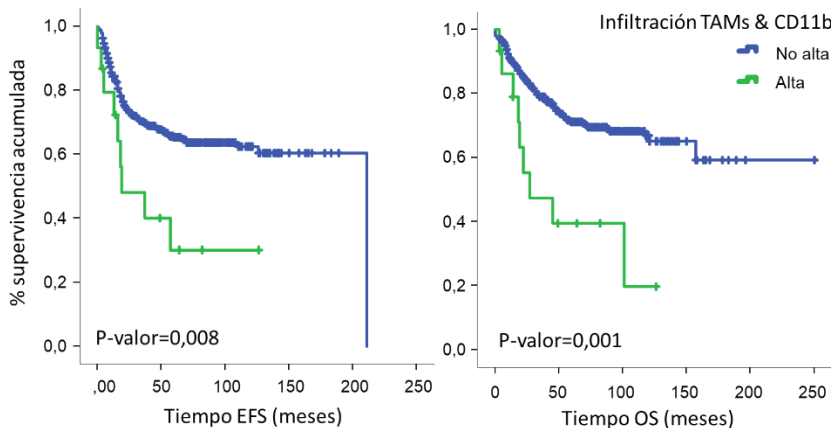


Figura 57. Curvas Kaplan-Meier para la OS y la EFS de pacientes con alta vs no alta infiltración macrofágica y CD11b⁺.

Una combinación similar se obtuvo sin la presencia del marcador CD163. El resultado se muestra en la siguiente figura (**Figura 58**), en la que se puede ver como presentar una infiltración conjunta de CD11b^{ALTA}&CD68^{ALTA} disminuyó el tiempo de supervivencia de los pacientes:

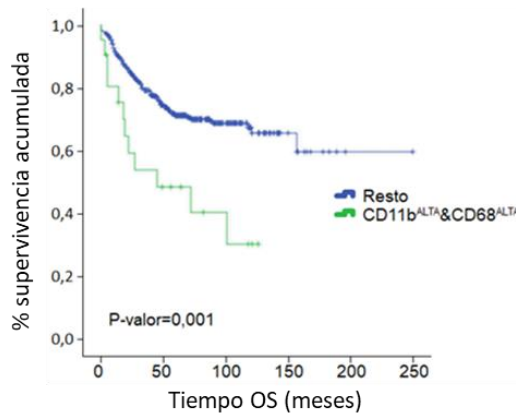


Figura 58. Curvas Kaplan-Meier para la OS de pacientes con la combinación de marcadores CD11b^{ALTA} y CD68^{ALTA}.

Los pacientes que tuvieron tumores con este patrón de infiltración tuvieron una supervivencia a los 120 meses (10 años) del 30%, frente al 65% de aquellos pacientes con tumores que no presentaron este patrón.

La siguiente figura, ilustra este patrón de infiltración inmune en un tumor de un paciente de HR-NB con exitus antes de los 12 meses de edad (**Figura 59**).

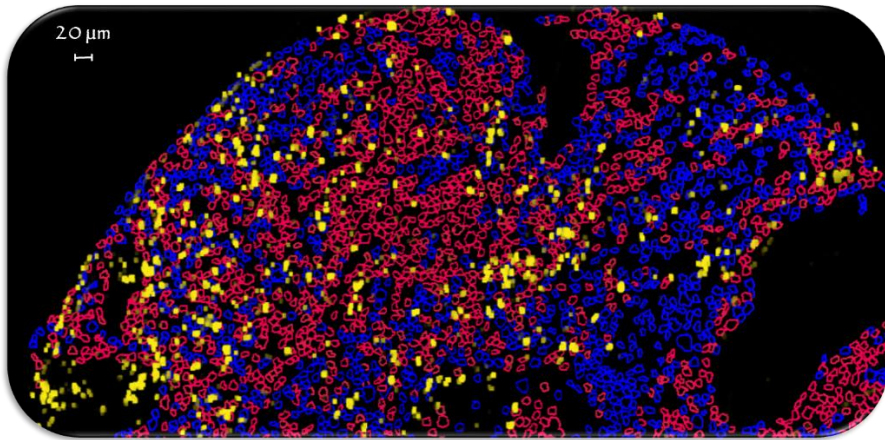


Figura 59. Imagen microscópica digital segmentada o máscaras del infiltrado inmune de un tumor perteneciente a un paciente que sufrió exitus. Células MDSC CD11b⁺, (amarillo) y TAM CD68⁺ (rojo). Se muestran los neuroblastos (azul)

4. Tener un patrón de infiltración CD11b^{ALTA} y CD11c^{BAJA} disminuyó el tiempo de supervivencia.

La siguiente figura (**Figura 60**) muestra como presentar una infiltración conjunta de CD11b^{ALTA}&CD11c^{BAJA} disminuyó el tiempo de supervivencia de los pacientes:

A los 120 meses (10 años), los pacientes que presentaron tumores con este patrón de infiltración tuvieron una supervivencia de casi el 40%, mientras que los pacientes que no presentaron este patrón de infiltración en sus tumores tuvieron aproximadamente el 70% de supervivencia (OS).

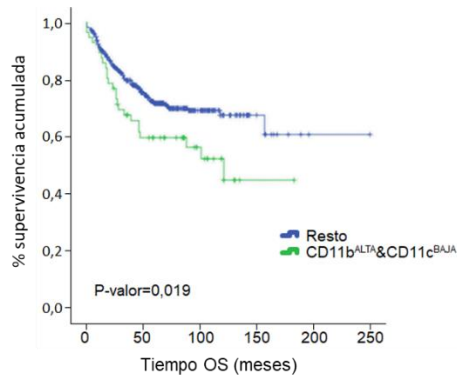


Figura 60. Curvas Kaplan-Meier para la OS de pacientes con la combinación de marcadores CD11b&CD11c.

5. Presentar un patrón de infiltración CD8⁺, CD11c⁺ MEDIA y CD7⁻ aumenta el tiempo de supervivencia. Su valor desaparece al recuperar los factores de la INRG.

Un último modelo asociado al tiempo de supervivencia se obtuvo con las variables subjetivas de los marcadores inmunes. Los resultados del modelo (mostrados en la **Tabla 33**), mostraron que los pacientes con infiltración; CD8⁻ frente a una infiltración CD8⁺ de cualquier intensidad (HDR<1 disminuye la probabilidad de que ocurra evento, en este caso exitus), una infiltración CD7⁺ de intensidad baja o media frente a CD7⁻ (HDR>1) y una infiltración CD11c⁻ frente a una CD11c⁺ de intensidad media (HDR<1), tuvieron menor tiempo de supervivencia OS (p-valor=0,001).

Un modelo similar se obtuvo para la EFS, que incorporó, además, el marcador CD11b⁺, de manera que pacientes con el mismo modelo anterior, pero además con infiltración CD11b⁺ tuvieron menor supervivencia EFS (p-valor=0,001) (modelo no mostrado).

Tabla 33. Modelo de supervivencia (OS) en base a las variables subjetivas (Ref: Exitus).

	HDR (95% IC)	p-valor
<i>CD7</i>		0,003
<i>CD7(B)</i>	2,078 (1,272-3,394)	0,003
<i>CD7(M)</i>	3,480 (1,661-7,290)	0,001
<i>CD7(A)</i>	1,563(0,195-12,531)	0,674
<i>CD8</i>		0,008
<i>CD8(B)</i>	0,476 (0,289-0,784)	0,004
<i>CD8(M)</i>	0,382 (0,187-0,780)	0,008
<i>CD8(A)</i>	0,299 (0,103-0,869)	0,027
<i>CD11c</i>		0,084
<i>CD11c(B)</i>	1,063 (0,647-1,747)	0,808
<i>CD11c(M)</i>	0,374 (0,158-0,884)	0,025
<i>CD11c(A)</i>	0,849 (0,332-2,175)	0,733

Abreviaturas en pág. 13.

Al incorporar a la regresión el resto de factores de la INRG, no se seleccionó ningún marcador inmune que influyera significativamente en la supervivencia (OS o EFS).

Por otra parte, con el marcador CD8 se obtuvo una combinación influyente en la supervivencia. De manera que, tener una infiltración CD8^{BAJA} y CD68^{ALTA} disminuyó la supervivencia de los pacientes (p -valor<0,000). Esta combinación no se consideró como patrón inmune, ya que la supervivencia promedio de los pacientes que la presentaban (100 meses menor que los que no la presentaban) fue la misma que si tan solo presentaran CD68^{ALTA}, con lo que el marcador CD8 no pareció tener mayor influencia.

IV.5.3 Patrones inmunes influyentes en la clasificación global de riesgo pretratamiento de los pacientes (riesgo alto y no alto)

IV.5.3.1 Patrones inmunes morfológicos de las células CD163⁺

La morfología de las células CD163⁺, además de haber resultado significativa para la supervivencia de los pacientes, consolidándose como una variable independiente, resultó significativamente influyente en la clasificación de riesgo de los pacientes, tanto real como calculado. La siguiente tabla muestra esta influencia (**Tabla 34**):

Tabla 34. Influencia de la morfología de las células CD163⁺ en la clasificación de riesgo (Cat. Ref: Riesgo alto).

	<i>Riesgo</i>	<i>OR (95% IC)</i>	<i>p-valor</i>
CD163 forma (Rd)	Calculado	1,786 (1,134-2,814)	0,012
CD163 tamaño (Gr)	Calculado	2,120 (1,307-3,439)	0,002
CD163 tamaño (Gr)	Real	2,936 (1,692-5,095)	0,0001

Abreviaturas en pág. 13.

Puede verse como la forma redondeada (frente a la estrellada) o un tamaño grande (frente a pequeño) de estas células disminuye la probabilidad de pertenecer al grupo de no HR (OR>1 supone un aumento de probabilidad de pertenecer al grupo HR) en torno a la mitad (1,1786 en el caso de la forma o 1/2,120 en caso del tamaño). La distribución espacial de estas células no resultó significativa para la clasificación de riesgo.

IV.5.3.2 Patrones celulares inmunes cuantitativos unitarios

Una vez vistos qué marcadores inmunes son variables independientes que influyen en el tiempo de supervivencia de los pacientes, en este apartado describiremos que diferencias de infiltración inmune existen en las cohortes de riesgo de los pacientes, establecidas como riesgo calculado, riesgo real y riesgo ultra alto:

Riesgo calculado y riesgo real

La siguiente tabla (**Tabla 35**) muestra las diferencias en el número de pacientes entre las dos clasificaciones de riesgo:

Tabla 35. Comparativa del número de casos entre ambas clasificaciones de riesgo

N		RR		
		No HR	HR	TOTAL
RC	No HR	421	0	421
	HR	67	129	196
	TOTAL	488	129	617

La siguiente tabla muestra los p-valores de aquellos marcadores inmunes que tuvieron diferencias significativas de distribución entre los pacientes de riesgo alto vs no alto en los grupos de RC y RR en las diferentes variables (**Tabla 36**):

Tabla 36. P-valores significativos de los tests no paramétricos entre los CD, en sus distintas variables, y la clasificación de riesgo (Abreviaturas en pág. 13).

VARIABLE	RC			RR		
	C	R	S	C	R	S
CD4	0,042	-	0,011	-	0,012	<0,000
CD68	<0,000	<0,000	0,003	<0,000	<0,000	<0,000
CD163	0,002	0,006	-	<0,000	<0,000	-

A continuación, se muestran las diferencias de distribución de estos marcadores que han resultado significativos:

En la **Figura 61** se muestra como en la cohorte HR hay más elementos CD4⁺, CD68⁺ y CD163⁺ que en la cohorte de riesgo no alto. Los resultados para CD4 muestran diferencias de distribución significativas, pero ambas cohortes tienen la misma mediana.

Por otro lado, en la **Figura 62**, se muestran los porcentajes del número de casos para las diferentes categorías de las variables rango.

De nuevo vemos que en la cohorte HR hay más casos de rango con alta infiltración de los esperados o menos casos con rango de baja infiltración en estos marcadores, tanto para el RC como para el real.

Por último, subjetivamente, se obtuvieron las mismas diferencias entre estos dos marcadores y, además, para el marcador CD4 se dieron más casos positivos y menos casos negativos de los esperados en la cohorte HR en comparación con la cohorte no HR. Por tanto, a la vista de ambas figuras, se apreciaron resultados muy similares obtenidos para ambas clasificaciones de riesgo.

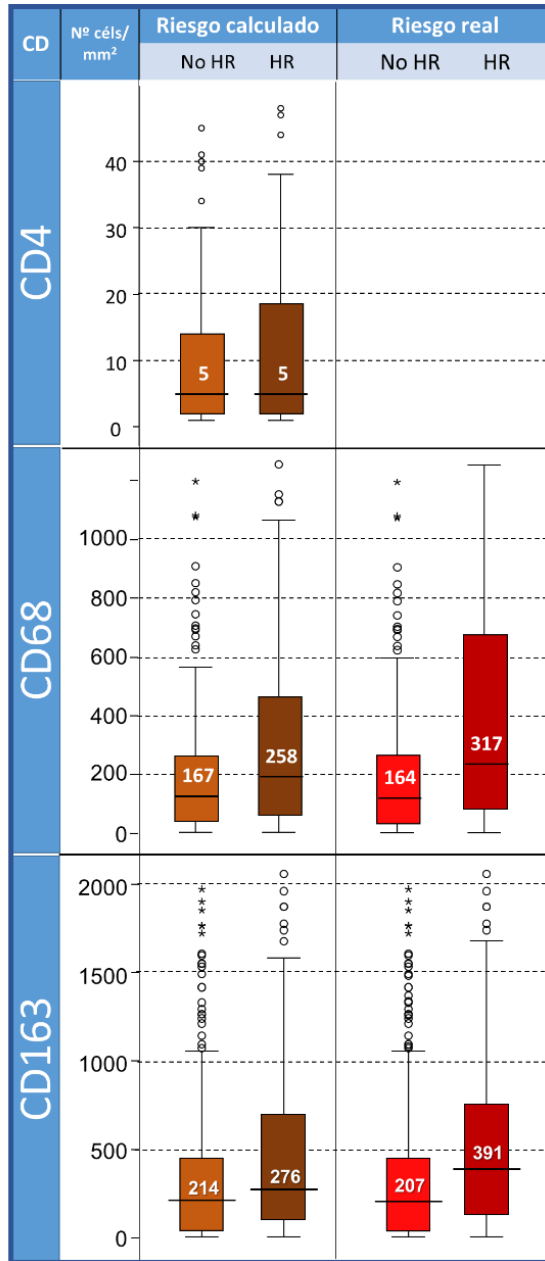


Figura 61. Diagramas de caja y bigotes de la distribución de los CD en las distintas cohortes de riesgo.

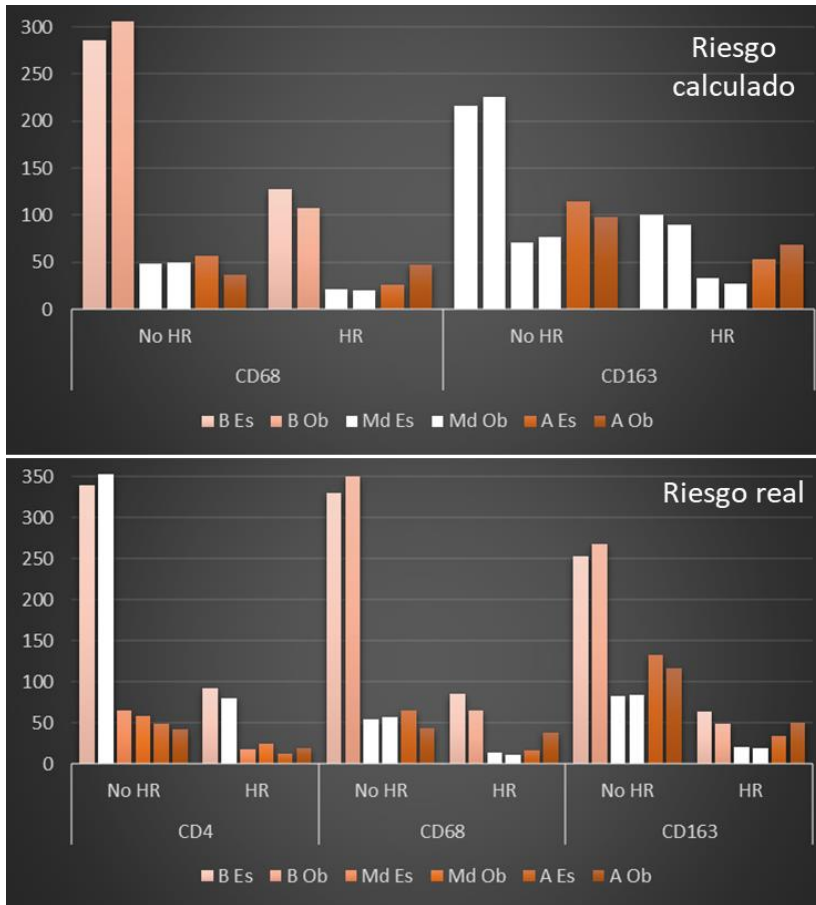


Figura 62. Número de casos esperados y observados en cada rango de CD según la clasificación de riesgo de los pacientes. En color las diferencias significativas. Abreviaturas pág. 13.

Riesgo ultra alto

De los 129 HR, 30 pacientes resultaron ser UHR. Tan solo se obtuvieron diferencias en la distribución de elementos CD11c⁺ medido con la variable objetiva continua (p-valor=0,049) y en la presencia o ausencia de TLO (p-valor=0,020) entre las cohortes HR vs UHR.

La siguiente figura (**Figura 63**) muestra estas diferencias de distribución de los elementos CD11c⁺ en las diferentes cohortes de riesgo alto o ultra alto:

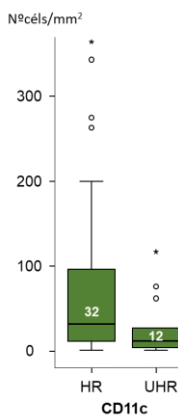


Figura 63. Diagrama de cajas y bigotes de la distribución de elementos CD11c⁺ en la cohorte de HR vs UHR.

Se puede apreciar como la cantidad de elementos CD11c⁺ es menor en la cohorte de mayor riesgo, en este caso, la cohorte UHR.

Por último, la **Tabla 37** muestra las diferencias en el número de casos con presencia/ausencia de TLO en las diferentes cohortes de riesgo alto vs ultra alto.

Tabla 37. Porcentaje de casos con presencia/ausencia de TLO en las diferentes cohortes de riesgo ultra alto. En negrita las categorías significativas.

<i>TLO:</i>		Ausencia			Presencia		
<i>Factor</i>	<i>Recuento</i>	O		E	O		E
		N	%	N	N	%	N
<i>UHR</i>	HR	74	75	78	25	15	21
	UHR	28	93	24	2	7	6

Podemos ver, en la cohorte de mayor riesgo, UHR, como existe menor cantidad de TLO de lo esperado.

IV.5.3.3 Patrones celulares inmunes cuantitativos combinados

Tras haber descrito las diferencias de infiltración que resultaron estadísticamente significativas en las diferentes cohortes de riesgo de los pacientes, se procedió a investigar la posible influencia que los marcadores inmunes pudieran estar ejerciendo en el riesgo de los pacientes, de nuevo establecido como RC, RR y riesgo ultra alto:

Riesgo calculado y riesgo real

Antes de explorar qué patrones o combinaciones de marcadores inmunes influyeron en la clasificación de riesgo, se analizaron qué marcadores fueron influyentes de manera individual. La **Tabla 38** muestra aquellos que lo fueron con sus variables objetivas continuas:

Tabla 38. Marcadores individualmente influyentes en la clasificación de riesgo para sus variables objetivas continuas (Cat. Ref: Riesgo alto).

	<i>RC</i>		<i>RR</i>	
	OR (95% IC)	p-valor	OR (95% IC)	p-valor
CD7	1,001 (1,000-1,001)	0,014	1,001 (1,000-1,001)	0,018
CD11b	1,003 (1,000-1,007)	0,038		
CD68	1,001 (1,000-1,001)	<0,000	1,001 (1,000-1,001)	<0,000
CD163	1,001 (1,000-1,001)	0,035	1,001 (1,000-1,001)	0,039

Abreviaturas en pág. 13.

Todos estos modelos nos indican que la presencia de elementos positivos (de cualquier CD) disminuyen la probabilidad de los pacientes de pertenecer al grupo no HR (Odd Ratio, OR > 1). Así, por ejemplo, por cada célula CD7⁺ o CD11b⁺ que se presente, la probabilidad de pertenecer al grupo de no HR disminuía un 0,1% o un 0,3% respectivamente. Los marcadores CD68 y CD163 también resultaron significativos para sus variables rango. De manera que tener alta

infiltración de estos marcadores aumentó la probabilidad de pertenecer a la cohorte HR. Además de sus versiones objetivas continuas, los marcadores CD68 y CD163 resultaron significativos para el pronóstico de RR de los pacientes de manera individual también para sus variables objetivas rango.

El análisis subjetivo también dio resultados para distintos marcadores de manera individual, como los marcadores CD4 (p-valores: RC=0,016, RR=0,0002), el CD11b (p-valores: RC=0,008, RR=0,014) y CD68 (p-valores RC=0,008, RR=0,00004). De manera que una infiltración CD4^{BAJA} frente a CD4⁻, una infiltración CD11b^{BAJA/ALTA} frente a una CD11b⁻ y una infiltración CD68^{ALTA} frente a CD68⁻, aumentó, respectivamente, en 2.2, 2.5/4 y 5.7 veces, la probabilidad de pertenecer a la cohorte HR.

A continuación, se estudiaron los patrones o combinaciones de marcadores inmunes influyentes en la clasificación de riesgo de los pacientes, junto con otros factores de la INRG. La **Tabla 39** muestra los modelos obtenidos para el RC, mientras que la **Tabla 40** muestra los obtenidos para el RR. En ambas tablas se muestran los resultados de todos los patrones inmunes obtenidos que resultaron significativos para la clasificación de riesgo de los pacientes.

Tabla 39. Modelos obtenidos para el RC

CD o factor	Variables de los CDs	OR (95% IC)	p-valor	AUC	S/E	P.C. S/E	p-valor general
CD11c ⁺ (A)	Objetivas rango (2 categorías)	0,473 (0,285-0,783)	0,004	0,64	30/90	0,4	8*10 ⁻⁹
CD68 ⁺ (A)		4,986 (2,892-8,596)	<0,000				
CD68 ⁺ (A)	Objetivas rango (2 categorías)	10,216 (3,473-30,052)	<0,000	0,97	92/92	0,2	4*10 ⁻⁶⁸
Edad (≥18)		12,294 (4,484-33,703)	<0,000				
Estadio (M)		67,043 (22,26-201,93)	<0,000				
Estadio (Ms)		9,781 (2,510-38,120)	0,001				
Dif. Tum (pD)		1,345 (0,414-4,367)	0,622				
Dif. Tum (Dif)		0,085 (0,009-0,767)	0,028				
Perfil Gen (SCA)		4,979 (1,097-22,604)	0,038				
1p (D)		14,792 (5,140-42,570)	<0,000				
CD4 ⁻	Subjetivas		0,002	0,96	85/93	0,5	1*10 ⁻¹⁴
CD4 ⁺ (B)		3,381 (1,783-6,409)	0				
CD4 ⁺ (Md)		2,178 (0,658-7,215)	0,203				
CD4 ⁺ (A)		5,480 (0,691-43,488)	0,107				
CD8 ⁻			0,014				
CD8 ⁺ (B)		0,390 (0,210-0,726)	0,003				
CD8 ⁺ (Md)		0,337 (0,150-0,757)	0,008				
CD8 ⁺ (A)		0,364 (0,095-1,391)	0,14				
CD11b ⁻			0,001				
CD11b ⁺ (B)		2,923 (1,679-5,088)	0				
CD11b ⁺ (Md)		2,724 (1,202-6,170)	0,016				
CD11b ⁺ (A)		3,713 (0,926-14,884)	0,064				
CD11c ⁻			0,047				
CD11c ⁺ (B)		1,329 (0,723-2,442)	0,36				
CD11c ⁺ (Md)		0,445 (0,183-1,082)	0,074				
CD11c ⁺ (A)		0,608 (0,177-2,091)	0,43				

Abreviaturas en pág. 13.

Tabla 40. Modelos obtenidos para el RR

CD o factor	Variables de los CDs	OR (95% IC)	p-valor	AUC	S/E	P.C. S/E	p-valor general
CD7 ⁺	Objetivas	1,001 (0,999-1,001)	0,073				
CD68 ⁺	continuas	1,0005 (1,001-1,002)	<0,000	0,671	30/93	0,3	9*10 ⁻⁷
CD45 ⁺	Objetivas	1,001 (0,999-1,001)	0,063				
CD68 ⁺	continua	1,0005 (1,001-1,002)	<0,000	0,655	39/87	0,24	1*10 ⁻⁶
CD68 ⁺		1,001 (1,001-1,002)	<0,000				
Edad (≥18)		11,914 (5,346-26,553)	<0,000				
Estadio (M)	Objetivas continua	11,740 (5,538-24,887)	<0,000				
Estadio (Ms)		1,029 (0,115-9,214)	0,998	0,944	73/91	0,5	3*10 ⁻⁴⁵
Dif Tum (pD)		3,669 (1,450-9,283)	0,006				
Dif Tum (Dif)		0,492 (0,087-2,797)	0,424				
MYCN (MNA)		11,951 (5,259-27,161)	<0,000				
CD45 ⁺		1,0002 (0,999-1,0001)	0,053				
CD68 ⁺		1,001 (1,001-1,002)	<0,000				
Edad (≥18)		14,502 (6,144-34,232)	<0,000				
Estadio (M)	Objetivas continua	11,055 (5,062-24,143)	<0,000				
Estadio (Ms)		0,969 (0,106-8,884)	0,978	0,95	92/77	0,5	2*10 ⁻⁴⁶
Dif Tum (pD)		3,880 (1,415-10,641)	0,008				
Dif Tum (Dif)		0,511 (0,085-3,082)	0,464				
MYCN (MNA)		15,450 (6,243-38,235)	<0,000				
CD68 ⁺ (M)		2,26 (0,48-10,74)	0,305				
CD68 ⁺ (A)	Objetivas rango (3 categorías)	32,93 (5,68-191,05)	<0,000		E:		
Edad (≥18)		36,77 (8,50-159,04)	<0,000	0,930	E: 90/87	0,4	6*10 ⁻⁵²
Estadio (M)		5,79 (1,69-19,84)	0,005		V: V: 78/82		
Estadio (Ms)		0,00 (0,00-0,00)	0,998	0,834			
MYCN (MNA)		12,57 (3,53-44,81)	<0,000				
TAMs ^{Altas}		11,665 (3,82-35,64)	<0,000				
Edad (≥18)	Combinación de rangos	15,816 (6,36-39,31)	<0,000		E:		
Estadio (M)		11,059 (4,66-26,24)	<0,000	0,937	E: 79/90	0,4	4*10 ⁻³⁰
Estadio (Ms)		0,000 (0,000-0,000)	0,998		V: V: 80/88		
Dif. Tum (pD)		4,058 (1,53-10,75)	0,005	0,861			
Dif. Tum (Dif)		0,134 (0,01-1,718)	0,134				
MYCN (MNA)		7,947 (3,28-19,28)	<0,000				
CD4 ⁺			0,015				
CD4 ⁺ (B)		2,979 (1,411-6,290)	0,004				
CD4 ⁺ (Md)		2,213 (0,496-9,876)	0,298				
CD4 ⁺ (A)		8,318 (0,662-104,542)	0,101				
Edad (≥18)	Subjetivas	7,391 (3,581-15,254)	<0,000	0,925	83/87	0,5	4*10 ⁻⁴⁴
Estadio				<0,000			
Estadio(M)		16,103 (7,972-32,527)	<0,000				
Estadio(Ms)		1,310 (0,143-11,972)	0,811				
MYCN (MNA)		6,497 (3,163-13,345)	<0,000				
CD4 ⁺				0,009			
CD4 ⁺ (B)			3,013 (1,580-5,748)	0,001			
CD4 ⁺ (Md)		1,446 (0,474-4,407)	0,517				
CD4 ⁺ (A)		2,521 (0,425-14,973)	0,309				
CD11b ⁺			0,008				
CD11b ⁺ (B)	Subjetivas	2,364 (1,323-4,227)	0,004				
CD11b ⁺ (Md)		3,185 (1,363-7,440)	0,007	0,71	46/85	0,3	2*10 ⁻¹⁰
CD11b ⁺ (A)		1,457 (0,321-6,615)	0,626				
CD68				0,011			
CD68 ⁺ (B)		1,628 (0,751-3,527)	0,217				
CD68 ⁺ (Md)		1,151 (0,504-2,625)	0,739				
CD68 ⁺ (A)		6,268 (1,900-20,678)	0,003				

Abreviaturas en pág. 13.

A continuación, se esquematizan los resultados mostrados en las tablas anteriores, explicando de mayor a menor importancia cada modelo o conjunto de modelos similares.

Riesgo calculado

Pacientes >18 meses y tumores con infiltración CD68^{ALTA}, estadios M, Nb indiferenciados y con MNA fueron clasificados como HR (calculado).

En este modelo con el marcador CD68 en su variable objetiva rango, se obtuvo que los pacientes con tumores con una infiltración CD68^{ALTA} tuvieron 10 veces mayor riesgo de pertenecer a la cohorte HR que los tumores sin infiltración CD68^{ALTA} (**Tabla 39**). El mismo modelo fue obtenido para la variable objetiva continua con un AUC de 0,972, una sensibilidad del 88% y una especificidad del 93% ($p\text{-valor}=3*10^{-8}$). Además, este mismo modelo (mismos factores de la INRG) fue obtenido con la variable TAM^{ALTOS}. Sin embargo, dado que por sí solo el marcador CD68 resultó significativo, la influencia ejercida en el pronóstico por parte de la variable TAM^{ALTOS} se atribuyó únicamente a los TAM CD68⁺.

El resto de modelos mostrados en la tabla anterior fueron tan solo con los CD, sin incorporar factores de la INRG. El primer modelo de RC, obtenido para las variables rango dicotómicas (también para las rango tricotómicas: resultado no mostrado), nos indicó que una infiltración CD11c^{ALTA} disminuyó a casi la mitad (1/0,473) la probabilidad de pertenecer al grupo HR, mientras que una infiltración CD68^{ALTA} la aumentó en casi 5 veces (4,986) (**Tabla 39**).

En cuanto al último modelo para el RC, pudimos apreciar que, pacientes con tumores con infiltración CD8⁺, aumentaron la probabilidad de pertenecer al grupo HR a casi el triple respecto a una infiltración CD8^{BAJA O MEDIA} (1/0,337=2,9 veces). Al contrario, tener una infiltración CD4^{BAJA} frente a CD4⁺ o CD11b^{BAJA O MEDIA}, frente a CD11b⁺, aumentó el riesgo de pertenecer al grupo HR en 3,381 o 2,923 veces respectivamente.

Riesgo real

Pacientes >18 meses y tumores con infiltración CD68^{ALTA}, estadios M y con MNA fueron clasificados como HR (real).

Se obtuvieron hasta cuatro modelos similares con estos factores comunes a todos ellos. La presencia del marcador CD68 estuvo presente en todos ellos, expresado en las diferentes variables (objetiva continua, rango y en combinación de TAM con CD163). Se realizó una simulación de muestreo en el modelo con la variable rango y la combinación de TAM, resultando en un modelo que tuvo una magnífica capacidad pronóstica, dados sus valores de AUC y S/E.

En todos estos modelos, la presencia de elementos CD68⁺ incrementó, a veces con mayor riesgo que la tener MNA, el riesgo de pertenecer a la cohorte HR.

Este mismo modelo fue obtenido con la variable CD68 rango dicotomizada (baja vs alta infiltración) con un p-valor=6,4*10⁻⁵². Además, se hizo una simulación de muestreo para validar la capacidad pronóstica obteniéndose unos valores para AUC de 0,937 y 0,932, y unos valores de sensibilidad del 77,8% y del 78,6 % mientras que los de

especificidad fueron del 88,7% y del 86,7% en las muestras de entrenamiento (N=237) y validación respectivamente (N=79), con un punto de corte para $p=0,4$.

Otros modelos que incluyeron el marcador CD68 tuvieron también los mismos factores de la INRG. Es el caso del modelo obtenido junto al marcador CD45, o la combinación TAM^{ALTOS}, en los que, una mayor infiltración de estos marcadores incrementó el riesgo de pertenecer a la cohorte HR.

Pacientes ≥ 18 meses y tumores con infiltración CD4⁺, estadios M y con MNA fueron clasificados como HR (real).

El modelo que se obtuvo con la infiltración CD4⁺, medida subjetivamente, junto con los factores de la INRG, tuvo una gran capacidad pronóstica, dados los valores de AUC y S/E (**Tabla 40**).

Al igual que se vio con el RC, en este caso tener una infiltración CD4^{BAJA} frente a una infiltración CD4⁻ aumentó a casi el triple (2,979) el riesgo de pertenecer al grupo HR, al igual que los factores de la INRG como ser mayor de 18 meses, tener estadio M o ser *MYCN* amplificado, comentados anteriormente.

Riesgo ultra alto

Pacientes con tumores con TLO tuvieron menor probabilidad de pertenecer al grupo UHR.

Se encontró que la presencia de TLO en el tejido tumoral disminuía en casi 5 veces (1/0,211) la probabilidad de ser UHR respecto a ser HR. Aunque la poca significación estadística y el área bajo la curva (AUC) nos indicó que no fue un buen modelo predictivo (**Tabla 41**).

Tabla 41. Modelo pronóstico de pertenencia al grupo de riesgo ultra alto (UHR) en función de la presencia de TLO (Cat.Ref: UHR).

	<i>OR (95% IC)</i>	<i>p-valor</i>	<i>AUC</i>
TLO	0,211 (0,047-0,952)	0,043	0,593

Abreviaturas en pág. 13.

Sin embargo, al incorporar el resto de factores de la INRG al modelo (de los cuales sólo se seleccionó el gen *MYCN*), se mejoró la capacidad predictiva (**Tabla 42**).

Tabla 42. Modelo predictivo de pertenencia al grupo de riesgo alto o riesgo ultra alto (Cat.Ref: UHR).

	<i>OR (95% IC)</i>	<i>p-valor</i>	<i>AUC</i>	<i>S/E</i>	<i>P.C</i>
TLO	0,179 (0,038-0,843)	0,030	0,738	70/77	0,4
MYCN	5,724 (2,254-14,540)	<0,000			

Abreviaturas en pág. 13.

En este modelo se puede ver como la presencia de TLO disminuyó en más de un 80%, mientras que la ausencia de amplificación del gen *MYCN* aumentó en casi 6 veces, la probabilidad de pertenecer al grupo de UHR.

IV.5.4 Patrones inmunes cuantitativos asociados a cada factor individual de la INRG

IV.5.4.1 Patrones celulares inmunes cuantitativos unitarios

A continuación, se describen las diferencias de distribución de las células inmunes significativas dentro de cada cohorte de pacientes definida por sus características clinicobiológicas.

La siguiente tabla muestra los p-valores de aquellos tests estadísticos que resultaron significativos entre las variables continuas de los CD y las características clinicobiológicas de los pacientes (**Tabla 43**):

Tabla 43. p-valores obtenidos de los análisis estadísticos con las variables continuas de los CD

	Edad	Estadio	Hist. Cat	Dif. Tum	MYCN	11q	17q	1p
CD4								
CD7			<0,000	<0,000		<0,000	0,011	
CD8			0,033	0,012	0,001	0,037		
CD20			0,015					
CD11b				0,006		0,039		
CD11c	0,005		0,008					0,029
CD45	0,045		0,004	<0,000	0,001	0,005		0,012
CD68			0,006		0,049	0,008	0,022	
CD163		0,014				0,009		0,045

Las diferencias en el número de células positivas por mm² de cada marcador, dentro de cada característica clinicobiológica, se pueden ver en las siguientes figuras (**Figura 64** y **Figura 65**):

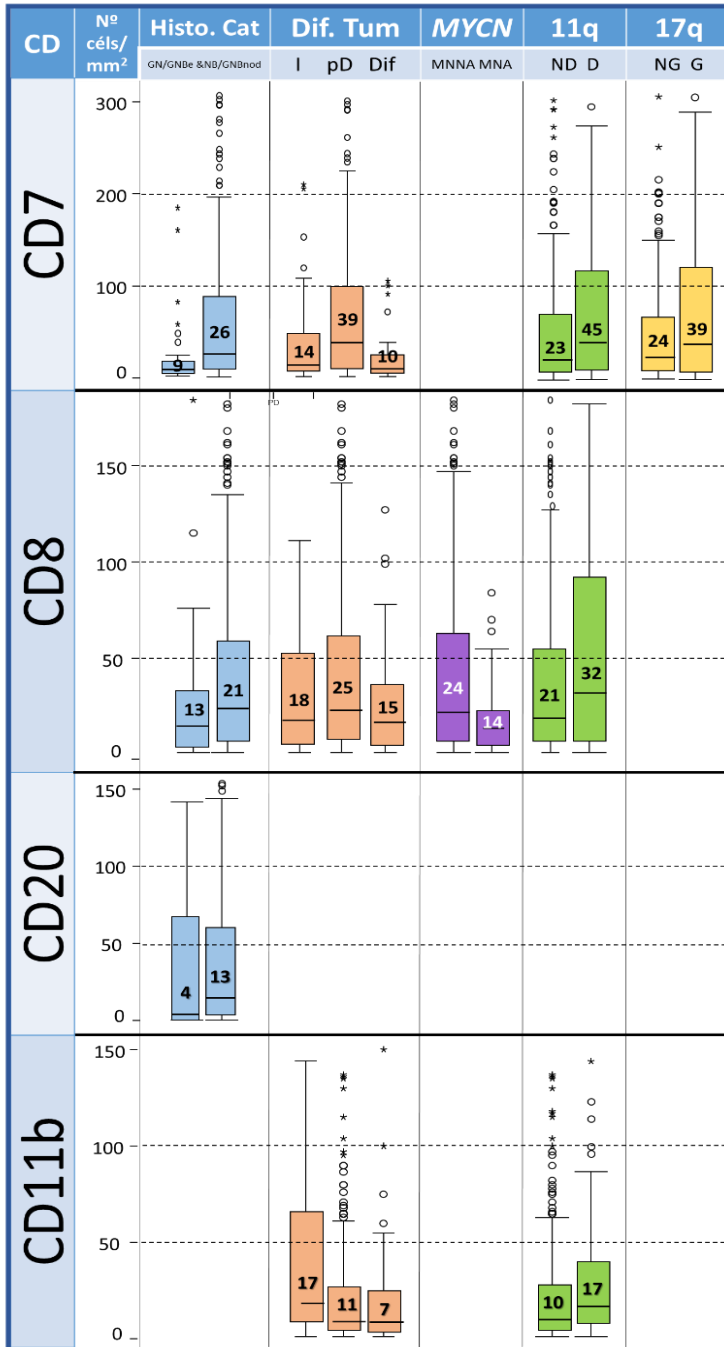


Figura 64. Resultados, representados en diagramas de cajas y bigotes, de las variables objetivas continuas de los marcadores de linfocitos (CD4 sin resultados) y CD11b⁺.

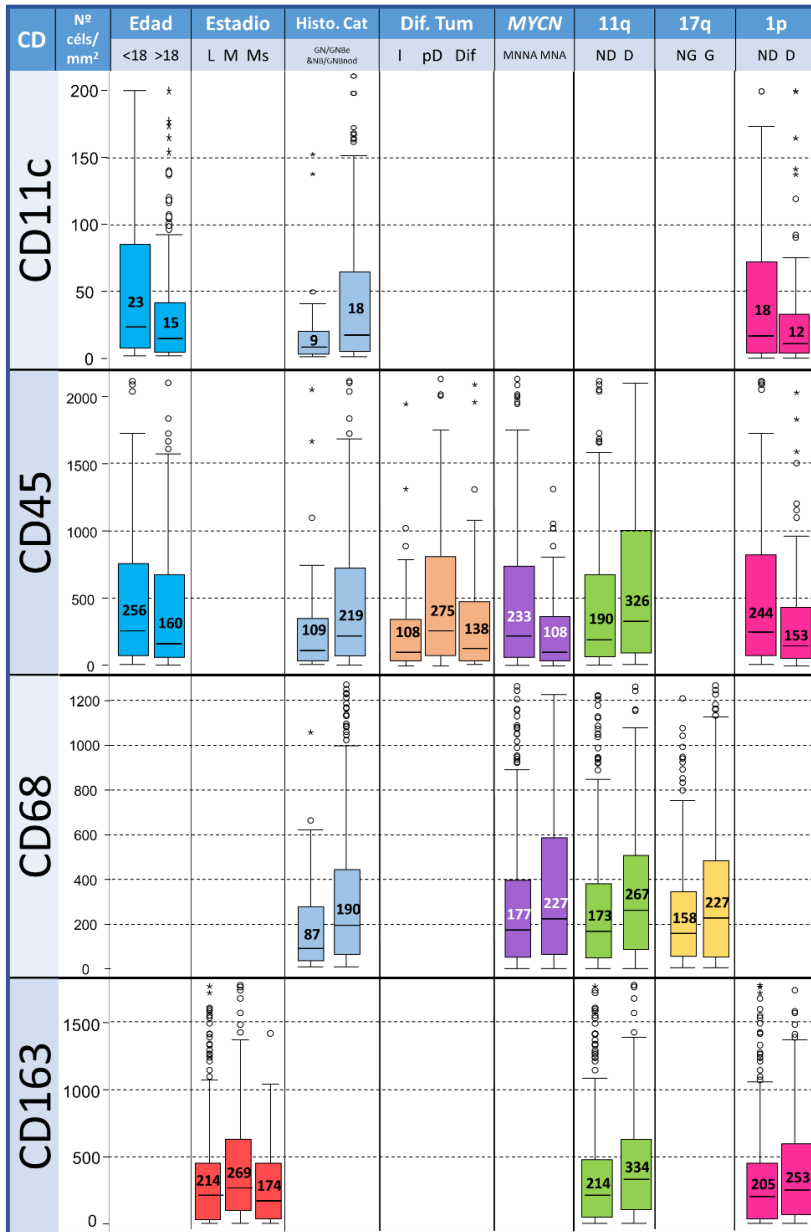


Figura 65. Resultados, representados en diagramas de cajas y bigotes, de las variables objetivas continuas de los marcadores de CD11c⁺ CD45⁺ y de TAM.

Por otra parte, la siguiente tabla muestra los p-valores de aquellos test estadísticos que resultaron significativos entre las variables rango (tricotómicas) de los CD y las características clinicobiológicas de los pacientes (**Tabla 44**)

Tabla 44. p-valores obtenidos de los análisis estadísticos con las variables rango de los CD.

	Edad	Estadio	Hist. Cat	Dif. Tum	MYCN	11q	17q	1p
CD4								
CD7			<0,001	<0,001		0,003		
CD8					<0,001			
CD20	0,016		0,004	0,016				
CD11b		0,040		0,004				0,039
CD11c	0,001		0,003	0,049	0,036			0,014
CD45	0,002			0,006	0,020			0,008
CD68	0,043	0,041			0,004	0,013	0,010	0,045
CD163		0,043					0,001	

Atendiendo a toda esta información, además de la proporcionada en las siguientes figuras (**Figura 66** y **Figura 67**), podemos ver las diferencias cuantitativas de los CD existentes según las características clinicobiológicas de la INRG (a partir de la página 191).

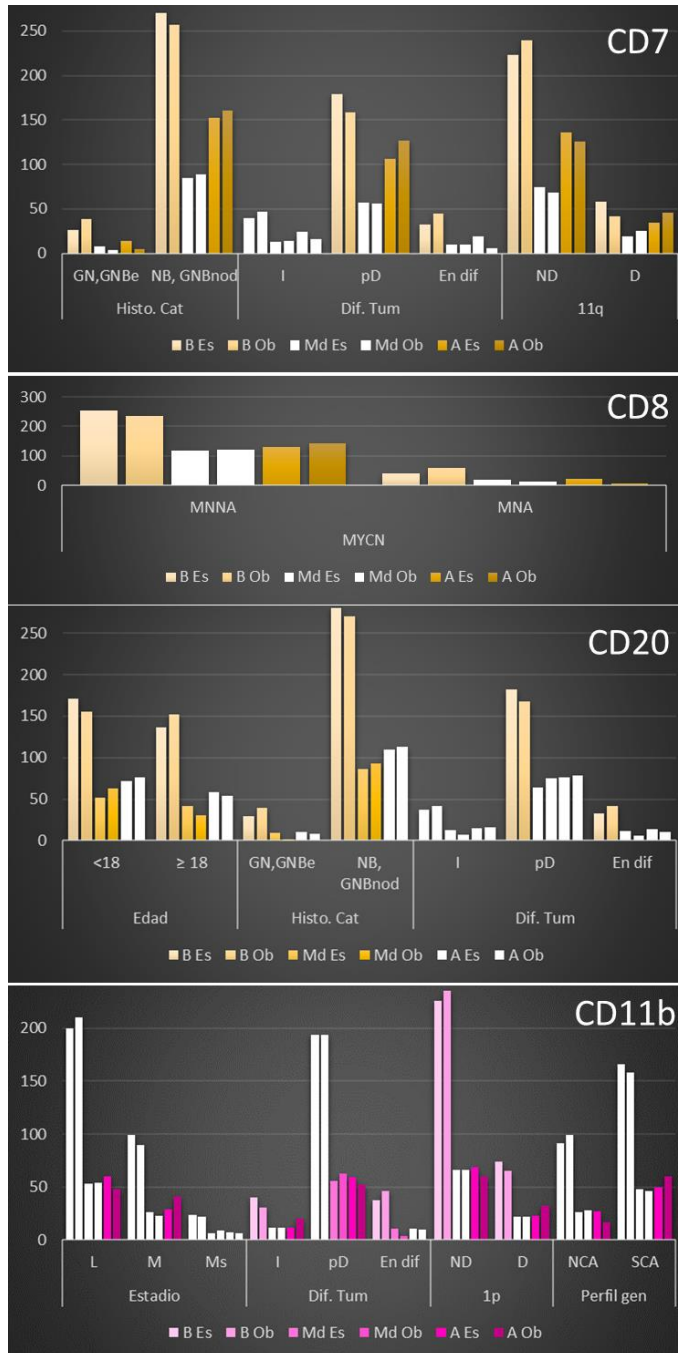


Figura 66. Número de casos esperados y observados en cada rango de CD (linfocitos y CD11b⁺) según los factores INRG. En color las diferencias significativas. Abreviaturas pág. 13.

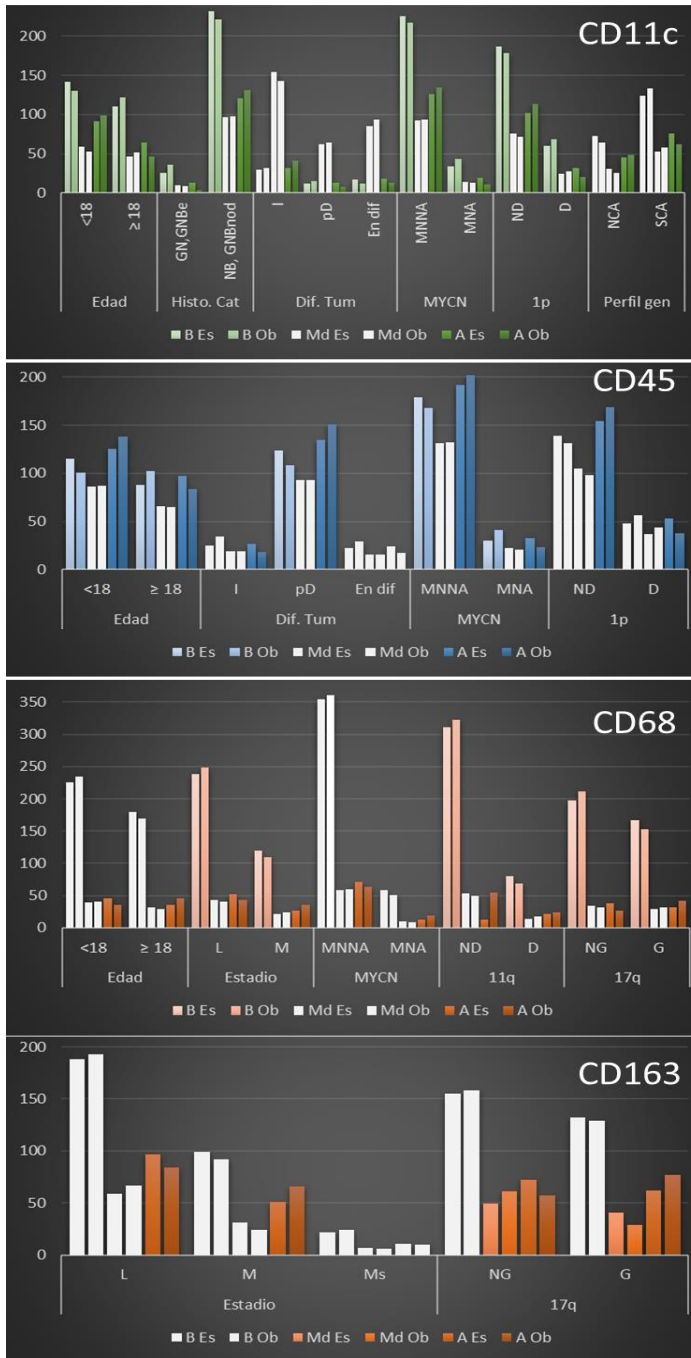


Figura 67. Número de casos esperados y observados en cada rango de CD (CD11c*, CD45* y TAM) según los factores INRG. En color las diferencias significativas. Abreviaturas pág. 13.

Pacientes >18 meses tuvieron menor infiltración CD11c+, CD20+, CD45+ y mayor CD68+ que los <18 meses

En general, se apreció un patrón inmune de menor infiltración para pacientes mayores de 18 meses, con menor cantidad de elementos CD11c+ y CD45+ por unidad de área (variables continuas) (**Figura 64** y **Figura 65**) y menor cantidad de casos con infiltración alta de los esperados (variables rango). También para el marcador CD20 se observó menor cantidad de casos con infiltración media de los esperados en estos pacientes (variable rango) (**Figura 66**). Por otra parte, se vio un patrón de mayor infiltración de la esperada para los elementos CD68+ (variable rango) en pacientes mayores de 18 meses (**Figura 67**). Para la edad, no se observó ninguna diferencia de distribución significativa para las variables subjetivas.

Pacientes con estadio M tuvieron mayor cantidad de elementos CD11b+, CD68+ y CD163+ que en estadios L

En cuanto al estadio de los pacientes, la **Figura 65** muestra una mayor infiltración CD163+ en los tumores de pacientes con estadios M frente a los estadios localizados o a los Ms. Por otra parte, la **Figura 66** y la **Figura 67** nos muestran una mayor cantidad de casos obtenidos con infiltración alta de lo esperado para los marcadores CD11b, CD68 y CD163 en tumores de pacientes con estadios M frente a L. Para el estadio, no se observó ninguna diferencia de distribución significativa para las variables subjetivas.

Pacientes con tumores NB o GNBnod tuvieron mayor infiltración inmune, en general que los GN o GNBe

Se puede ver, tanto con las variables objetivas continuas, como con las variables rango, como los tumores NB o GNB nodulares tienen, en general, mayor infiltración inmune en comparación con los GN o GNB entremezclados. Esto también sucedió para la variable subjetiva del marcador CD8.

Los tumores pD tuvieron mayor infiltración que el resto de tumores en diferenciación o indiferenciados, excepto CD11b⁺ que fue mayor en los indiferenciados.

A la vista de los resultados mostrados en las figuras (**Figura 64** y **Figura 65**), existió, una infiltración CD7⁺ y CD45⁺ mayor en los tumores pD respecto al resto de tumores y una infiltración CD11b⁺ mayor en los tumores I respecto al resto de tumores. Por otra parte, los resultados mostrados en la **Figura 66** y **Figura 67**, indican que se obtuvo un mayor número de casos de con infiltración CD20^{BAJA} de los esperados en tumores en pD respecto a en dif, al contrario que CD11c⁺, que tuvo mayor número de casos CD11c^{ALTA} del esperado en tumores I, frente al resto de tumores. Por último, existió una menor presencia de la esperada de TLO en NB I frente a pD. Finalmente, también resultaron significativos los marcadores CD7 (p-valor=0,041), CD11b (p-valor=0,012) y CD45 (p-valor=0,016), medidos subjetivamente, con la infiltración en el mismo sentido de abundancia que sus variables objetivas continuas.

Tumores con MNA tuvieron menor infiltración CD8⁺, CD11c⁺ y CD45⁺ y mayor CD68⁺ que los MNNA

Se obtuvo menor cantidad de elementos CD8⁺ y CD45⁺ y mayor cantidad de elementos CD68⁺ en tumores MNA (**Figura 64** y **Figura 65**). Y, de manera similar, en tumores MNA, hubo menor número de casos con alta infiltración de los esperados en los marcadores CD8, CD11c y CD45, y mayor número de casos CD68^{ALTA} de los esperados (**Figura 66** y **Figura 67**). Finalmente, también se obtuvieron diferencias de distribución significativas con las variables subjetivas de los marcadores CD7 (p-valor= 0,005), CD8 (p-valor<0,000), CD11b (p-valor= 0,008), CD11c (p-valor=0,027) y CD45 (p-valor=0,008). De manera similar a los resultados presentados, se cuantificó menor infiltración CD7⁺, CD8⁺, CD11c⁺, y mayor infiltración CD11b⁺ en tumores MNA, y menor infiltración CD45^{ALTA} o CD45^{MUY ALTA} en tumores MNA, pero mayor infiltración CD45^{MEDIA} en MNA.

Tumores con la delección del 11q tuvieron mayor infiltración inmune que los 11q no deleccionados

Tumores con la delección del 11q presentaron mayor cantidad de elementos positivos por unidad de área que en tumores no deleccionados en todos los marcadores que resultaron significativos con las variables continuas (**Figura 64** y **Figura 65**). De manera similar en los tumores 11q deleccionados, hubo mayor número de casos con alta infiltración de los esperados en los marcadores CD7 y CD68 (**Figura 66** y **Figura 67**). Finalmente, también se obtuvieron diferencias de distribución significativas con las variables subjetivas de los marcadores CD7 (p-

valor= 0,007) y CD45 (p-valor=0,046). De manera que hubo menor infiltración CD7⁺ y CD45⁺ en los tumores ND.

Tumores con 17q ganado tuvieron mayor infiltración CD7⁺, CD11b⁺, CD68⁺ y CD163⁺ que los 17q sin ganancia

Tumores con ganancia del 17q presentaron mayor cantidad de elementos CD7⁺ y CD68⁺ por unidad de área que los tumores sin la ganancia (**Figura 64** y **Figura 65**). Atendiendo a las variables rango, los tumores con ganancia del 17q tuvieron mayor cantidad de casos de los esperados con alta infiltración para CD68⁺ y CD163⁺, o de infiltración media para el CD163⁺ (**Figura 67**). Finalmente, también se obtuvieron diferencias de distribución significativas con las variables subjetivas de los marcadores CD11b⁺ (p-valor= 0,003) y CD68⁺ (p-valor=0,038). Dándose una menor infiltración de estos dos marcadores en los tumores NG.

Tumores con la delección del 1p tuvieron menor infiltración CD8⁺, CD11c⁺ y CD45⁺ y mayor CD11b⁺ y CD163⁺ que los tumores sin la delección del 1p

Los tumores que presentaron la delección del 1p tuvieron menor número de elementos CD11c⁺ y CD45⁺ y mayor número de elementos CD163⁺ por unidad de área (**Figura 65**). Por otro lado, los tumores con delección del 1p tuvieron mayor cantidad de casos de los esperados en el rango de alta infiltración para CD11b⁺ y menor cantidad para CD11c⁺ y CD45⁺ (**Figura 66** y **Figura 67**). Finalmente, también se obtuvieron

diferencias de distribución significativas con las variables subjetivas de los marcadores CD8⁺ (p-valor= 0,005), CD11b⁺ (p-valor= 0,014) y CD45⁺ (p-valor=0,036). De manera que los tumores D tuvieron menor infiltración CD8⁺ y CD45⁺ y mayor CD11b⁺.

Los tumores con SCA tuvieron más CD11b^{ALTA} y CD11c^{NO ALTA} que los tumores con NCA

Como puede verse en las figuras de las variables rango, en tumores con SCA existió más casos con una infiltración alta de CD11b⁺ y menos casos para CD11c⁺ de los esperados. Además, el marcador CD11b⁺, medido subjetivamente también resultó significativo (p-valor=0,027) y presentó las mismas diferencias de distribución, que con la variable rango.

IV.5.4.2 Patrones celulares inmunes cuantitativos combinados

Tras describir las diferencias de distribución de la infiltración celular positiva de los diferentes marcadores inmunes de manera individual entre los tumores de los pacientes agrupados atendiendo a los factores de riesgo de la clasificación de la INRG, se estudió la posible influencia de patrones resultantes de asociaciones celulares adversas en relación con las características del tumor, o si las características del tumor o del paciente podían estar dirigiendo la distribución conjunta de un infiltrado celular concreto. De esta manera, las tablas: **Tabla 45** a **Tabla 47**, muestran los patrones de infiltrados inmunes encontrados, que pueden presentarse como combinaciones (cuantificadas por cualquiera de los métodos descritos; objetiva continua, rango o subjetiva) o como

marcadores individuales. A continuación, se describen los resultados obtenidos en dichas tablas:

El patrón CD11c^{NO ALTA} y CD68^{ALTA} es más probable en pacientes >18 meses.

Como se muestra en la **Tabla 45**, la edad fue directamente influyente en la cantidad de elementos CD11c⁺ y CD68⁺, de manera que en los pacientes mayores de 18 meses la probabilidad de tener una infiltración CD11c^{ALTA} se redujo en un 70%, mientras que la probabilidad de tener una infiltración CD68^{ALTA} fue el triple, respecto a los menores de 18 meses.

Una infiltración CD11b^{ALTA}CD68^{ALTA} aumenta la probabilidad de tener estadio M frente a L/Ms.

Los resultados referentes al estadio (**Tabla 45**) con las variables objetivas continuas nos señalaron que la probabilidad de presentar estadio M, aumentó un 0,1%, un 0,5% y a casi el doble (un 95%) por cada elemento CD7⁺, CD11b⁺ y CD163⁺ presente en el tumor, respectivamente. El modelo obtenido para las variables CD7 y CD163 no resultó ser de buena calidad, dados sus valores de AUC y S/E. De igual manera, los modelos obtenidos con los marcadores CD11b y CD68 tuvieron AUC cercanos a 0,5 y, por tanto, no tuvieron buena capacidad predictiva. Aun así, la combinación de infiltración alta de ambos marcadores multiplicó por cuatro el riesgo de sufrir M respecto a L/Ms.

Alta infiltración de CD7⁺, CD11c⁺ y CD68⁺ aumentó la probabilidad de tener tumores NB o GNBnod frente a GN o GNBi.

Respecto a los resultados obtenidos referentes a la categoría histológica de los tumores (**Tabla 46**), la presencia de elementos positivos para cualquiera de los marcadores que resultaron significativos (CD7, CD11c y CD68) incrementó la probabilidad de tener un NB o un GNBnod, frente a un GN o GNBi. Sin embargo, el modelo obtenido no tuvo buena calidad, al tener valores AUC cercanos a 0,5 (clasificación azarosa) y subestimar los casos correspondientes a NB indiferenciados, además de tener una N muy sesgada hacia los casos de NB o GNBnod.

Tabla 45. Modelos obtenidos para la edad y el estado.

Factor	CD	Variables	OR (95% IC)	p-valor	AUC	S/E	P.C./E	N
Edad	CD11c			0,001				
	CD11c (Md)		0,83 (0,468-1,472)	0,524				
	CD11c(A)	Modelo con variables objetivas	0,305 (0,165-0,565)	<0,000	E: 0,622 & V: 0,634	E: 63/46 & V: 73/46	0,45	E: 328 & V: 66
	CD68	rango (3 categorías)		0,007				
	CD68 (Md)		1,829 (0,906-3,694)	0,092				
	CD68(A)		2,928 (1,471-5,828)	0,002				
	CD11c ^{BAJA} & CD68 ^{ALTA}	Combinación rangos	2,932 (1,288-6,675)	0,01	E: 0,530 & V: 0,514	E: 9/97 & V: 7/96	0,5	E: 346 & V: 115
	CD7	Obj continua	1,001 (1,000-1,001)	0,031				
	CD11b	Obj continua	1,005 (1,001-1,009)	0,012				
	CD163	Obj rango dicotómica	1,956 (1,248-3,067)	0,003				
Estado	CD11b	Modelo con variables objetivas	1,005 (1,001-1,008)	0,017	0,585	24/89	0,38	318
	CD68	rango (3 categorías)	1,001 (1,000-1,001)	0,078				
	CD7			0,098				
	CD7(Md)		2,05 (0,99-4,26)	0,054				
	CD7(A)	Modelo con variables objetivas	1,64 (0,90-2,99)	0,108	E: 0,581 & V: 0,579	E: 36/78 & V: 41/78	0,3	E: 298 & V: 59
	CD163	rango (3 categorías)		0,009				
	CD163(Md)		0,37 (0,16-0,84)	0,018				
	CD163(A)		1,36 (0,76-2,42)	0,306				
	L/Ms vs M (Ref: M)	Combinación rangos	3,973 (1,333-11,837)	0,013	E: 0,476 & V: 0,475	E: 6/98 & V: 9/96	0,5	22
	L vs M/Ms (Ref: M/Ms)	Modelo con variables objetivas	2,311 (1,266-4,217)	0,006				
	rango (2 categorías)	2,251 (1,179-4,297)	0,014					

P.C: Punto de corte. Resto de abreviaturas en pág. 13.

Tabla 46. Modelos obtenidos para la categoría histológica y el grado de diferenciación de los neuroblastos.

FACTOR	CD	Variables	OR (95% IC)	p-valor	AUC	S/E	P.C. S/E	N
Cat. Histológica	Ref: NB/GNBn od	CD7	Obj continua	1,012 (1,001-1,023)	0,027	-	-	-
		CD11c	Obj continua	1,011 (1,001-1,022)	0,039	-	-	-
		CD68	Obj continua	1,002 (1,000-1,003)	0,018	-	-	-
		CD7 (A)	Modelo con variables objetivas	2,675 (0,892-8,018)	0,079	E: 0,668	E: 47/85	473
		CD11c (A)	rango (2 categorías)	5,363 (1,232-23,339)	0,025	V: 0,661	V: 45/90	473
		CD11b	Obj continua	0,993 (0,989-0,998)	0,003	-	-	-
Grado Dif. Tumoral	Ref: pD	CD8	Modelo con variables objetivas	1,011 (1,001-1,020)	0,025	0,637	29/89	0,88
		CD11b	continuas	0,993 (0,988-0,998)	0,005	-	-	-
		CD45 ^{ALTA} & CD11b ^{BAJA} & CD68 ^{BAJA}	Combinación rangos	2,712 (1,036-7,103)	0,042	-	-	-
		CD11b (A)	Modelo con variables objetivas	0,418 (0,174-1,005)	0,051	-	-	-
		CD45(A)	rango (2 categorías)	2,666 (1,155-6,154)	0,022	-	-	-
		CD68 (A)	rango (2 categorías)	0,397 (0,167-0,940)	0,036	-	-	-

P.C: Punto de corte. Resto de abreviaturas en pág. 13.

Una menor infiltración CD8⁺ y CD45⁺ y mayor de CD11b⁺ y CD68⁺ aumentaron la probabilidad de tener Nb I frente a Nb pD.

A la vista de los resultados obtenidos con el grado de diferenciación de los Nb (**Tabla 46**), se pudo ver como una menor infiltración CD8⁺ y una mayor infiltración CD11b⁺ aumentaron la probabilidad de que los Nb fueran I frente a pD. Esta misma probabilidad también incrementó si la infiltración de CD45⁺ fue baja y la de CD11b⁺ y CD68⁺ alta.

A mayor infiltración CD4⁺ o CD68⁺ y menor CD8⁺ aumenta la probabilidad de tener MNA.

Aunque los modelos mostrados en la **Tabla 47** no tuvieron una gran calidad pronóstica, dados los valores de AUC y S/E, si pudo verse con claridad, como la probabilidad de tener un tumor MNA, frente a MNNA, aumentó un 0,5% por cada elemento CD4⁺, o disminuyó un 1,7% por cada elemento CD8⁺ presente en el tumor. Además, una infiltración CD8^{BAJA}, en combinación con una CD68^{ALTA} multiplicó el triple la probabilidad de que las células tumorales tengan MNA. Si bien el modelo no tiene buena capacidad pronóstica (resultados de AUC y sensibilidad/especificidad no mostrados, por tener valores bajos), si fue significativamente influyente para el estatus del gen *MYCN*.

Tabla 47. Modelos obtenidos para las características genéticas de los tumores.

FACTOR	CD	Variables	OR (95% IC)	p-valor	AUC	S/E	Punto corte S/E	N	
Status MYCV	Ref: MNA	CD8	Obj continua	0,989 (0,981-0,998)	0,011	-	-	-	
		CD4	Modelo con variables objetivas continuas	1,005 (1,001-1,009)	0,023				
		CD8		0,983 (0,974-0,992)	<0,000	0,67	47/73	0,19	325
		CD8				0,002			
		CD8 (Md)		0,479 (0,220-1,043)	0,064				
		CD8 (A)	Modelo con variables objetivas rango (3 categorías)	0,155 (0,052-0,467)	0,001	E: 324 V: 75	-	-	E: 324 V:75
		CD68 (Md)		0,732 (0,239-2,242)	0,585				
CD68 (A)		2,353 (1,070-5,175)	0,033						
	CD8 ^{BAJA} & CD68 ^{ALTA}	Combinación rangos	2,930 (1,311-6,547)	0,009	E: 0,542 V:0,556	E: 14/85 V: 22/89	0,2	E: 352 V:117	
11q	Ref: D	CD7	Obj continua	1,001 (1,000-1,001)	0,019	-	-	-	
		CD45	Obj continua	1,0001 (1,000 -1,001)	0,01	-	-	-	
		CD68	Obj continua	1,001 (1,000-1,001)	0,014	-	-	-	
		CD45 & CD68	Modelo con variables objetivas continuas	1,0001 (1,000-1,001)	0,014	0,586	29/80	0,21	490
17q	Ref: G	CD7	Obj continua	1,001 (1,000-1,001)	0,031	-	-	-	
		CD68	Obj continua	1,001 (1,000-1,001)	0,013	-	-	-	
1p	Ref: D	CD8	Obj continua	0,997 (0,993-0,999)	0,031	-	-	-	
		CD11b	Obj continua	1,004 (1,000-1,009)	0,04	-	-	-	
		CD11c	Obj continua	0,997 (0,994-0,999)	0,024	-	-	-	
		CD7	Modelo con variables objetivas continuas	1,001 (1,000-1,002)	0,009				
		CD8 & CD11b		0,989 (0,983-0,995)	<0,000	0,638	31/85	0,29	260
	CD11c		1,007 (1,003-1,012)	0,002					
Perfil genético	Ref: SCA	CD11c							
		CD11c(Md)			0,016				
		CD11c(A)	Modelo con variables objetivas rango (3 categorías)	1,257 (0,641-2,503)	0,515				
		CD68		0,467 (0,248-0,877)	0,018	-	-	-	E: 256 V:62
		CD68(Md)		1,940 (0,881-4,270)	0,1				
		CD68(A)		2,134 (1,013-4,499)	0,046				
		CD11b ^{ALTA} & CD11c ^{BAJA}	Combinación rangos	2,629 (1,180-5,858)	0,018	E: 0,544 & V: 0,473	E: 15/94 & V:7/88	0,7	E: 270 V:90
CD11b (A)	Modelo con variables objetivas rango (2 categorías)	2,659 (1,206-5,863)	0,015	E: 0,629 & V: 0,562	E: 82/ 36 & V:78/43	0,5	E: 184 V:61		
CD11c (A)		0,484 (0,274-0,855)	0,012						

La presencia de elementos CD7⁺, CD45⁺ y CD68⁺ aumentó el riesgo de presentar delección del 11q.

A la vista de los resultados presentados en la **Tabla 47**, podemos ver como por cada elemento CD7⁺, CD45⁺ y CD68⁺ que se detectó en el

tumor, la probabilidad de tener deleción del 11q, frente a no tenerla, aumentó un 0,1%, 0,01% y un 0,1% respectivamente. Sin embargo, el modelo obtenido para CD45⁺ y CD68⁺ no tuvo buena capacidad pronóstica del estatus del cromosoma 11q, dados sus valores de AUC y S/E.

La presencia de elementos CD7⁺, y CD68⁺ aumentó el riesgo de presentar ganancia del 17q.

La **Tabla 47** muestra como por cada elemento CD7⁺ o CD68⁺ detectado en el tumor, el riesgo de ganancia aumentó en un 0,1%.

La presencia de elementos CD7⁺, y CD11b⁺ junto con la ausencia de CD8⁺ y CD11c⁺ aumentó el riesgo de presentar deleción del 1p.

El modelo que resultó significativo, presentado en la **Tabla 47**, nos indicó que, por cada elemento CD7⁺ y CD11b⁺ presente, la probabilidad de tener deleción del 1p aumentó (OR>1) un 0,1% y un 0,7% respectivamente; mientras que, por cada elemento CD8⁺, presente disminuyó (OR<1) un 1,1%. Este modelo no tuvo buena capacidad pronóstica del estatus del cromosoma 1p, dados sus valores de AUC y S/E. Por otra parte, la ausencia de elementos CD11c⁺ también incrementó el riesgo de tener deleción en un 0,3% por cada elemento CD11c⁺ ausente.

Tener un patrón de infiltración CD11c^{ALTA} y CD68^{NO_ALTA} aumenta la probabilidad de presentar NCA.

La presencia de un perfil genético segmentario estuvo influida por los marcadores CD11c y CD68 en combinación (**Tabla 47**), de manera que una infiltración CD11c^{BAJA}, respecto a CD11c^{ALTA} aumentó el riesgo de que el tumor presentara SCAs en un 54% (0,467), mientras que tener una infiltración CD68^{ALTA} lo aumentó al doble (2,134). No se muestran los valores de AUC (área bajo la curva) ni de S/E (sensibilidad/especificidad) ya que no es un buen modelo predictivo al no clasificar ningún NCA. Por otra parte, la presencia de una infiltración CD11c^{BAJA} también resultó influyente en la presencia de un perfil genético segmentario en combinación con una infiltración CD11^{ALTA}. Cuando se dio esta combinación, el riesgo de presentar SCAs aumentó en 2,6 veces. Resultados muy similares también se obtuvieron para las variables rango dicotómicas (**Tabla 47**).

V. DISCUSIÓN

V.1 La Patología digital

La patología digital es crear, observar, compartir, analizar e interpretar imágenes digitales de preparaciones histológicas estableciendo relaciones con los datos clinicobiológicos. Tiene un amplio campo de aplicación y su adecuada utilización requiere de un equipamiento técnico apropiado, de formación específica del personal y de una estandarización de los procedimientos [214-216]. Respecto al equipamiento técnico, para la digitalización de preparaciones histológicas son necesarios un escáner, que incorpora un microscopio y una cámara digital; ordenadores y software especializados, para crear, manejar y visualizar los archivos de imágenes, y un servidor, para almacenar imágenes y datos [217].

Su uso en el diagnóstico anatomopatológico rutinario, también llamado diagnóstico primario, requiere de una validación en cada centro y una fuerte regulación específica como dispositivo de diagnóstico in vitro (IVD), tanto por parte de la Unión Europea (marcado CE-IVD), como por parte de la *Food and Drug Administration* (FDA) en Estados Unidos [218]. Aunque sólo se lleva a la práctica en algunos países por las ventajas que aporta, en cuanto a la coordinación de equipos/espacios y habilidades de los expertos, y por posibilitar el examen histológico a distancia.

En el campo de la investigación microscópica abre muchas posibilidades, ya que facilita el análisis cuantitativo de biomarcadores, y la evaluación de su poder diagnóstico, pronóstico o predictivo dependerá de las relaciones que se establezcan con los datos clínicos y

patológicos [219]. Para posibilitar que los resultados de este trabajo de investigación puedan tener una aplicación en los pacientes (investigación traslacional), ha sido imprescindible que la cohorte total de pacientes/muestras tumorales analizadas en este trabajo no presentara sesgo en relación con los factores pronósticos de clasificación de la INRG. Por lo tanto, se comprobó que tanto la supervivencia de los pacientes como los diferentes factores de riesgo definidos en la INRG (edad, estadio, categoría histológica, grado de diferenciación tumoral, perfil genético, status de *MYCN* y del 11q, así como los factores genéticos relacionados con 1p y 17q), fueran concordantes con lo descrito en la bibliografía [109, 120, 123]. Únicamente, el factor categoría histológica del tumor, aunque sí mostró su influencia sobre el tiempo de supervivencia, medido como EFS, tan solo mostró una tendencia para la OS (p -valor=0,052). Probablemente, la poca significatividad de este factor en nuestra cohorte sea debida al bajo número de casos GN/GNBe, en comparación con los casos NB o GNBnod.

La gran ventaja del uso de la IHQ en tejidos parafinados para el estudio del infiltrado tisular de células del sistema inmune en el cáncer es la preservación del tejido, de manera que, al tener una histología conservada, es posible el análisis de la morfología, la localización subcelular o la disposición espacial de los diferentes elementos formes del ambiente tumoral [105].

El uso de varios marcadores a la vez [220] o, de manera más sofisticada, el uso de técnicas que consisten en varios ciclos de tinción-digitalización-decoloración con diferentes marcadores en un mismo

corte histológico permiten el análisis de los elementos identificados con múltiples antígenos. [221]. Este trabajo se ha realizado utilizando imágenes microscópicas tras aplicar la técnica inmunohistoquímica en cortes seriados con anticuerpos únicos en cada corte y colocalizando las máscaras o las imágenes segmentadas cuando se ha podido identificar distribuciones de varios antígenos o marcadores.

La IHQ combinada con el uso de TMA, permite homogeneizar las condiciones de tinción en múltiples muestras y, posteriormente, las laminillas pueden ser digitalizadas con facilidad en las mismas condiciones de luz y por el mismo escáner [222], optimizando su posterior análisis digital. La homogeneización de los procesos de la fase preanalítica ha sido aplicada para realizar este estudio, resaltando y corrigiendo las variaciones en los resultados al facilitarse la detección por el análisis de patología digital. A lo largo del presente trabajo sucedieron diferentes complicaciones preanalíticas a las que se les tuvo que dar solución.

La presencia de tinción o pigmento inespecífico, la ausencia de contratinción suficiente, el bajo contraste entre tinción y contratinción o el incompleto procesado de las laminillas durante el escaneo, introducen variables con las que el análisis automático tiene que lidiar. Así, los resultados estadísticos prueban el acierto de la solución dada al problema de la tinción inespecífica (con los marcadores CD11b y CD45) presente en la cohorte anual $\bar{a}1$. Por ejemplo, para la supervivencia de los pacientes se obtuvieron resultados similares, respecto al número de células CD11b⁺ por cualquiera de los métodos de cuantificación (objetivo continuo, rango o subjetivo). La concordancia entre la cuantificación

objetiva y la subjetiva de células CD45⁺ apunta a que la solución dada fue suficiente.

La pérdida parcial de la inmunorreactividad de las muestras tumorales almacenadas en parafina durante largo tiempo, fenómeno descrito previamente [223, 224], se ha detectado al examinar los estadísticos descriptivos de los marcadores CD7, CD11b, CD45, CD68 y CD163. El método usado para realizar las recodificaciones ha sido una transformación lineal (cada dato fue multiplicado por un factor constante) que ha permitido conservar las diferencias de distribución y dispersión entre los datos, no interfiriendo en los tests estadísticos no paramétricos ni en las regresiones logísticas o los análisis de supervivencia.

Las herramientas de análisis digital son cada vez más numerosas y potentes, como consecuencia de la creciente demanda de un método automático objetivo que permita el análisis rápido y efectivo de la ingente cantidad de muestras tumorales que requieren ser analizadas en el diagnóstico clínico rutinario y en la investigación. Las ventajas de estas herramientas, una vez validadas y estandarizadas, son numerosas. Además de la rapidez de análisis de las muestras, también reducen la variabilidad inter e intra-observador (subjetividad) [222, 225]. En la actualidad, existen herramientas de análisis de imagen capaces de mejorar al método manual, en términos de especificidad, sensibilidad y objetividad [103, 104]. Mediante el uso de herramientas de análisis de imagen (software), al término de este estudio, 12.700 imágenes han sido cuantificadas objetivamente. Aproximadamente un 65% de todas estas imágenes (unos 8000 cilindros) han sido analizadas, subjetivamente, al

microscopio óptico con la ayuda de dos patólogos que han requerido más tiempo de análisis que el empleado por el análisis digital. El software de análisis de imagen utilizado (QC, visto con el visor PV) ha proporcionado un abanico de herramientas de pre-procesado de imagen para solucionar diferentes problemas derivados de los procesos preanalíticos inmunohistoquímicos y de digitalización. Las soluciones (totales o parciales) del pre-procesado de imágenes facilitan tanto el diseño de los algoritmos, como la cuantificación de los elementos.

Las variables objetivas continuas de los marcadores inmunes, cuantificadas gracias al software de análisis adaptado a las diversas inmunotinciones, han tenido un alto porcentaje de casos negativos y con infiltración exigua debido a la naturaleza del infiltrado inmune en los TNB. La manera de abordar los análisis estadísticos con estas variables ha tenido que ser a través de su categorización. Aunque existe alguna desventaja de la categorización de variables continuas, puesta de manifiesto por estadísticos, como que estas variables categorizadas son poco informativas en los modelos de regresión, o como la pérdida de información [226, 227], la categorización de variables continuas se realiza en el campo de la medicina de manera generalizada, dada la necesidad existente por clasificar en grupos a los pacientes, a sus tumores o a sus datos clínicos como normal/anormal, maligno/benigno, tratamiento/no tratamiento, etc., además de presentar otras ventajas como simplificar las variables o reducir la variabilidad interobservador [228]. Esta solución también ha probado ser eficiente en nuestro estudio en vista de los resultados obtenidos. Estos resultados, fueron

coincidentes con los obtenidos mediante la cuantificación subjetiva, con lo que se mostró un alto grado de concordancia.

Para implementar las herramientas de análisis digital en el diagnóstico patológico rutinario y en investigación, es necesario validar las herramientas y estandarizar todos los parámetros que intervienen en el análisis [229]. En el linfoma folicular, por ejemplo, se ha realizado recientemente un análisis IHQ cuantitativo con el marcador de linfocitos CD3⁺ mediante herramientas de cuantificación digitales, que fue validado por cuatro patólogos de manera subjetiva, en donde pudo verse un alto grado de concordancia entre esta cuantificación computarizada y el conteo manual (coeficiente de Spearman de 0,96) [230]. En nuestro estudio, además de la validación estadística realizada del análisis computarizado, donde se ha obtenido fuerza estadística, también hemos podido validar el método objetivo en base al método subjetivo comparado los resultados obtenidos, teniendo en cuenta todos los factores que hayan podido influir en el proceso de análisis digital. De esta manera, hemos visto que entre ambos métodos de cuantificación existe una alta sensibilidad, una alta especificidad y una alta correlación entre los casos con mayor positividad.

Tras presentar y argumentar la evaluación y validación de los datos, la aplicación clínica del presente trabajo está en relación con la mejora de la clasificación o estratificación de riesgo pre-tratamiento de la INRG de los pacientes con NB, y la propuesta de definir una subcohorta de riesgo ultra alto de pacientes, como se debate a continuación.

V.2 El estroma inmune de los tumores neuroblásticos: biomarcador pronóstico y terapéutico

En términos generales podemos resumir el papel de la MEC en el destino del tumor de las siguientes maneras:

- 1) Como elemento biotensegral, capaz de ejercer una fuerza física sobre los elementos celulares provocando, en consecuencia, cambios genéticos que comportarán cambios fenotípicos. En este sentido, se ha visto que las alteraciones morfológicas provocadas sobre los TAM por la MEC, contribuyen al cambio fenotípico de los mismos [38].
- 2) Como elemento de andamiaje que facilita o dificulta el paso del infiltrado celular, ya sea inmune o tumoral (metástasis). Mediante técnicas de análisis de imagen, se ha visto que los TAM son capaces de orquestar la disposición y el entrecruzamiento de estas fibras colágenas, especialmente tipo I, VI y XIV, durante el desarrollo del tumor, especialmente en las áreas de invasión de las células tumorales [231]. Pero, también son capaces de degradar estos mismos elementos, mediante la secreción de metaloproteinasas, serina-proteasas o catepsinas [232, 233]. Concretamente en NB, nuestro grupo ha demostrado que una matriz más rígida (con mayor presencia de fibras de colágeno tipo I y III, altamente entrecruzadas) es desfavorable para el pronóstico de los pacientes [186]. Por otra parte, se ha podido comprobar que los TAM tipo M2, son capaces

de generar una red vascular anormal en melanoma de ratón, capaz de favorecer el crecimiento tumoral [191]. Dadas estas evidencias, podemos comprender como los TAM promueven la invasión tumoral y porqué, en nuestra cohorte, se encontró una alta infiltración de las células CD68⁺ y CD163⁺, en pacientes con estadios M frente a L, además de ser relacionadas con un pronóstico desfavorable para los pacientes.

- 3) Como microambiente en el que interactúan todos los elementos celulares y moleculares como las citoquinas, con acciones inmunosupresoras o inmunoactivadoras y que comentaremos a continuación.

Vías de reconocimiento e inmunoescape en los TNB

Se ha descrito que las principales células efectoras del sistema inmune involucradas en el reconocimiento tumoral son los linfocitos T_C CD8⁺, que reconocen los péptidos presentados por las células presentadoras de antígeno a través del complejo HLA I; las células NK, capaces de reconocer ligandos específicos en las membranas de las células diana; y, los linfocitos T_H CD4⁺ junto con los macrófagos, células dendríticas y otros tipos celulares capaces de segregar citoquinas u otros mediadores de la inflamación [90, 91, 202, 234]. La infiltración de buena parte de estas células ha sido estudiada en este trabajo. No obstante, en el crecimiento tumoral también influye el inmunoescape de los Nb, logrado por diferentes vías conocidas que detallaremos a continuación:

- a) Ocultamiento. La expresión de las moléculas de HLA I y II en los Nb son muy bajas o ausentes [235]. Recientemente, se vio que la

expresión de genes como TrkA, que codifica para el receptor de tropomiosina quinasa A, aumentaron la expresión de HLA I y, por tanto, incrementaron la inmunogenicidad al estimular la proliferación de linfocitos T [236]. Estos trabajos explican la baja infiltración observada de linfocitos T (CD4⁺, CD7⁺ y CD8⁺) en nuestra cohorte de estudio.

- b) Tolerancia. Se ha visto que los Nb pueden convivir con los linfocitos T sin consecuencias antitumorales, incluso aunque tengan fenotipos efectores [237]. Estos datos están en consonancia con algunas observaciones realizadas en nuestra cohorte de pacientes, como la mayor cantidad de células CD4⁺ en tumores de pacientes HR. También, se vio una mayor infiltración inmune, tanto de linfocitos como de otros marcadores inmunes, en tumores con delección del 11q o con ganancia del 17q.
- c) Silenciamiento o supresión. A lo largo de la bibliografía encontramos diferentes mecanismos descritos por los cuales los Nb son capaces de silenciar, suprimir o impedir la infiltración linfocítica. Entre los cuales está, la secreción de arginasa II por parte de los Nb [238]. Una enzima capaz de inhibir la actividad linfocítica al provocar un arresto del ciclo celular reduciendo la proliferación y también reduciendo su activación [239, 240]. También, se ha descrito la inhibición de las DC por parte de gangliósidos secretados por los Nb [241], o inhibición de los linfocitos T por galectina-1, secretada por los Nb [242]. Por otro lado, citoquinas como la prostaglandina E₂ (PGE₂), que parece contribuir a todos los *hallmark* del cáncer y que es expresada por

numerosos tipos celulares [243], es capaz de reclutar células CD11b⁺ capaces de silenciar los linfocitos [244]. Finalmente, la presencia de citoquinas secretadas por los Nb, como la citoquina HLA-G, son capaces de obstruir la lisis de los Nb mediada por los linfocitos TC y NK, gracias a la acción de los TAM [162]. Estas evidencias, nos permiten explicar los resultados obtenidos en el presente estudio. En primer lugar, la baja infiltración linfocítica de estos tumores. En segundo lugar, la relación obtenida entre una menor infiltración de células CD11c⁺ con una mayor probabilidad de exitus y menor tiempo de supervivencia de los pacientes. En tercer lugar, en línea con la bibliografía, los pacientes con tumores con una mayor cantidad de células CD11b⁺ tuvieron menores tiempos de supervivencia. En último lugar, los pacientes con tumores con elevadas cantidades de TAM CD68⁺ y CD163⁺ tuvieron mayor probabilidad de exitus y menores tiempos de supervivencia.

- d) Dificultar la infiltración inmune. La molécula PD-L1, expresada por los Nb, es capaz de unirse a su receptor (PD-1) en linfocitos o DC inhibiendo la respuesta inmune no solo en TNB sino en numerosas patologías [245]. Se ha visto que, el bloqueo de la señalización por PD-1, provoca la liberación de IFN— γ , y quimioquinas, por parte de células mieloides (como las DC) capaces de incrementar la infiltración linfocítica [246]. El control de la infiltración linfocítica se ha visto, también, que puede estar influido por la estrecha relación entre la vasculatura y el microambiente tumoral [247], además de por otras células asociadas al tumor, como los TAM o las MDSC, capaces de retener a los linfocitos en los márgenes del tumor e

impedir su infiltración [248]. En nuestra cohorte, los tumores MNA presentaron una infiltración menor de linfocitos CD8⁺ y DC CD11c⁺ que los tumores MNNA, por lo que podemos hipotetizar que este gen es capaz de impedir la infiltración de estas células en el microambiente tumoral. Este supuesto ha sido respaldado por algunos trabajos en los que se vio que la expresión de PD-L1 fue directamente proporcional con la expresión de *MYCN* [249].

- e) Creación de un microambiente tumoral favorable. Recientemente se ha descrito que los Nb son capaces de secretar exosomas capaces de crear un ambiente propicio para el crecimiento tumoral. No obstante, se ha visto que las células inmunes como las NK también pueden secretar exosomas con propiedades antitumorales [250]. Así mismo, ambientes hipóxicos se han asociado a grados de indiferenciación tumoral, tanto en cáncer de mama como en los TNB [251]. La ausencia de linfocitos T CD8⁺ [252] y la presencia células CD11b⁺ [253], indica que las células tumorales no tienen ninguna restricción en ambientes hipóxicos. Nuestros resultados, en los que una menor infiltración de linfocitos CD8⁺ y una mayor infiltración CD11b⁺ están asociadas a NB I, estarían en línea con estos hallazgos.

Prevalencia de la inmunidad innata en pacientes HR y de la inmunidad adaptativa efectora en no HR.

Se ha descrito en modelos de ratón que la inhibición de mediadores de la inmunidad innata como los linfocitos T_H2, las MDSC o los TAM M2 mediante, por ejemplo, pequeñas dosis de aspirina, es capaz de inactivar la ciclooxigenasa 1 y 2, y consecuentemente inhibiendo la

síntesis de PGE₂, reduciendo el crecimiento tumoral y la inflamación protumoral en NB, [254]. En estos estudios, los mediadores de la inmunidad adaptativa, como los linfocitos T_C, están más presentes en estadios tempranos del tumor, siendo superados por los mediadores de la inmunidad innata, incluido el cambio fenotípico de los TAM M1 al M2, a medida que el tumor progresa [254, 255]. Un mediador clave de la inmunidad innata, como son las células NK (marcadas con CD56⁺NKG2D⁺), se ha encontrado en mayor abundancia en TNB de pacientes HR respecto a no HR, reforzando la idea de que la inmunidad innata está más presente en estadios avanzados [256].

Nuestros resultados podrían estar sugiriendo una mayor importancia de la inmunidad adaptativa efectora, linfocitos T CD8⁺ activados por DC, en pacientes de riesgo no alto; mientras que en los pacientes de riesgo alto el patrón sugerente correspondería a la inmunidad innata o a la inmunidad adaptativa reguladora o silenciadora, caracterizada, fundamentalmente, por la mayor presencia de linfocitos T CD4⁺, posiblemente tipo T_{H2}, junto con MDSC CD11b⁺, de TAM (CD68⁺ y CD163⁺), pero, también, como se ha descrito en la bibliografía, las células NK (marcadas con CD7⁺) tendrían mayor importancia. En este sentido, cuanto mayor infiltración CD4⁺ y, fundamentalmente, CD68⁺ presente en el tumor, nuestros datos indican mayor probabilidad de los pacientes de pertenecer a la cohorte HR. En el mismo sentido, una menor presencia de células CD11c⁺ (DC) sumada a una alta infiltración de células CD68⁺ junto con una mayor infiltración de linfocitos T CD7⁺, se asocia a una menor supervivencia de los pacientes y a un riesgo alto. Presentar este patrón de baja infiltración de CD8⁺ y CD11c⁺, junto con

una alta infiltración de CD4⁺ y CD11b⁺ (MDSC) aumenta la probabilidad de pertenecer al grupo HR.

Influencia de la infiltración de TAM en NB

Recientemente se ha demostrado que la presencia de TAM, reclutados y diferenciados en el ambiente tumoral del NB, es capaz de favorecer la proliferación tumoral, en combinación con fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) [257, 258], además de mejorar las habilidades invasivas de las células tumorales, al promover su motilidad, intravasación y extravasación [164, 259]. La razón atribuida a estas observaciones es que los mediadores lipídicos proinflamatorios sintetizados por los CAFs contribuyen al crecimiento tumoral en los HR NB que, por otra parte, tienen una gran infiltración de TAM con fenotipo M2 CD163⁺ [260]. Como hemos descrito en el apartado anterior, pequeñas dosis de aspirina, capaces de bloquear estos mediadores lipídicos inhiben el crecimiento tumoral [255]. Otros estudios también han confirmado una mayor infiltración CD163⁺ en pacientes HR [89, 261]. Concretamente, en tumores con metástasis frente a tumores localizados [261, 262], o en tumores con el 11q deleciónado [260]. La mayor cantidad de células CD163⁺ en estadios M frente a L, o en tumores 11q deleciónados frente a no deleciónados, encontrada en nuestra cohorte, apoyan estas evidencias. En estos estudios también se analizó la expresión génica, encontrándose una mayor expresión de genes relacionados con la inflamación mediada por macrófagos en pacientes >18 meses, y con *MYCN* amplificado [261]. Las observaciones en nuestra cohorte confirman estos hallazgos con el marcador de TAM CD68⁺.

Además, también se ha visto que el número de TAM en tumores MNA aumenta su malignidad [164]. Los modelos de riesgo obtenidos en el presente trabajo para el marcador CD68, que incluyeron la edad (>18 meses), el estadio (M) y el estatus del *MYCN* (amplificado) apoyan estas observaciones.

Además de mejorar las capacidades invasivas de las células tumorales, se ha visto que los TAM CD68⁺ son mediadores en el reclutamiento de los linfocitos T, por ejemplo, en cáncer de mama, donde se ha observado una correlación inversa entre la cantidad de TAM CD68⁺ y linfocitos T CD8⁺ [263]. En otros estudios, como en carcinoma hepatocelular o cáncer de ovario, se ha demostrado que los TAM son capaces de inhibir la proliferación de los linfocitos T CD8⁺ a través del eje PD-1/PD-L1 [264, 265]. En nuestra cohorte, pudimos asociar en tumores MNA y con Nb indiferenciados una alta infiltración de células CD68⁺ junto con una baja infiltración de células CD8⁺, apoyando estas observaciones.

Morfología de las células CD163⁺

La regulación de la expresión génica llevada a cabo por las fuerzas físicas externas, se atribuye tradicionalmente a la interferencia con las adhesiones celulares [266], cambios en la formación del citoesqueleto [180, 267], y cambios en la forma y orientación nuclear [268]. La mecanotransducción, o señalización a través de fuerzas mecánicas, es un importante modulador de forma y función tanto en DC como en macrófagos, ya que son células que, sometidas a diferentes interacciones físicas, reflejan un importante cambio en su función [269].

Concretamente, se han realizado estudios en los que se ha visto que cambios inducidos en la morfología de los macrófagos provocan un cambio en su expresión génica [38, 270]. En estudios comparativos entre las morfologías de los macrófagos M1 y M2, se ha visto que los del tipo M2 (infiltraciones asociadas a mal pronóstico, en vista de nuestros resultados y de acuerdo a la bibliografía) presentan una morfología celular más elongada [38]. Nuestros resultados han confirmado que la morfología de las células CD163⁺ es un importante factor influyente en el tiempo de supervivencia de los pacientes, de manera que una morfología redonda y grande de estas células CD163⁺ disminuye la supervivencia de los pacientes, además de incrementar la probabilidad de los pacientes de pertenecer a la cohorte HR, frente aquellos que tienen células CD163⁺ con morfologías estrelladas y pequeñas. No obstante, hemos de tener en cuenta que, en nuestros análisis, no comparamos macrófagos M1 con M2, sino que estamos describiendo las diferencias morfológicas dentro de los macrófagos CD163⁺ (M2). Un análisis morfológico que, hasta donde conocemos, aún no se ha realizado.

En la actualidad, nuestro grupo está estudiando los contactos entre células con diferentes elementos de la MEC, así como la morfología de los Nb y su posible relación con las características de la MEC. Para ello, utilizamos modelizaciones matemáticas, como la teoría de grafos en combinación con las teselaciones de Voronoi, que nos permiten identificar centros de referencia de cada elemento celular o tisular (grafos) para generar una red de contactos (teselaciones de Voronoi)

que puede ser estudiada. Este método ya ha sido usado para estudiar distrofias musculares y atrofas neurogénicas [271, 272].

Influencia de la infiltración de MDSC en TNB

Como hemos comentado, uno de los principales productos de la inflamación, la PEG₂, promueve la acumulación de las MDSC en el microambiente tumoral [244]. El papel negativo de estas células en los TNB se ha comprendido un poco mejor recientemente, al comprobar su capacidad de secretar ROS, arginasa o TGF- β , [273], potentes mediadores de la inmunosupresión a cargo de las MDSC, como se describió en la introducción [274]. También se ha descrito la implicación negativa de estas células para el pronóstico en pacientes de NB con metástasis, en los que se ha observado una mayor cantidad de células CD11b⁺ en estos tumores, correlacionada con una disminución en la cantidad de linfocitos CD8⁺ respecto a los controles. Esto se ha atribuido a la reducción de la secreción de IFN- γ por parte de estos linfocitos [275]. En estos estudios, se ha observado un efecto anticancerígeno al tratar a los modelos de ratón con polyphenon E, capaz de inhibir a las MDSC y, en consecuencia, incrementar la secreción de IFN- γ , aumentando el número de linfocitos T. Estas observaciones, nos permiten explicar nuestros resultados, en los que la infiltración de las células CD11b⁺ ha sido alta en los tumores de pacientes con corta supervivencia y pertenecientes a la cohorte HR, donde la inmunovigilancia ha sido superada por las células tumorales.

Por otra parte, en cáncer de pulmón se ha observado que la presencia conjunta de TAM y MDSC es capaz de promover la metástasis

y angiogénesis de las células tumorales tras realizarse una esplenectomía [276]. En esta línea, nuestros análisis de regresión nos indican que la elevada presencia de células CD11b⁺ está relacionada con la de TAM CD68⁺, en la generación de metástasis.

Influencia de las DC en TNB

El marcador CD11c, a pesar de ser expresado por otros tipos celulares como macrófagos o eosinófilos intestinales [59, 60], parece ser un buen marcador de DC en el ambiente tumoral, donde, la presencia de macrófagos está conformada principalmente por TAM M2 [23]. También se ha sugerido que este marcador puede detectar células de origen linfoide [277]. En vista de nuestros resultados obtenidos con el marcador CD11c, CD68 y CD163 consideramos que CD11c no está marcando TAM M2, ya que la distribución cuantitativa de las células CD11c⁺ detectadas es totalmente opuesta al de las células CD68⁺ y CD163⁺ (TAM M2). Los resultados de los marcadores de linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺) y B (CD20⁺) tampoco han resultado ser paralelos a los del marcador CD11c, con lo que podemos concluir que las células CD11c⁺ presentes en el ambiente tumoral del TNB son principalmente DC.

La función antitumoral en los TNB de las DC se consigue, principalmente, a través de la activación de los linfocitos, mediante la presentación antigénica por medio del complejo HLA, y de las NK mediante la producción de IFN tipo I [234, 278]. De hecho, en NB, se ha detectado la presencia de células CD11c⁺ en contacto directo con células que expresan mPGES-1, la enzima encargada de sintetizar la PGE₂, con actividad inmunosupresora, juntamente con linfocitos T y B [260]. Lo que

parece indicar, que estas células CD11c⁺ están realizando la presentación antigénica a estos linfocitos para llevar a cabo acciones antitumorales. Nuestros resultados han confirmado que los pacientes con tumores con mayor infiltración celular CD11c⁺ presentan menor riesgo de exitus y mayor tiempo de supervivencia, indicando un papel antitumoral. Así mismo, pudimos determinar que el patrón tumoral con alta infiltración CD11c⁺ junto con baja infiltración CD68⁺ disminuyó la probabilidad del paciente de pertenecer a la cohorte HR. Atendiendo a los análisis de regresión logística binaria, la ausencia de estas células está asociada al estatus del gen *MYCN* amplificado y a la presencia de SCAs. Estas células tendrían, pues, por su función de células presentadoras de antígeno, una influencia positiva para el paciente.

Influencia de los TLO en TNB

En los TNB hay evidencias de que la organización específica en TLO del infiltrado inmune es favorable para el pronóstico de los pacientes [279]. La presencia de TLO en NB se ha descrito en pacientes que presentan el síndrome opsoclono-mioclono [280]. En nuestra cohorte de pacientes HR, se detectó una menor presencia de células CD11c⁺ y de TLO en la subcohorte UHR. Además, la combinación de la presencia de TLO con el status del gen *MYCN* (no amplificado) generó un modelo pronóstico con buena capacidad de clasificación del grupo de pacientes HR. Dada la función de estas estructuras, es decir, la optimización de presentación antigénica por parte de las DC (CD11c⁺) a los linfocitos [95], para maximizar la función inmune adaptativa efectora, no es de extrañar su ausencia en los pacientes UHR. No

obstante, probablemente debido a que la inmunidad adaptativa no parece tener gran influencia en los pacientes HR, la presencia de los TLO no pudo relacionarse significativamente con el tiempo de supervivencia o el riesgo de exitus de los pacientes. Aun así, estos resultados nos indican la importancia de estas estructuras terciarias en el pronóstico de los pacientes HR. En estudios con el virus de influenza en pulmones de ratón, se vio que las DC CD11c⁺ fueron cruciales para el mantenimiento de estas estructuras [281]. Dada la relación tan estrecha entre los resultados obtenidos para los TLO y para las CD11c⁺, podría pensarse que esto también ocurre en NB.

Poca relevancia de los linfocitos B CD20⁺ en TNB

Probablemente, la relevancia de los linfocitos B CD20⁺ en los TNB se limite a los TLO, con un papel favorable para el pronóstico de los pacientes como ya se ha comentado [96]. En otros estudios realizados mediante técnicas con IHQ y análisis de imagen, la presencia de estas células también se limitó a estructuras con acumulaciones de linfocitos B y T, fuera de las cuales no se detectó una presencia relevante de las células CD20⁺ [260]. La poca importancia de estas células en nuestra cohorte de pacientes puede ser debida a la baja expresión de moléculas del complejo de presentación antigénica HLA por parte de los Nb [153]. Nuestros resultados con el marcador CD20, también fueron limitados, encontrándose una mayor infiltración de estos linfocitos en pacientes menores de 18 meses, y con tumores pD frente a tumores en diferenciación.

Influencia de los linfocitos T en TNB

La influencia negativa del infiltrado celular CD4⁺ para el pronóstico de los pacientes, así como la correlación entre el número de células CD4⁺ y los TAM, se ha descrito en numerosos estudios relacionados con el cáncer. En cáncer de ovario, se ha descrito como factor de mal pronóstico un alto número de TAM con una alta infiltración de células FOXP3⁺ (CD4⁺), al ser capaces de inhibir la presentación antigénica de antígenos asociados al tumor por parte de las células presentadoras de antígeno, fundamentalmente DC [282]; por otra parte, en tumores gastrointestinales, se correlacionó una alta infiltración de células CD163⁺ con linfocitos reguladores CD3⁺ FOXP3⁺ (CD4⁺), pero no de linfocitos T_c, indicando que estos macrófagos M2 son capaces de generar linfocitos T supresores [283]. Así mismo, en carcinoma de hígado, se vio como los TAM eran capaces de reclutar células T_H17 CD4⁺, para conservar la inflamación y promover el crecimiento tumoral [284].

En los TNB, el rol protumoral de las células CD4⁺ es debido, en parte, a la secreción de citoquinas protumorales inducidas por estas células como la IL-6 que, consecuentemente, provocan la liberación de ciclooxigenasa y PGE₂ [285]. En nuestra cohorte de estudio, la alta infiltración celular CD4⁺ se relaciona con la agresividad tumoral, ya que una mayor cantidad de estas células aumenta la probabilidad de los pacientes de ser HR (junto con factores ya consolidados como la edad >18 meses de los pacientes, el estadio M y el *MYCN* amplificado de los tumores).

El marcador CD7 constituye uno de los receptores inmunomoduladores más importantes de la galectina-1, siendo imprescindible en el proceso de apoptosis de los linfocitos [204]. La acción de la galectina-1 inhibiendo a los linfocitos T en el microambiente de los TNB ya ha sido comentada [242, 286]. Con estas observaciones podemos explicar cómo una mayor infiltración CD7⁺, además de CD68⁺, aumenta el riesgo de los pacientes de pertenecer a la cohorte HR. Además, una alta infiltración de CD7⁺ junto con una menor infiltración de CD8⁺ y CD11c⁺ disminuyó el tiempo de supervivencia de los pacientes. Sin embargo, dado que este marcador es expresado por gran cantidad de células del linaje de linfocitos T y NK, es difícil realizar hipótesis con estos resultados. Siendo necesaria la ayuda de marcadores adicionales que identifiquen los tipos celulares inmunes con una mayor especificidad.

En los estudios *in vitro* realizados por Sarkar y Nuditen obtuvieron linfocitos T_c CD8⁺ capaces de lisar células MNA, lo que indica que el *MYCN* genera péptidos reconocibles por los linfocitos y, por tanto, pueden ser utilizados como herramientas terapéuticas [287]. A la vista de los resultados obtenidos en nuestra cohorte de pacientes, confirmamos la relación estrecha entre la infiltración de células CD8⁺ y el estatus de *MYCN*. En nuestra cohorte, la presencia de linfocitos T CD8⁺ resultó ser un marcador de buen pronóstico, incrementando el tiempo de supervivencia de los pacientes (junto con una alta infiltración de DC CD11c⁺ y una baja infiltración de linfocitos CD7⁺), y disminuyendo la probabilidad de pertenecer a la cohorte HR. Los resultados de las regresiones logísticas binarias nos indican que existe una relación entre

la alta infiltración CD8⁺ y la baja infiltración CD4⁺ con los TNB MNNA. Con estos resultados, junto con los obtenidos en los tests bivariantes, en los que existe mayor presencia de células que median la inmunidad adaptativa efectora (CD8⁺, CD11c⁺ y CD45⁺) en los tumores MNNA, y una mayor presencia de TAM CD68⁺ en los tumores MNA, podríamos hipotetizar que los Nb con MNA pueden modular y alterar el infiltrado inmune hacia el tipo innato.

Se ha descrito recientemente que, tumores con características inflamatorias, altos niveles de infiltrados macrofágicos M2 CD163⁺, así como de prostaglandina E-sintasa 1 pueden presentarse en pacientes HR con delección del 11q en sus células tumorales [260]. Previamente, ya se había demostrado que la acción de la prostaglandina 2 (PDE₂) puede inhibir la respuesta antitumoral al impedir la maduración de las DC [288, 289], puede inhibir a las células NK, interferir en la acción citolítica de los macrófagos al liberar IL-12, y reclutar a MDSC y linfocitos T_{REG} [290]. Así mismo, en nuestro estudio, tumores con la delección 11q presentaron una mayor infiltración, de prácticamente todos los marcadores inmunes (incluidos CD8⁺ y CD11c⁺), frente a tumores sin delección.

Inmunoterapia

La bibliografía referida y los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten exponer líneas generales de actuación para realizar posibles inmunoterapias en los TNB. De esta manera, para mejorar el pronóstico de los pacientes, proponemos diferentes estrategias a seguir:

1. Modulación del infiltrado de linfocitos T

El hecho de que los Nb tengan una expresión de HLA I disminuida dificulta la aplicación de estas terapias. Sin embargo, diversas estrategias terapéuticas consiguen implantarse con éxito, como, por ejemplo, la autoactivación de los linfocitos T a través de la modificación del receptor de citoquina IL-7 [291]. Una posible acción para promover el infiltrado linfocítico intratumoral y efector es el uso de antagonistas de PD1. El bloqueo de la unión de PD1 (secretado por las propias células tumorales como los Nb y las células circundantes) con su receptor, PDL1 o PDL2 en los linfocitos ha mostrado ser eficiente en terapias contra melanoma, carcinoma renal o cáncer de pulmón [292, 293]. Terapias con anti-PD1 ya están incluso mejorando la eficacia de las terapias convencionales [294]. A través de nuestros resultados, es evidente que incrementar la cantidad de linfocitos CD8⁺ intratumorales, o evitar su inhibición con PD1 es una buena estrategia que mejorará el pronóstico de los pacientes.

2. Activación de las DC CD11c⁺

La acción de las DC en el microambiente tumoral es dependiente del tipo de citoquinas presentes, capaces de inhibir la acción de estas células, como los gangliósidos [241], o como la galectina-1 [295] secretados por los Nb. Las terapias más investigadas con DC consisten en introducir en el microambiente tumoral, mediante vacunas, DC autólogas cargadas con antígenos asociados a los Nb (como MAGE o NY-ESO-1) que, por tanto, no sean sensibles a este microambiente inmunosupresor [296, 297]. Por tanto, únicamente incrementando el

infiltrado intratumoral de estas células, como podríamos concluir de nuestras observaciones, no parece una estrategia que mejore el pronóstico de los pacientes, dada la presencia de este microambiente inmunosupresivo [298].

3. Inmunoterapia anti MDSC CD11b⁺

La terapia PD1/PD-L1 se ha combinado con inhibidores selectivos de las células MDSC (como BLZ945) en humanos y ratones inhibiendo eficientemente la progresión tumoral [299]. Por otro lado, se ha descrito que el uso de inhibidores de las desacetilasas de histonas provoca la creación de un ambiente tumoral permisivo para la acción de los anticuerpos monoclonales usados en la terapia contra los Nb como los anti-GD2, que facilitan la función citotóxica de las células NK contra los Nb [300], al reducir el número y función de las MDSC y aumentar el número de macrófagos efectores [301]. Nuestros resultados apoyan el uso de estas estrategias que inhiban la acción o reduzcan el número de células CD11b⁺ (MDSC), para mejorar el pronóstico de los pacientes.

4. Inmunoterapia con CD68

Como se ha relatado a lo largo del presente trabajo, los TAM de acción antitumoral son aquellos con fenotipo M1, capaces de generar acciones proinflamatorias. Una de las acciones antitumorales de estos TAM M1 es la fagocitosis de las células tumorales, que puede ser activada mediante diversas estrategias, tales como el bloqueo de CD47, una proteína transmembrana asociada a las integrinas, expresada por muchas células tumorales humanas, que es capaz de suprimir la

respuesta macrofágica en glioblastoma multiforme. Esta proteína CD47, funciona como ligando de una proteína inhibidora expresada en la superficie de estos TAM: la SIRP α [302]. En este trabajo, se describe cómo el uso de este tipo de inmunoterapia provocó un aumento en el número de células CD68⁺ y de citoquinas de tipo M1.

Otro hallazgo que indica el papel favorable de las células CD68⁺ lo encontramos en el cáncer colorrectal en estadio III, donde la presencia de estos TAM mejoró la supervivencia de los pacientes sólo si se administraba el neoadyuvante 5-fluorouracilo [303]. En el mismo sentido, en cáncer de mama, la inhibición de GRP78 fue acompañada por un aumento de la cantidad de macrófagos CD68⁺/CD80⁺ con fenotipo M1, con acción antitumoral [304].

Se ha descrito también que la infiltración tumoral de las células CD68⁺ en el pronóstico de algunos pacientes con cáncer puede ser favorable o desfavorable, incluso en pacientes afectados del mismo tipo tumoral o sin presentar ningún tipo de relación. Tumores con linfoma difuso de células B grandes, en el que el uso de inmuno-quimioterapia en tumores con presencia de grandes cantidades de células CD68⁺ infiltrando el tejido tumoral se asocia a un buen pronóstico, mientras que el uso de quimioterapia sólo en estos tumores con grandes cantidades de estas células también se asocia a mal pronóstico [305].

En cáncer de ovario, por ejemplo, el tratamiento quimioterapéutico no produjo cambio cuantitativo del subgrupo de células macrofágicas con capacidad inmunosupresiva, PDL1⁺ CD68⁺ [306]. Por el contrario, las células CD68⁺ también pueden favorecer el crecimiento tumoral al estar

polarizadas hacia el fenotipo M2 (coexpresando CD163⁺ y CD204⁺), como se ha visto en cáncer de riñón y carcinoma renal [307, 308].

En vista de estas evidencias, una estrategia terapéutica que ya está siendo utilizada en diversos tumores es la modulación hacia el fenotipo M1 de los TAM M2. Se ha visto la funcionalidad y eficacia de esta estrategia en el tejido cerebral de un modelo de ratón con isquemia cerebral, en el que los linfocitos CD8⁺ pudieron inducir el cambio fenotípico de los TAM M2 [309].

En cáncer de colon, la proteína quinasa N2 es capaz de inhibir el crecimiento tumoral al inhibir los TAM con fenotipo M2 [310]. La polarización hacia el fenotipo M1 es un proceso del que aún queda mucho por comprender, y en el que pueden participar desde factores como el Fgl2 (proteína derivada del fibrinógeno) [311] a factores epigenéticos como demetilinasas de lisinas de las histonas [312], pero, existen evidencias en los TNB de que la inmunoterapia moduladora de este marcador CD68⁺ puede ser eficaz. De hecho, un reciente estudio en NB, es un ejemplo claro de esta estrategia, en el que células mesenquimales productoras de INF- γ son capaces de polarizar los TAM al subtipo M1 y reducir la proliferación de los neuroblastos in vivo en un modelo de ratón [313].

VI.

CONCLUSIONES

Tras los análisis morfométricos de los linfocitos T y B, las células dendríticas, las células supresoras de origen mieloide y los macrófagos asociados al neuroblastoma, por medio de herramientas de análisis de imagen microscópicas, resaltamos una serie de aspectos técnicos concluyentes en este estudio:

1. La cohorte, que incluye unos 600 tumores primarios, cumplía con los criterios de la INRG (International Neuroblastoma Risk Group), para todos los factores pronósticos independientes establecidos.
2. La subdivisión de la cohorte total de muestras tumorales en cohortes anuales y temporales permitió explicar los sesgos de la investigación. En la cohorte anual tercera había una mayor infiltración de células inmunes al agrupar mayor número de tumores agresivos. El almacenaje de tejido tumoral en cortes parafinados durante 5 años disminuyó la inmunorreactividad de los marcadores celulares CD7, CD45, CD68 y CD163. La transformación lineal de los datos cuantitativos de estos marcadores resultó ser una buena solución ante este problema.
3. Existió una gran correlación entre el análisis digital y el análisis visual al microscopio óptico. El grado de sensibilidad y especificidad de los métodos cuantitativos objetivos semiautomáticos fue mayor al de los métodos manuales.
4. La digitalización de micromatrices de tejido para su análisis digital mediante herramientas de análisis semiautomatizado facilitó el estudio de un gran número de muestras tumorales.
5. La versatilidad del software de análisis de imagen para la cuantificación de elementos marcados con técnicas

inmunohistoquímicas permitió disminuir o solucionar problemas preanalíticos.

Tras relacionar los resultados obtenidos del análisis de imagen microscópica del infiltrado inmune con los factores clínicos y biológicos de los pacientes y sus tumores concluimos que:

1. El infiltrado de las células del sistema inmune, aunque escaso, está relacionado con la muerte y el acortamiento del tiempo de supervivencia global y libre de eventos, siendo la presencia de un patrón definido como con alta infiltración de células CD68⁺ y de baja infiltración de células CD11c⁺ nuestra propuesta de inclusión al modelo para la estratificación terapéutica, especialmente en los pacientes mayores de 18 meses de edad, con estadio metastásico y con células *MYCN* amplificadas.
2. La descripción histológica detallada del infiltrado inmune nos ha permitido asociar una morfología grande y redonda de los macrófagos CD163⁺ que infiltran el tejido tumoral al subgrupo de pacientes con una supervivencia global y libre de eventos del 45% y 55% a los 10 años respectivamente; una morfología pequeña y estrellada al subgrupo de pacientes con supervivencia global y libre de eventos del 80% y 75% a los 10 años respectivamente y una escasa presencia de nódulos linfoides terciarios en los tumores de niños clasificados como de riesgo alto con nefasta evolución (muerte acaecida antes de los 12 meses tras el diagnóstico).
3. El patrón de alta infiltración de macrófagos asociados al tumor CD68⁺ y CD163⁺, independientemente de los factores pronósticos

definidos en la INRG, está presente en el 70% de los pacientes que no sobreviven a los 10 años tras el diagnóstico.

4. Los tumores de pacientes clasificados por la INRG como de riesgo alto de recaída y/o muerte, presentan un patrón de infiltración que sugiere una pobre inmunidad adaptativa efectora, existiendo una escasa presencia de linfocitos T_C CD8⁺ y de células dendríticas CD11c⁺, y un predominio de la inmunidad innata, con una infiltración alta de linfocitos T_H CD4⁺, linfocitos inmaduros CD7⁺, de células supresoras derivadas mieloides CD11b⁺, y de macrófagos asociados a tumores CD68⁺ o CD163⁺.
5. El análisis cuantitativo de marcadores inmunes ha permitido asociar diferencias estadísticas de infiltración celular inmune con características pronósticas independientes conocidas de los tumores. Existe mayor infiltración de linfocitos T CD7⁺ en tumores con neuroblastos pobremente diferenciados, con delección del 11q o ganancia del 17q; una mayor infiltración de linfocitos T CD8⁺ así como una mayor infiltración celular de la serie leucocitaria CD45⁺ en tumores sin amplificación del gen *MYCN*, pero con delección del 11q, en comparación con los tumores que no presentan las características pronósticas enumeradas.

REFERENCIAS

1. Hoshino, K., et al., *Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 3749-52.
2. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
3. Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel, *B-cell biology and development*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(4): p. 959-71.
4. Di Noia, J.M. and M.S. Neuberger, *Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 1-22.
5. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 37-49.
6. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(2): p. 108-17.
7. Cresswell, P., et al., *Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation*. Immunol Rev, 2005. **207**: p. 145-57.
8. Rocha, N. and J. Neefjes, *MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation*. EMBO J, 2008. **27**(1): p. 1-5.
9. Rock, K.L. and L. Shen, *Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance*. Immunol Rev, 2005. **207**: p. 166-83.
10. Virchow, R., *An Address on the Value of Pathological Experiments*. Br Med J, 1881. **2**(1075): p. 198-203.
11. Colotta, F., et al., *Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability*. Carcinogenesis, 2009. **30**(7): p. 1073-81.
12. Mantovani, A., *Cancer: Inflaming metastasis*. Nature, 2009. **457**(7225): p. 36-7.
13. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
14. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
15. Harris, R.E., *Cyclooxygenase-2 (cox-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung*. Inflammopharmacology, 2009. **17**(2): p. 55-67.
16. Cuzick, J., et al., *Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement*. Lancet Oncol, 2009. **10**(5): p. 501-7.

17. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
18. Yadav, D. and A.B. Lowenfels, *The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer*. Gastroenterology, 2013. **144**(6): p. 1252-61.
19. Chang, A.H. and J. Parsonnet, *Role of bacteria in oncogenesis*. Clin Microbiol Rev, 2010. **23**(4): p. 837-57.
20. Borrello, M.G., et al., *Induction of a proinflammatory program in normal human thyrocytes by the RET/PTC1 oncogene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(41): p. 14825-30.
21. Gordon, S. and A. Pluddemann, *Tissue macrophage heterogeneity: issues and prospects*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(5): p. 533-40.
22. Zou, K., et al., *Specific tumor-derived CCL2 mediated by pyruvate kinase M2 in colorectal cancer cells contributes to macrophage recruitment in tumor microenvironment*. Tumour Biol, 2017. **39**(3): p. 1010428317695962.
23. Sica, A., et al., *Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy*. Eur J Cancer, 2006. **42**(6): p. 717-27.
24. Mills, C.D., et al., *M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6166-73.
25. Azambuja, D., et al., *Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical Hodgkin's lymphoma*. Ann Oncol, 2012. **23**(3): p. 736-42.
26. Algars, A., et al., *Type and location of tumor-infiltrating macrophages and lymphatic vessels predict survival of colorectal cancer patients*. Int J Cancer, 2012. **131**(4): p. 864-73.
27. Sica, A., et al., *Macrophage polarization in tumour progression*. Semin Cancer Biol, 2008. **18**(5): p. 349-55.
28. Gordon, S. and F.O. Martinez, *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 593-604.
29. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
30. Pesce, J., et al., *The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 2044-55.

31. Komohara, Y., et al., *AM-3K, an anti-macrophage antibody, recognizes CD163, a molecule associated with an anti-inflammatory macrophage phenotype*. *J Histochem Cytochem*, 2006. **54**(7): p. 763-71.
32. Mantovani, A., et al., *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. *J Pathol*, 2013. **229**(2): p. 176-85.
33. Chen, Y. and X. Zhang, *Pivotal regulators of tissue homeostasis and cancer: macrophages*. *Exp Hematol Oncol*, 2017. **6**: p. 23.
34. Chen, Y., et al., *Tumor-recruited M2 macrophages promote gastric and breast cancer metastasis via M2 macrophage-secreted CHI3L1 protein*. *J Hematol Oncol*, 2017. **10**(1): p. 36.
35. Dave, S.S., et al., *Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(21): p. 2159-69.
36. Heusinkveld, M. and S.H. van der Burg, *Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers*. *J Transl Med*, 2011. **9**: p. 216.
37. Sangaletti, S., et al., *Macrophage-derived SPARC bridges tumor cell-extracellular matrix interactions toward metastasis*. *Cancer Res*, 2008. **68**(21): p. 9050-9.
38. McWhorter, F.Y., et al., *Modulation of macrophage phenotype by cell shape*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(43): p. 17253-8.
39. Malheiro, V., et al., *Convex and concave micro-structured silicone controls the shape, but not the polarization state of human macrophages*. *Biomater Sci*, 2016. **4**(11): p. 1562-1573.
40. Gabilovich, D.I., et al., *The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(1): p. 425; author reply 426.
41. Bronte, V., et al., *Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells*. *Blood*, 2000. **96**(12): p. 3838-46.
42. Yang, G., et al., *Accumulation of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) induced by low levels of IL-6 correlates with poor prognosis in bladder cancer*. *Oncotarget*, 2017. **8**(24): p. 38378-38388.
43. Zea, A.H., et al., *Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion*. *Cancer Res*, 2005. **65**(8): p. 3044-8.

44. Li, H., et al., *Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1*. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 240-9.
45. Schmielau, J. and O.J. Finn, *Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4756-60.
46. Hanson, E.M., et al., *Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 937-44.
47. Sakuishi, K., et al., *Emerging Tim-3 functions in antimicrobial and tumor immunity*. Trends Immunol, 2011. **32**(8): p. 345-9.
48. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 253-68.
49. Serafini, P., et al., *Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells*. Cancer Res, 2008. **68**(13): p. 5439-49.
50. Roca, H., et al., *CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization*. J Biol Chem, 2009. **284**(49): p. 34342-54.
51. Sinha, P., et al., *Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 977-83.
52. Sinha, P., et al., *Myeloid-derived suppressor cells express the death receptor Fas and apoptose in response to T cell-expressed FasL*. Blood, 2011. **117**(20): p. 5381-90.
53. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
54. Gabrilovich, D., *Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(12): p. 941-52.
55. Krempski, J., et al., *Tumor-infiltrating programmed death receptor-1+ dendritic cells mediate immune suppression in ovarian cancer*. J Immunol, 2011. **186**(12): p. 6905-13.
56. Alamino, V.A., et al., *Antitumor Responses Stimulated by Dendritic Cells Are Improved by Triiodothyronine Binding to the Thyroid Hormone Receptor beta*. Cancer Res, 2015. **75**(7): p. 1265-74.

57. Fujii, S.I. and K. Shimizu, *Exploiting Antitumor Immunotherapeutic Novel Strategies by Deciphering the Cross Talk between Invariant NKT Cells and Dendritic Cells*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 886.
58. Spranger, S., et al., *Density of immunogenic antigens does not explain the presence or absence of the T-cell-inflamed tumor microenvironment in melanoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(48): p. E7759-E7768.
59. Pabst, O. and G. Bernhardt, *The puzzle of intestinal lamina propria dendritic cells and macrophages*. Eur J Immunol, 2010. **40**(8): p. 2107-11.
60. Bain, C.C. and A.M. Mowat, *The monocyte-macrophage axis in the intestine*. Cell Immunol, 2014. **291**(1-2): p. 41-8.
61. Guillemins, M., et al., *Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(8): p. 571-8.
62. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
63. McGranahan, N. and C. Swanton, *Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future*. Cell, 2017. **168**(4): p. 613-628.
64. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
65. Tan, A.H., et al., *T helper cell-specific regulation of inducible costimulator expression via distinct mechanisms mediated by T-bet and GATA-3*. J Biol Chem, 2008. **283**(1): p. 128-36.
66. Kaech, S.M. and W. Cui, *Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(11): p. 749-61.
67. Gray, S.M., S.M. Kaech, and M.M. Staron, *The interface between transcriptional and epigenetic control of effector and memory CD8(+) T-cell differentiation*. Immunol Rev, 2014. **261**(1): p. 157-68.
68. Bretscher, P. and M. Cohn, *A theory of self-nonsel self discrimination*. Science, 1970. **169**(3950): p. 1042-9.
69. Wells, A.C., et al., *Modulation of let-7 miRNAs controls the differentiation of effector CD8 T cells*. Elife, 2017. **6**.

70. Janeway, C.A., Jr. and K. Bottomly, *Signals and signs for lymphocyte responses*. Cell, 1994. **76**(2): p. 275-85.
71. Bevan, M.J., *Helping the CD8(+) T-cell response*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(8): p. 595-602.
72. Keir, M.E., L.M. Francisco, and A.H. Sharpe, *PD-1 and its ligands in T-cell immunity*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 309-14.
73. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 677-704.
74. Matsuzaki, J., et al., *Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(17): p. 7875-80.
75. Curtsinger, J.M., et al., *Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3256-62.
76. Thaïss, C.A., et al., *Chemokines: a new dendritic cell signal for T cell activation*. Front Immunol, 2011. **2**: p. 31.
77. Meiraz, A., et al., *Switch from perforin-expressing to perforin-deficient CD8(+) T cells accounts for two distinct types of effector cytotoxic T lymphocytes in vivo*. Immunology, 2009. **128**(1): p. 69-82.
78. Su, M.W., et al., *Fratricide of CD8+ cytotoxic T lymphocytes is dependent on cellular activation and perforin-mediated killing*. Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2459-70.
79. Zitvogel, L., et al., *Type I interferons in anticancer immunity*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(7): p. 405-14.
80. Dudley, M.E., et al., *Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes*. Science, 2002. **298**(5594): p. 850-4.
81. Stanton, S.E. and M.L. Disis, *Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer*. J Immunother Cancer, 2016. **4**: p. 59.
82. Boon, T., et al., *Human T cell responses against melanoma*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 175-208.
83. Pernot, S., et al., *Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(14): p. 3738-50.
84. Amedei, A., E. Niccolai, and D. Prisco, *Pancreatic cancer: role of the immune system in cancer progression and vaccine-based*

- immunotherapy*. Hum Vaccin Immunother, 2014. **10**(11): p. 3354-68.
85. Leon, F., et al., *Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes*. Gastroenterology, 2003. **125**(2): p. 345-56.
86. Berzofsky, J.A. and M. Terabe, *The contrasting roles of NKT cells in tumor immunity*. Curr Mol Med, 2009. **9**(6): p. 667-72.
87. Kronenberg, M. and L. Gapin, *The unconventional lifestyle of NKT cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 557-68.
88. Swann, J.B., et al., *CD1-restricted T cells and tumor immunity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2007. **314**: p. 293-323.
89. Song, L., et al., *Valpha24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1524-36.
90. O'Sullivan, T., et al., *Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity*. J Exp Med, 2012. **209**(10): p. 1869-82.
91. Semeraro, M., et al., *Natural killer cell mediated immunosurveillance of pediatric neuroblastoma*. Oncoimmunology, 2015. **4**(11): p. e1042202.
92. Eivazi, S., et al., *Development of T follicular helper cells and their role in disease and immune system*. Biomed Pharmacother, 2016. **84**: p. 1668-1678.
93. Mou, W., et al., *gammadeltaTFH cells promote B cell maturation and antibody production in neuroblastoma*. BMC Immunol, 2017. **18**(1): p. 36.
94. Brandes, M., et al., *Flexible migration program regulates gamma delta T-cell involvement in humoral immunity*. Blood, 2003. **102**(10): p. 3693-701.
95. Neyt, K., et al., *Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity*. Trends Immunol, 2012. **33**(6): p. 297-305.
96. Germain, C., S. Gnjatic, and M.C. Dieu-Nosjean, *Tertiary Lymphoid Structure-Associated B Cells are Key Players in Anti-Tumor Immunity*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 67.
97. Cummings, M., et al., *Gene expression of ERbeta isoforms in laser microdissected human breast cancers: implications for gene expression analyses*. Cell Oncol, 2009. **31**(6): p. 467-73.
98. Bouchie, A., *Coming soon: a global grid for cancer research*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(9): p. 1071-3.

99. de Jong, D., et al., *Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications (a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium)*. J Clin Pathol, 2009. **62**(2): p. 128-38.
100. Allott, E.H., et al., *Intratumoral heterogeneity as a source of discordance in breast cancer biomarker classification*. Breast Cancer Res, 2016. **18**(1): p. 68.
101. Dolled-Filhart, M., et al., *Automated analysis of tissue microarrays*. Methods Mol Biol, 2010. **664**: p. 151-62.
102. Gavrielides, M.A., et al., *Observer variability in the interpretation of HER2/neu immunohistochemical expression with unaided and computer-aided digital microscopy*. Arch Pathol Lab Med, 2011. **135**(2): p. 233-42.
103. Feuchtinger, A., et al., *Image analysis of immunohistochemistry is superior to visual scoring as shown for patient outcome of esophageal adenocarcinoma*. Histochem Cell Biol, 2015. **143**(1): p. 1-9.
104. Stalhammar, G., et al., *Digital image analysis outperforms manual biomarker assessment in breast cancer*. Mod Pathol, 2016. **29**(4): p. 318-29.
105. Heindl, A., S. Nawaz, and Y. Yuan, *Mapping spatial heterogeneity in the tumor microenvironment: a new era for digital pathology*. Lab Invest, 2015. **95**(4): p. 377-84.
106. Csikasz-Nagy, A., et al., *Cooperation and competition in the dynamics of tissue architecture during homeostasis and tumorigenesis*. Semin Cancer Biol, 2013. **23**(4): p. 293-8.
107. Halama, N., et al., *Estimation of immune cell densities in immune cell conglomerates: an approach for high-throughput quantification*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7847.
108. Tafavogh, S., et al., *Non-parametric and integrated framework for segmenting and counting neuroblastic cells within neuroblastoma tumor images*. Med Biol Eng Comput, 2013. **51**(6): p. 645-55.
109. Cohn, S.L., et al., *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report*. J Clin Oncol, 2009. **27**(2): p. 289-97.
110. Maris, J.M., et al., *Neuroblastoma*. Lancet, 2007. **369**(9579): p. 2106-20.

111. Peris-Bonet R, F.S., Valero S, Pardo E, C. *Cáncer infantil en España. Estadísticas 1980-2014. Registro Español de Tumores Infantiles (RETI-SEHOP)*. Valencia, Spain: Universitat de València. 2015;Edición preliminar. 2015.
112. Mora, J. and W.L. Gerald, *Origin of neuroblastic tumors: clues for future therapeutics*. *Expert Rev Mol Diagn*, 2004. **4**(3): p. 293-302.
113. De Preter, K., et al., *Human fetal neuroblast and neuroblastoma transcriptome analysis confirms neuroblast origin and highlights neuroblastoma candidate genes*. *Genome Biol*, 2006. **7**(9): p. R84.
114. Betters, E., et al., *Analysis of early human neural crest development*. *Dev Biol*, 2010. **344**(2): p. 578-92.
115. Mosse, Y.P., et al., *Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene*. *Nature*, 2008. **455**(7215): p. 930-5.
116. Brodeur, G.M., et al., *Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment*. *J Clin Oncol*, 1993. **11**(8): p. 1466-77.
117. Ambros, P.F., et al., *International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee*. *Br J Cancer*, 2009. **100**(9): p. 1471-82.
118. Berbegall, A.P., S. Navarro, and R. Noguera, *Diagnostic implications of intrapatient genetic tumor heterogeneity*. *Mol Cell Oncol*, 2016. **3**(2): p. e1079671.
119. Brisse, H.J., et al., *Guidelines for imaging and staging of neuroblastic tumors: consensus report from the International Neuroblastoma Risk Group Project*. *Radiology*, 2011. **261**(1): p. 243-57.
120. Monclair, T., et al., *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(2): p. 298-303.
121. London, W.B., 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**(27): p. 6459-65.
122. Shimada, H., et al., *Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas*. *J Natl Cancer Inst*, 1984. **73**(2): p. 405-16.

123. Shimada, H., et al., *The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system)*. Cancer, 1999. **86**(2): p. 364-72.
124. Ruiz-Perez, M.V., A.B. Henley, and M. Arsenian-Henriksson, *The MYCN Protein in Health and Disease*. Genes (Basel), 2017. **8**(4).
125. Brodeur, G.M., *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 203-16.
126. Seeger, R.C., et al., *Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas*. N Engl J Med, 1985. **313**(18): p. 1111-6.
127. Cecchetto, G., et al., *Surgical risk factors in primary surgery for localized neuroblastoma: the LNESG1 study of the European International Society of Pediatric Oncology Neuroblastoma Group*. J Clin Oncol, 2005. **23**(33): p. 8483-9.
128. Guo, C., et al., *Deletion of 11q23 is a frequent event in the evolution of MYCN single-copy high-risk neuroblastomas*. Med Pediatr Oncol, 2000. **35**(6): p. 544-6.
129. Villamon, E., et al., *Genetic instability and intratumoral heterogeneity in neuroblastoma with MYCN amplification plus 11q deletion*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53740.
130. Caren, H., et al., *High-risk neuroblastoma tumors with 11q-deletion display a poor prognostic, chromosome instability phenotype with later onset*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(9): p. 4323-8.
131. Look, A.T., 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**(4): p. 581-91.
132. Ladenstein, R., et al., *Prognostic significance of DNA ditetraploidy in neuroblastoma*. Med Pediatr Oncol, 2001. **36**(1): p. 83-92.
133. George, R.E., et al., *Hyperdiploidy plus nonamplified MYCN confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study*. J Clin Oncol, 2005. **23**(27): p. 6466-73.
134. Kaneko, Y. and A.G. Knudson, *Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. **29**(2): p. 89-95.
135. Domingo-Fernandez, R., et al., *The role of genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma disease pathogenesis*. Pediatr Surg Int, 2013. **29**(2): p. 101-19.

136. Schleiermacher, G., et al., *Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project*. Br J Cancer, 2012. **107**(8): p. 1418-22.
137. Bosse, K.R. and J.M. Maris, *Advances in the translational genomics of neuroblastoma: From improving risk stratification and revealing novel biology to identifying actionable genomic alterations*. Cancer, 2016. **122**(1): p. 20-33.
138. Bown, N., et al., *17q gain in neuroblastoma predicts adverse clinical outcome. U.K. Cancer Cytogenetics Group and the U.K. Children's Cancer Study Group*. Med Pediatr Oncol, 2001. **36**(1): p. 14-9.
139. Maris, J.M., et al., *Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study*. J Clin Oncol, 2000. **18**(9): p. 1888-99.
140. Schleiermacher, G., et al., *Segmental chromosomal alterations lead to a higher risk of relapse in infants with MYCN-non-amplified localised unresectable/disseminated neuroblastoma (a SIOPEN collaborative study)*. Br J Cancer, 2011. **105**(12): p. 1940-8.
141. Valentijn, L.J., et al., *TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors*. Nat Genet, 2015. **47**(12): p. 1411-4.
142. Peifer, M., et al., *Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma*. Nature, 2015. **526**(7575): p. 700-4.
143. Amorim, J.P., et al., *The Role of ATRX in the Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) Phenotype*. Genes (Basel), 2016. **7**(9).
144. Eleveld, T.F., et al., *Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations*. Nat Genet, 2015. **47**(8): p. 864-71.
145. Salazar, B.M., et al., *Neuroblastoma, a Paradigm for Big Data Science in Pediatric Oncology*. Int J Mol Sci, 2016. **18**(1).
146. Molenaar, J.J., et al., *LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression*. Nat Genet, 2012. **44**(11): p. 1199-206.
147. Molenaar, J.J., et al., *Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes*. Nature, 2012. **483**(7391): p. 589-93.

148. Bill, A.H. and A. Morgan, *Evidence for immune reactions to neuroblastoma and future possibilities for investigation*. J Pediatr Surg, 1970. **5**(2): p. 111-6.
149. Squire, R., et al., *The relationship of class I MHC antigen expression to stage IV-S disease and survival in neuroblastoma*. J Pediatr Surg, 1990. **25**(4): p. 381-6.
150. Coughlin, C.M., et al., *Immunosurveillance and survivin-specific T-cell immunity in children with high-risk neuroblastoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(36): p. 5725-34.
151. Yang, X., et al., *Induction of caspase 8 by interferon gamma renders some neuroblastoma (NB) cells sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) but reveals that a lack of membrane TR1/TR2 also contributes to TRAIL resistance in NB*. Cancer Res, 2003. **63**(5): p. 1122-9.
152. Fulda, S. and K.M. Debatin, *5-Aza-2'-deoxycytidine and IFN-gamma cooperate to sensitize for TRAIL-induced apoptosis by upregulating caspase-8*. Oncogene, 2006. **25**(37): p. 5125-33.
153. Raffaghello, L., et al., *Multiple defects of the antigen-processing machinery components in human neuroblastoma: immunotherapeutic implications*. Oncogene, 2005. **24**(29): p. 4634-44.
154. Corrias, M.V., et al., *Expression of MAGE-1, MAGE-3 and MART-1 genes in neuroblastoma*. Int J Cancer, 1996. **69**(5): p. 403-7.
155. Cheung, I.Y., D. Barber, and N.K. Cheung, *Detection of microscopic neuroblastoma in marrow by histology, immunocytology, and reverse transcription-PCR of multiple molecular markers*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(11): p. 2801-5.
156. Soling, A., P. Schurr, and F. Berthold, *Expression and clinical relevance of NY-ESO-1, MAGE-1 and MAGE-3 in neuroblastoma*. Anticancer Res, 1999. **19**(3B): p. 2205-9.
157. Rodolfo, M., et al., *Antigen-specific immunity in neuroblastoma patients: antibody and T-cell recognition of NY-ESO-1 tumor antigen*. Cancer Res, 2003. **63**(20): p. 6948-55.
158. Main, E.K., et al., *Human neuroblastoma cell lines are susceptible to lysis by natural killer cells but not by cytotoxic T lymphocytes*. J Immunol, 1985. **135**(1): p. 242-6.
159. Wolf, M., et al., *Expression of MHC class I, MHC class II, and cancer germline antigens in neuroblastoma*. Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(4): p. 400-6.

160. Raffaghello, L., et al., *Mechanisms of immune evasion of human neuroblastoma*. *Cancer Lett*, 2005. **228**(1-2): p. 155-61.
161. Gross, N., et al., *Expression of Fas (APO-1/CD95) and Fas ligand (FasL) in human neuroblastoma*. *Med Pediatr Oncol*, 2001. **36**(1): p. 111-4.
162. Morandi, F., et al., *Human neuroblastoma cells trigger an immunosuppressive program in monocytes by stimulating soluble HLA-G release*. *Cancer Res*, 2007. **67**(13): p. 6433-41.
163. Vakkila, J., et al., *Pediatric cancers are infiltrated predominantly by macrophages and contain a paucity of dendritic cells: a major nosologic difference with adult tumors*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(7 Pt 1): p. 2049-54.
164. Hashimoto, O., et al., *Collaboration of cancer-associated fibroblasts and tumour-associated macrophages for neuroblastoma development*. *J Pathol*, 2016. **240**(2): p. 211-23.
165. Chen, X., et al., *Neuroblastoma cells inhibit the immunostimulatory function of dendritic cells*. *J Pediatr Surg*, 2003. **38**(6): p. 901-5.
166. Lam, W.A., et al., *Extracellular matrix rigidity modulates neuroblastoma cell differentiation and N-myc expression*. *Mol Cancer*, 2010. **9**: p. 35.
167. Li, G.N., et al., *Genomic and morphological changes of neuroblastoma cells in response to three-dimensional matrices*. *Tissue Eng*, 2007. **13**(5): p. 1035-47.
168. Fuller, R., *Tensegrity*. *Portfolio Art News Ann*, 1961. **4**: p. 112-27.
169. Ingber, D.E., *The architecture of life*. *Sci Am*, 1998. **278**(1): p. 48-57.
170. Ingber, D.E., *Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro*. *Prog Biophys Mol Biol*, 2008. **97**(2-3): p. 163-79.
171. Galli, C., et al., *Life on the wire: on tensegrity and force balance in cells*. *Acta Biomed*, 2005. **76**(1): p. 5-12.
172. Hu, S., J. Chen, and N. Wang, *Cell spreading controls balance of prestress by microtubules and extracellular matrix*. *Front Biosci*, 2004. **9**: p. 2177-82.
173. Stamenovic, D., et al., *Cell prestress. II. Contribution of microtubules*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **282**(3): p. C617-24.
174. Ingber, D.E., *Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 7): p. 1157-73.

175. Ross, T.D., et al., *Integrins in mechanotransduction*. *Curr Opin Cell Biol*, 2013. **25**(5): p. 613-8.
176. Noguera, R., et al., *Extracellular matrix, biotensegrity and tumor microenvironment. An update and overview*. *Histol Histopathol*, 2012. **27**(6): p. 693-705.
177. Huang, C., et al., *Biological effects of cellular stretch on human dermal fibroblasts*. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2013. **66**(12): p. e351-61.
178. Lovett, D.B., et al., *Modulation of Nuclear Shape by Substrate Rigidity*. *Cell Mol Bioeng*, 2013. **6**(2): p. 230-238.
179. Mierke, C.T., *Physical break-down of the classical view on cancer cell invasion and metastasis*. *Eur J Cell Biol*, 2013. **92**(3): p. 89-104.
180. Tadeo, I., et al., *Biotensegrity of the extracellular matrix: physiology, dynamic mechanical balance, and implications in oncology and mechanotherapy*. *Front Oncol*, 2014. **4**: p. 39.
181. Hoyt, K., et al., *Tissue elasticity properties as biomarkers for prostate cancer*. *Cancer Biomark*, 2008. **4**(4-5): p. 213-25.
182. Nahon, P., et al., *Liver stiffness measurement in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a case-control study*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009. **21**(2): p. 214-9.
183. Iglesias-Garcia, J., et al., *Quantitative elastography associated with endoscopic ultrasound for the diagnosis of chronic pancreatitis*. *Endoscopy*, 2013. **45**(10): p. 781-8.
184. Egeblad, M., M.G. Rasch, and V.M. Weaver, *Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(5): p. 697-706.
185. Seewaldt, V., *ECM stiffness paves the way for tumor cells*. *Nat Med*, 2014. **20**(4): p. 332-3.
186. Tadeo, I., et al., *A stiff extracellular matrix is associated with malignancy in peripheral neuroblastic tumors*. *Pediatr Blood Cancer*, 2017. **64**(9).
187. Tadeo, I., et al., *1p36 deletion results in a decrease in glycosaminoglycans which is associated with aggressiveness in neuroblastic tumors*. *Histol Histopathol*, 2017: p. 11947.
188. Su, Z., et al., *Neurocan, an extracellular chondroitin sulfate proteoglycan, stimulates neuroblastoma cells to promote malignant phenotypes*. *Oncotarget*, 2017. **8**(63): p. 106296-106310.

189. Hughes, V.S., J.M. Wiggins, and D.W. Siemann, *Tumor oxygenation and cancer therapy-then and now*. Br J Radiol, 2018: p. 20170955.
190. Agarwal, S., A. Singh, and P.K. Bagga, *Immunohistochemical evaluation of lymphovascular invasion in carcinoma breast with CD34 and D2-40 and its correlation with other prognostic markers*. Indian J Pathol Microbiol, 2018. **61**(1): p. 39-44.
191. Jarosz-Biej, M., et al., *M1-like macrophages change tumor blood vessels and microenvironment in murine melanoma*. PLoS One, 2018. **13**(1): p. e0191012.
192. Tadeo, I., et al., *Vascular patterns provide therapeutic targets in aggressive neuroblastic tumors*. Oncotarget, 2016. **7**(15): p. 19935-47.
193. Piqueras Franco, M., *Utilidad de las matrices de tejidos para la detección mediante hibridación in situ fluorescente de alteraciones genéticas con valor pronóstico en el neuroblastoma*. Facultat de Medicina i Odontologia. Universitat de Valencia, 2009.
194. Tadeo Cervera, I., *Estudio del armazón arquitectónico y del sistema vascular de los tumores neuroblásticos*. Facultat de Medicina i Odontologia. Universitat de Valencia, 2015.
195. Villamon, E., et al., *NeuPAT: an intranet database supporting translational research in neuroblastic tumors*. Comput Biol Med, 2013. **43**(3): p. 219-28.
196. Brodeur, G.M., et al., *International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma*. J Clin Oncol, 1988. **6**(12): p. 1874-81.
197. Ambros, I.M., et al., *Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification*. J Clin Oncol, 2003. **21**(11): p. 2077-84.
198. Piqueras, M., et al., *How to minimise the effect of tumour cell content in detection of aberrant genetic markers in neuroblastoma*. Br J Cancer, 2011. **105**(1): p. 89-92.
199. Hebron, H.R., Y. Yang, and J. Hang, *Purification of genomic DNA with minimal contamination of proteins*. J Biomol Tech, 2009. **20**(5): p. 278-81.
200. Ambros, I.M., et al., *A multilocus technique for risk evaluation of patients with neuroblastoma*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(4): p. 792-804.
201. Yamamoto, G., et al., *Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor*

- specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. Am J Hum Genet, 2007. 81(1): p. 114-26.*
202. Takeuchi, A. and T. Saito, *CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4+ T Cells, Their Differentiation and Function. Front Immunol, 2017. 8: p. 194.*
203. Yoshikawa, K., et al., *Molecular cloning of the gene coding for the human T cell differentiation antigen CD7. Immunogenetics, 1991. 33(5-6): p. 352-60.*
204. Stillwell, R. and B.E. Bierer, *T cell signal transduction and the role of CD7 in costimulation. Immunol Res, 2001. 24(1): p. 31-52.*
205. Gao, G.F. and B.K. Jakobsen, *Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. Immunol Today, 2000. 21(12): p. 630-6.*
206. Cragg, M.S., et al., *The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. Curr Dir Autoimmun, 2005. 8: p. 140-74.*
207. Solovjov, D.A., E. Pluskota, and E.F. Plow, *Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. J Biol Chem, 2005. 280(2): p. 1336-45.*
208. Corbi, A.L., J. Garcia-Aguilar, and T.A. Springer, *Genomic structure of an integrin alpha subunit, the leukocyte p150,95 molecule. J Biol Chem, 1990. 265(5): p. 2782-8.*
209. Rees, J., et al., *Characterisation of monoclonal antibodies specific for hamster leukocyte differentiation molecules. Vet Immunol Immunopathol, 2017. 183: p. 40-44.*
210. Micklem, K., et al., *A human macrophage-associated antigen (CD68) detected by six different monoclonal antibodies. Br J Haematol, 1989. 73(1): p. 6-11.*
211. Moestrup, S.K. and H.J. Moller, *CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. Ann Med, 2004. 36(5): p. 347-54.*
212. McCarty, K.S., Jr., et al., *Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. Cancer Res, 1986. 46(8 Suppl): p. 4244s-4248s.*
213. Rizzardi, A.E., et al., *Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. Diagn Pathol, 2012. 7: p. 42.*

214. Garcia Rojo, M., *State of the art and trends for digital pathology*. Stud Health Technol Inform, 2012. **179**: p. 15-28.
215. Garcia-Rojo, M., *International Clinical Guidelines for the Adoption of Digital Pathology: A Review of Technical Aspects*. Pathobiology, 2016. **83**(2-3): p. 99-109.
216. Hanna, M.G., L. Pantanowitz, and A.J. Evans, *Overview of contemporary guidelines in digital pathology: what is available in 2015 and what still needs to be addressed?* J Clin Pathol, 2015. **68**(7): p. 499-505.
217. Pantanowitz, L., et al., *Review of the current state of whole slide imaging in pathology*. J Pathol Inform, 2011. **2**: p. 36.
218. Abels, E. and L. Pantanowitz, *Current State of the Regulatory Trajectory for Whole Slide Imaging Devices in the USA*. J Pathol Inform, 2017. **8**: p. 23.
219. Bueno, G., et al., *New Trends of Emerging Technologies in Digital Pathology*. Pathobiology, 2016. **83**(2-3): p. 61-9.
220. Bauman, T.M., et al., *Quantitation of Protein Expression and Co-localization Using Multiplexed Immuno-histochemical Staining and Multispectral Imaging*. J Vis Exp, 2016(110).
221. Remark, R., et al., *In-depth tissue profiling using multiplexed immunohistochemical consecutive staining on single slide*. Sci Immunol, 2016. **1**(1): p. aaf6925.
222. Rojo, M.G., G. Bueno, and J. Slodkowska, *Review of imaging solutions for integrated quantitative immunohistochemistry in the Pathology daily practice*. Folia Histochem Cytobiol, 2009. **47**(3): p. 349-54.
223. Grillo, F., et al., *Factors affecting immunoreactivity in long-term storage of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections*. Histochem Cell Biol, 2015. **144**(1): p. 93-9.
224. Economou, M., et al., *Proper paraffin slide storage is crucial for translational research projects involving immunohistochemistry stains*. Clin Transl Med, 2014. **3**(1): p. 4.
225. Callau, C., et al., *Evaluation of cytokeratin-19 in breast cancer tissue samples: a comparison of automatic and manual evaluations of scanned tissue microarray cylinders*. Biomed Eng Online, 2015. **14 Suppl 2**: p. S2.
226. Naggara, O., et al., *Analysis by categorizing or dichotomizing continuous variables is inadvisable: an example from the natural history of unruptured aneurysms*. AJNR Am J Neuroradiol, 2011. **32**(3): p. 437-40.

227. Royston, P., D.G. Altman, and W. Sauerbrei, *Dichotomizing continuous predictors in multiple regression: a bad idea*. Stat Med, 2006. **25**(1): p. 127-41.
228. Caille, A., C. Leyrat, and B. Giraudeau, *Dichotomizing a continuous outcome in cluster randomized trials: impact on power*. Stat Med, 2012. **31**(24): p. 2822-32.
229. Peck, A.R., et al., *Validation of tumor protein marker quantification by two independent automated immunofluorescence image analysis platforms*. Mod Pathol, 2016. **29**(10): p. 1143-54.
230. Abas, F.S., et al., *Computer-assisted quantification of CD3+ T cells in follicular lymphoma*. Cytometry A, 2017. **91**(6): p. 609-621.
231. Afik, R., et al., *Tumor macrophages are pivotal constructors of tumor collagenous matrix*. J Exp Med, 2016. **213**(11): p. 2315-2331.
232. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell, 2010. **141**(1): p. 52-67.
233. Mason, S.D. and J.A. Joyce, *Proteolytic networks in cancer*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(4): p. 228-37.
234. Zhen, Z., et al., *HLA-E inhibitor enhances the killing of neuroblastoma stem cells by co-cultured dendritic cells and cytokine-induced killer cells loaded with membrane-based microparticles*. Am J Cancer Res, 2017. **7**(2): p. 334-345.
235. Lampson, L.A., C.A. Fisher, and J.P. Whelan, *Striking paucity of HLA-A, B, C and beta 2-microglobulin on human neuroblastoma cell lines*. J Immunol, 1983. **130**(5): p. 2471-8.
236. Pajtler, K.W., et al., *Expression of NTRK1/TrkA affects immunogenicity of neuroblastoma cells*. Int J Cancer, 2013. **133**(4): p. 908-19.
237. Carlson, L.M., et al., *The microenvironment of human neuroblastoma supports the activation of tumor-associated T lymphocytes*. Oncoimmunology, 2013. **2**(3): p. e23618.
238. Mussai, F., et al., *Neuroblastoma Arginase Activity Creates an Immunosuppressive Microenvironment That Impairs Autologous and Engineered Immunity*. Cancer Res, 2015. **75**(15): p. 3043-53.
239. Zea, A.H., et al., *L-Arginine modulates CD3zeta expression and T cell function in activated human T lymphocytes*. Cell Immunol, 2004. **232**(1-2): p. 21-31.

240. Rodriguez, P.C., D.G. Quiceno, and A.C. Ochoa, *L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression*. *Blood*, 2007. **109**(4): p. 1568-73.
241. Shurin, G.V., et al., *Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function*. *Cancer Res*, 2001. **61**(1): p. 363-9.
242. Buchel, G., et al., *Immune response modulation by Galectin-1 in a transgenic model of neuroblastoma*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(5): p. e1131378.
243. Greenhough, A., et al., *The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment*. *Carcinogenesis*, 2009. **30**(3): p. 377-86.
244. Sinha, P., et al., *Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(9): p. 4507-13.
245. Majzner, R.G., et al., *Assessment of programmed death-ligand 1 expression and tumor-associated immune cells in pediatric cancer tissues*. *Cancer*, 2017. **123**(19): p. 3807-3815.
246. Eissler, N., et al., *Regulation of myeloid cells by activated T cells determines the efficacy of PD-1 blockade*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(12): p. e1232222.
247. Peske, J.D., A.B. Woods, and V.H. Engelhard, *Control of CD8 T-Cell Infiltration into Tumors by Vasculature and Microenvironment*. *Adv Cancer Res*, 2015. **128**: p. 263-307.
248. Boissonnas, A., et al., *CD8+ tumor-infiltrating T cells are trapped in the tumor-dendritic cell network*. *Neoplasia*, 2013. **15**(1): p. 85-94.
249. Melaiu, O., et al., *PD-L1 Is a Therapeutic Target of the Bromodomain Inhibitor JQ1 and, Combined with HLA Class I, a Promising Prognostic Biomarker in Neuroblastoma*. *Clin Cancer Res*, 2017. **23**(15): p. 4462-4472.
250. Shoaee-Hassani, A., et al., *NK Cell-derived Exosomes From NK Cells Previously Exposed to Neuroblastoma Cells Augment the Antitumor Activity of Cytokine-activated NK Cells*. *J Immunother*, 2017. **40**(7): p. 265-276.
251. Axelson, H., et al., *Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells--a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors*. *Semin Cell Dev Biol*, 2005. **16**(4-5): p. 554-63.

252. Vuillefroy de Silly, R., P.Y. Dietrich, and P.R. Walker, *Hypoxia and antitumor CD8+ T cells: An incompatible alliance?* Oncoimmunology, 2016. **5**(12): p. e1232236.
253. Cahayani, W.A., et al., *Increased CD11b and Hypoxia-Inducible Factors-1alpha Expressions in the Lung Tissue and Surfactant Protein-D Levels in Serum Are Related with Acute Lung Injury in Severe Malaria of C57BL/6 Mice.* Iran J Parasitol, 2016. **11**(3): p. 303-315.
254. Carlson, L.M. and P. Kogner, *Neuroblastoma-related inflammation: May small doses of aspirin be suitable for small cancer patients?* Oncoimmunology, 2013. **2**(7): p. e24658.
255. Carlson, L.M., et al., *Low-dose aspirin delays an inflammatory tumor progression in vivo in a transgenic mouse model of neuroblastoma.* Carcinogenesis, 2013. **34**(5): p. 1081-8.
256. Gowda, M., et al., *Distinct signatures of the immune responses in low risk versus high risk neuroblastoma.* J Transl Med, 2011. **9**: p. 170.
257. Komohara, Y. and M. Takeya, *CAFs and TAM: maestros of the tumour microenvironment.* J Pathol, 2017. **241**(3): p. 313-315.
258. Braekeveldt, N., et al., *Neuroblastoma patient-derived orthotopic xenografts reflect the microenvironmental hallmarks of aggressive patient tumours.* Cancer Lett, 2016. **375**(2): p. 384-389.
259. Noy, R. and J.W. Pollard, *Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy.* Immunity, 2014. **41**(1): p. 49-61.
260. Larsson, K., et al., *COX/mPGES-1/PGE2 pathway depicts an inflammatory-dependent high-risk neuroblastoma subset.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(26): p. 8070-5.
261. Asgharzadeh, S., et al., *Clinical significance of tumor-associated inflammatory cells in metastatic neuroblastoma.* J Clin Oncol, 2012. **30**(28): p. 3525-32.
262. Pistoia, V., et al., *Immunosuppressive microenvironment in neuroblastoma.* Front Oncol, 2013. **3**: p. 167.
263. DeNardo, D.G., et al., *Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy.* Cancer Discov, 2011. **1**(1): p. 54-67.
264. Kryczek, I., et al., *B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma.* J Exp Med, 2006. **203**(4): p. 871-81.

265. Kuang, D.M., et al., *Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1*. J Exp Med, 2009. **206**(6): p. 1327-37.
266. Teo, B.K., et al., *Nanotopography modulates mechanotransduction of stem cells and induces differentiation through focal adhesion kinase*. ACS Nano, 2013. **7**(6): p. 4785-98.
267. McMurray, R.J., et al., *Surface topography regulates wnt signaling through control of primary cilia structure in mesenchymal stem cells*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 3545.
268. McKee, C.T., et al., *Topographic modulation of the orientation and shape of cell nuclei and their influence on the measured elastic modulus of epithelial cells*. Biophys J, 2011. **101**(9): p. 2139-46.
269. Mennens, S.F.B., K. van den Dries, and A. Cambi, *Role for Mechanotransduction in Macrophage and Dendritic Cell Immunobiology*. Results Probl Cell Differ, 2017. **62**: p. 209-242.
270. Paul, N.E., et al., *Topographical control of human macrophages by a regularly microstructured polyvinylidene fluoride surface*. Biomaterials, 2008. **29**(30): p. 4056-64.
271. Raj, A., A. Kuceyeski, and M. Weiner, *A network diffusion model of disease progression in dementia*. Neuron, 2012. **73**(6): p. 1204-15.
272. Saez, A., et al., *Quantifiable diagnosis of muscular dystrophies and neurogenic atrophies through network analysis*. BMC Med, 2013. **11**: p. 77.
273. Bianchi, G., et al., *ATP/P2X7 axis modulates myeloid-derived suppressor cell functions in neuroblastoma microenvironment*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1135.
274. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
275. Santilli, G., et al., *Polyphenon [corrected] E enhances the antitumor immune response in neuroblastoma by inactivating myeloid suppressor cells*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(5): p. 1116-25.
276. Sevmis, M., et al., *Splenectomy-Induced Leukocytosis Promotes Intratumoral Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells, Angiogenesis and Metastasis*. Immunol Invest, 2017. **46**(7): p. 663-676.

277. Satpathy, A.T., et al., *Re(de)fining the dendritic cell lineage*. Nat Immunol, 2012. **13**(12): p. 1145-54.
278. Cordeau, M., et al., *Efficient Killing of High Risk Neuroblastoma Using Natural Killer Cells Activated by Plasmacytoid Dendritic Cells*. PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0164401.
279. Mina, M., et al., *Tumor-infiltrating T lymphocytes improve clinical outcome of therapy-resistant neuroblastoma*. Oncoimmunology, 2015. **4**(9): p. e1019981.
280. Raffaghello, L., et al., *Immunological mechanisms in opsoclonus-myoclonus associated neuroblastoma*. Eur J Paediatr Neurol, 2009. **13**(3): p. 219-23.
281. GeurtsvanKessel, C.H., et al., *Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus-infected mice*. J Exp Med, 2009. **206**(11): p. 2339-49.
282. Kryczek, I., et al., *Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8900-5.
283. van Dongen, M., et al., *Anti-inflammatory M2 type macrophages characterize metastasized and tyrosine kinase inhibitor-treated gastrointestinal stromal tumors*. Int J Cancer, 2010. **127**(4): p. 899-909.
284. Kuang, D.M., et al., *Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma promote expansion of memory T helper 17 cells*. Hepatology, 2010. **51**(1): p. 154-64.
285. Ara, T., et al., *Interleukin-6 in the bone marrow microenvironment promotes the growth and survival of neuroblastoma cells*. Cancer Res, 2009. **69**(1): p. 329-37.
286. Batzke, K., et al., *TrkB-Target Galectin-1 Impairs Immune Activation and Radiation Responses in Neuroblastoma: Implications for Tumour Therapy*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(3).
287. Sarkar, A.K. and J.G. Nuchtern, *Lysis of MYCN-amplified neuroblastoma cells by MYCN peptide-specific cytotoxic T lymphocytes*. Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 1908-13.
288. Ahmadi, M., D.C. Emery, and D.J. Morgan, *Prevention of both direct and cross-priming of antitumor CD8+ T-cell responses following overproduction of prostaglandin E2 by tumor cells in vivo*. Cancer Res, 2008. **68**(18): p. 7520-9.
289. Wang, D. and R.N. Dubois, *Eicosanoids and cancer*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(3): p. 181-93.

290. Kalinski, P., *Regulation of immune responses by prostaglandin E2*. J Immunol, 2012. **188**(1): p. 21-8.
291. Shum, T., et al., *Constitutive Signaling from an Engineered IL7 Receptor Promotes Durable Tumor Elimination by Tumor-Redirected T Cells*. Cancer Discov, 2017.
292. Nallasamy, P., et al., *PD-L1, inflammation, non-coding RNAs, and neuroblastoma: Immuno-oncology perspective*. Semin Cancer Biol, 2017.
293. Xu, J., et al., *Current status and future prospects of the strategy of combining CART with PD1 blockade for antitumor therapy (Review)*. Mol Med Rep, 2018. **17**(2): p. 2083-2088.
294. Aspeslagh, S., et al., *In the immuno-oncology era, is anti-PD-1 or anti-PD-L1 immunotherapy modifying the sensitivity to conventional cancer therapies?* Eur J Cancer, 2017. **87**: p. 65-74.
295. Soldati, R., et al., *Neuroblastoma triggers an immunoevasive program involving galectin-1-dependent modulation of T cell and dendritic cell compartments*. Int J Cancer, 2012. **131**(5): p. 1131-41.
296. Krishnadas, D.K., et al., *A phase I trial combining decitabine/dendritic cell vaccine targeting MAGE-A1, MAGE-A3 and NY-ESO-1 for children with relapsed or therapy-refractory neuroblastoma and sarcoma*. Cancer Immunol Immunother, 2015. **64**(10): p. 1251-60.
297. Morandi, F., et al., *Tumor mRNA-transfected dendritic cells stimulate the generation of CTL that recognize neuroblastoma-associated antigens and kill tumor cells: immunotherapeutic implications*. Neoplasia, 2006. **8**(10): p. 833-42.
298. Seeger, R.C., *Immunology and immunotherapy of neuroblastoma*. Semin Cancer Biol, 2011. **21**(4): p. 229-37.
299. Mao, Y., et al., *Targeting Suppressive Myeloid Cells Potentiates Checkpoint Inhibitors to Control Spontaneous Neuroblastoma*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(15): p. 3849-59.
300. Erbe, A.K., et al., *Neuroblastoma Patients' KIR and KIR-ligand Genotypes Influence Clinical Outcome for Dinutuximab-based Immunotherapy: A Report from the Children's Oncology Group*. Clin Cancer Res, 2017.
301. Kroesen, M., et al., *Anti-GD2 mAb and Vorinostat synergize in the treatment of neuroblastoma*. Oncoimmunology, 2016. **5**(6): p. e1164919.

302. Zhu, H., et al., *Surgical debulking promotes recruitment of macrophages and triggers glioblastoma phagocytosis in combination with CD47 blocking immunotherapy*. *Oncotarget*, 2017. **8**(7): p. 12145-12157.
303. Malesci, A., et al., *Tumor-associated macrophages and response to 5-fluorouracil adjuvant therapy in stage III colorectal cancer*. *Oncoimmunology*, 2017. **6**(12): p. e1342918.
304. Soto-Pantoja, D.R., et al., *Unfolded protein response signaling impacts macrophage polarity to modulate breast cancer cell clearance and melanoma immune checkpoint therapy responsiveness*. *Oncotarget*, 2017. **8**(46): p. 80545-80559.
305. Riihijarvi, S., et al., *Prognostic influence of macrophages in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a correlative study from a Nordic phase II trial*. *Haematologica*, 2015. **100**(2): p. 238-45.
306. Lo, C.S., et al., *Neoadjuvant Chemotherapy of Ovarian Cancer Results in Three Patterns of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Response with Distinct Implications for Immunotherapy*. *Clin Cancer Res*, 2017. **23**(4): p. 925-934.
307. Komohara, Y., et al., *Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma*. *Cancer Sci*, 2011. **102**(7): p. 1424-31.
308. Kovaleva, O.V., et al., *Tumor Associated Macrophages in Kidney Cancer*. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2016. **2016**: p. 9307549.
309. Boddaert, J., et al., *CD8 signaling in microglia/macrophage M1 polarization in a rat model of cerebral ischemia*. *PLoS One*, 2018. **13**(1): p. e0186937.
310. Cheng, Y., et al., *PKN2 in colon cancer cells inhibits M2 phenotype polarization of tumor-associated macrophages via regulating DUSP6-Erk1/2 pathway*. *Mol Cancer*, 2018. **17**(1): p. 13.
311. Zhu, Y., et al., *Control of Intestinal Inflammation, Colitis-Associated Tumorigenesis, and Macrophage Polarization by Fibrinogen-Like Protein 2*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 87.
312. Wang, X., et al., *Identification of the histone lysine demethylase KDM4A/JMJD2A as a novel epigenetic target in M1 macrophage polarization induced by oxidized LDL*. *Oncotarget*, 2017. **8**(70): p. 114442-114456.
313. Relation, T., et al., *Intratatumoral Delivery of Interferon gamma-secreting MSCs Repolarizes Tumor-Associated Macrophages and*

Suppresses Neuroblastoma Proliferation In Vivo. Stem Cells, 2018.

ANEXOS

Anexo 1. Configuración de los algoritmos utilizados con el software Panoramic Viewer (3D Histech Ltd.)

Parámetros		MQ					NQ		
		CD4/CD8/ CD11b/CD11c	CD7	CD20	CD45	Parámetros	CD68	CD163	
Color	R	177	177	177	177	162	162		
	G	140	140	140	140	128	128		
	B	143	143	143	143	123	123		
Forma	R	77	77	77	77	89	89		
	G	107	107	107	107	109	109		
	B	150	150	150	150	187	187		
Forma	Redondez	4	6	6	4	Redondez nuclear	8		
						Circularidad nuclear min	30		
Tamaño	Membranas en contacto	Área (µm ²) min	10	10	5	Radio nuclear (µm)	5-15		
	Filtro	Rango de área (µm ²)	10-500	10-500	5-500	Área min nuclear (µm ²)	6		
Intensidad	Membranas en contacto	Borde <	178	200	178	Contraste mínimo	2		
	Filtro	Rango de media	0-178	0-220	0-178	Intensidad mínima	10		
Clasificación células positivas	1+ Intensidad media 2+ min Intensidad media 3+ min	Resto de membranas positivas					Intensidad media 1+ min	170	
		170	180	170	170	Intensidad media 2+ min	150		
		120	140	120	120	Intensidad media 3+ min	130		

Se muestran los valores de los parámetros divididos en dos módulos, atendiendo a la localización del antígeno: módulo de membrana, MembraneQuant (MQ), y módulo nuclear: NuclearQuant (NQ). (1+) intensidad de tinción baja. (2+) intensidad de tinción media. (3+) intensidad de tinción alta. Mínimo (min) Resto de abreviaturas en pág. 13.

Anexo 2. Estadísticos descriptivos del marcador CD4⁺.

CD4	COHORTE	C. Diag. Anual.			C. Proc. Mat.		
OBJETIVO CONTINUO	TOTAL	ā1	ā2	ā3	T1	T2	T3
Validos	579	389	148	42	268	108	203
Positivos	371	238	99	34	142	84	145
Media	34	31	29	71	12	66	37
Desv estándar	96	87	69	182	37	132	106
Mínimo	1	1	1	1	1	1	1
Máximo	841	573	417	841	309	573	841
1	2	2	2	5	2	3	2
Cuartiles (Q)	2	5	5	4	10	4	10
3	15	14	15	50	10	41	17
Negativos	208	151	49	8	126	24	58
%+	64	61	67	81	53	78	71
Perdidos	39	31	7	1	14	17	8
OBJETIVO RANGO	C. TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
Validos	579	389	148	42	268	108	203
Positivos:	146	87	39	20	41	43	62
1 (moderada: 8 a 25)	84	52	23	9	29	20	35
2 (alta: ≥26)	62	35	16	11	12	23	27
0 (negat y débil: 0 a 7)	433	302	109	22	227	65	141
%+	25	22	26	48	15	40	31
Perdidos	39	31	7	1	14	17	8
SUBJETIVO	C. TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
Validos	422	232	148	42	161	59	202
Positivos:	115	47	45	23	23	21	71
1	84	28	38	18	18	7	59
2	23	14	6	3	5	9	9
3	8	5	1	2	0	5	3
Negativos	307	185	103	19	138	38	131
%+	27	20	30	55	14	36	35
Perdidos	25	17	7	1	10	6	9

Abreviaturas pág. 13.

Anexo 3. Estadísticos descriptivos del marcador CD7*.

CD7	COHORTE	C. Diag. Anual.			C. Proc. Mat.		
OBJETIVO CONTINUO	TOTAL	ā1	ā2	ā3	T1	T2	T3
Validos	574	381	151	42	261	107	206
Positivos	461	281	145	35	185	85	191
Media	135	117	151	208	19	20	162
Desv estándar	421	452	366	377	71	56	365
Mínimo	1	5	1	1	1	1	1
Máximo	5453	5453	2363	1588	813	380	2363
Cuartiles (Q)							
1	10	10	9	14	2	2	10
2	24	19	46	50	3	5	47
3	82	58	117	126	10	12	120
Negativos	113	100	6	7	76	22	15
%+	80	74	96	83	71	79	93
Perdidos	44	39	4	1	21	18	5
OBJETIVO RANGO	C. TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
Validos	574	381	151	42	261	107	206
Positivos:	273	153	95	25	90	52	131
1 (moderada: 19 a 47)	97	66	24	7	42	24	31
2 (alta: ≥48)	176	87	71	18	48	28	100
0 (negat y débil: 0 a 18)	301	228	56	17	171	55	75
%+	48	40	63	60	34	49	64
Perdidos	44	39	4	1	21	18	5
SUBJETIVO	C. TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
Validos	406	215	150	41	153	49	204
Positivos:	208	71	111	26	44	16	148
1	151	48	87	16	29	11	111
2	46	17	19	10	10	4	32
3	11	6	5	0	5	1	5
Negativos	198	144	39	15	109	33	56
%+	51	33	74	63	29	33	73
Perdidos	41	34	5	2	18	16	7

Abreviaturas pág. 13.

Anexo 4. Estadísticos descriptivos del marcador CD8⁺.

CD8	COHORTE	C. Diag. Anual.			C. Proc. Mat.		
OBJETIVO CONTINUO	TOTAL	ā1	ā2	ā3	T1	T2	T3
Validos	586	401	148	37	269	120	197
Positivos	519	356	132	31	233	114	172
Media	67	68	63	83	60	86	65
Desv estándar	178	199	114	141	214	173	117
Mínimo	1	1	1	1	1	1	1
Máximo	2185	2185	810	711	2185	1152	810
1	7	6	6	13	5	7	8
Cuartiles (Q)							
2	21	20	26	38	20	23	27
3	58	55	61	84	50	76	63
Negativos	67	45	16	6	36	6	25
%+	89	89	89	84	87	95	87
Perdidos	32	19	7	6	13	5	14
OBJETIVO RANGO	C. TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
Validos	586	401	148	37	269	120	197
Positivos:	288	187	81	20	121	63	104
1 (moderada: 18 a 50)	136	89	40	7	64	23	49
2 (alta: ≥51)	152	98	41	13	57	40	55
0 (negat y débil: 0 a 17)	298	214	67	17	148	57	93
%+	49	47	55	54	45	53	53
Perdidos	32	19	7	6	13	5	14
SUBJETIVO	C. TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
Validos	414	232	147	35	159	61	194
Positivos:	286	138	120	28	80	52	154
1	185	68	100	17	30	33	122
2	72	45	18	9	33	11	28
3	29	25	2	2	17	8	4
Negativos	128	94	27	7	79	9	40
%+	69	59	82	80	50	85	79
Perdidos	33	17	8	8	12	4	17

Abreviaturas pág. 13.

Anexo 5. Estadísticos descriptivos del marcador CD20*.

CD20	COHORTE	C. Diag. Anual.			C. Proc. Mat.		
OBJETIVO CONTINUO	TOTAL	ā1	ā2	ā3	T1	T2	T3
Validos	543	355	149	39	234	108	201
Positivos	417	289	100	28	181	96	140
Media	149	169	115	66	148	223	100
Desv estándar	619	715	340	109	586	945	293
Mínimo	1	1	1	1	1	1	1
Máximo	8680	8680	3072	475	4949	8680	3072
1	3	3	3	4	3	4	3
Cuartiles (Q)	2	13	11	23	11	12	23
3	60	53	81	71	51	54	72
Negativos	126	66	49	11	53	12	61
%+	77	81	67	72	77	89	70
Perdidos	75	65	6	4	48	17	10
OBJETIVO RANGO	C. TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
Validos	543	355	149	39	234	108	201
Positivos:	228	154	60	14	93	53	82
1 (moderada: 18 a 50)	96	69	24	3	40	26	30
2 (alta: ≥51)	132	85	36	11	53	27	52
0 (negat y débil: 0 a 17)	315	201	89	25	141	55	119
%+	42	43	40	36	40	49	41
Perdidos	75	65	6	4	48	17	10
SUBJETIVO	C. TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
Validos	397	210	148	39	142	55	200
Positivos:	242	139	80	23	88	40	114
1	144	69	58	17	35	23	86
2	60	36	19	5	28	8	24
3	38	34	3	1	25	9	4
Negativos	155	71	68	16	54	15	86
%+	61	66	54	59	62	73	57
Perdidos	50	39	7	4	29	10	11

Abreviaturas pág. 13.

Anexo 6. Estadísticos descriptivos del marcador CD11b*.

CD11b	COHORTE	C. Diag. Anual.			C. Proc. Mat.		
OBJETIVO CONTINUO	TOTAL	$\bar{a}1$	$\bar{a}2$	$\bar{a}3$	T1	T2	T3
Validos	525	352	141	32	230	112	183
Positivos	386	286	71	29	182	94	110
Media	36	31	43	67	34	25	25
Desv estándar	85	52	133	164	58	42	90
Mínimo	1	1	4	1	1	1	1
Máximo	1083	390	1083	832	390	281	832
1	4	5	4	5	5	3	2
Cuartiles (Q)							
2	11	11	9	10	13	9	4
3	32	30	35	44	33	26	15
Negativos	139	66	70	3	48	18	73
%+	74	81	50	91	79	84	60
Perdidos	93	68	14	11	52	13	28
OBJETIVO RANGO	C. TOTAL	$\bar{a}1$	$\bar{a}2$	$\bar{a}3$	t1	t2	t3
Validos	525	352	141	32	230	112	183
Positivos:	194	146	35	13	102	40	52
1 (moderada: 18 a 50)	91	71	16	4	50	18	23
2 (alta: ≥ 51)	103	75	19	9	52	22	29
0 (negat y débil: 0 a 17)	331	206	106	19	230	72	131
%+	37	41	25	41	44	36	28
Perdidos	93	68	14	11	52	13	28
SUBJETIVO	C. TOTAL	$\bar{a}1$	$\bar{a}2$	$\bar{a}3$	t1	t2	t3
Validos	378	205	141	32	137	58	183
Positivos:	170	114	33	23	85	22	63
1	121	71	33	17	49	15	57
2	39	34	0	5	30	4	5
3	10	9	0	1	6	3	1
Negativos	208	91	108	9	52	36	120
%+	45	56	23	72	62	38	34
Perdidos	69	44	14	11	34	7	28

Abreviaturas pág. 13.

Anexo 7. Estadísticos descriptivos del marcador CD11c*.

CD11c	COHORTE	C. Diag. Anual.			C. Proc. Mat.		
OBJETIVO CONTINUO	TOTAL	$\bar{a}1$	$\bar{a}2$	$\bar{a}3$	T1	T2	T3
Validos	515	357	132	26	236	110	169
Positivos	443	306	112	25	199	98	146
Media	74	58	105	117	38	102	102
Desv estándar	154	131	189	212	74	200	188
Mínimo	1	1	1	1	1	1	1
Máximo	1483	1483	1102	954	500	1483	1102
1	5	5	10	3	4	8	7
Cuartiles (Q)	2	17	14	32	21	10	31
3	65	51	98	129	32	94	109
Negativos	72	51	20	1	37	12	23
%+	86	86	85	96	84	89	86
Perdidos	103	63	23	17	46	15	42
OBJETIVO RANGO	C. TOTAL	$\bar{a}1$	$\bar{a}2$	$\bar{a}3$	t1	t2	t3
Validos	515	357	132	26	236	110	169
Positivos:	255	160	79	16	91	66	98
1 (moderada: 18 a 50)	109	74	29	6	52	21	36
2 (alta: ≥ 51)	146	86	50	10	39	45	62
0 (negat y débil: 0 a 17)	260	197	53	10	145	44	71
%+	50	45	60	62	39	60	58
Perdidos	103	63	23	17	46	15	42
SUBJETIVO	C. TOTAL	$\bar{a}1$	$\bar{a}2$	$\bar{a}3$	t1	t2	t3
Validos	362	204	132	26	133	61	168
Positivos:	258	133	103	22	88	39	131
1	171	86	67	18	56	24	91
2	66	34	29	3	26	8	32
3	21	13	7	1	6	7	8
Negativos	104	71	29	4	45	22	37
%+	71	65	78	85	66	64	78
Perdidos	85	45	23	17	38	4	43

Abreviaturas pág. 13.

Anexo 8. Estadísticos descriptivos del marcador CD45⁺.

CD45	COHORTE	C. Diag. Anual.			C. Proc. Mat.		
OBJETIVO CONTINUO	TOTAL	ā1	ā2	ā3	T1	T2	T3
Validos	590	397	150	43	266	119	205
Positivos	576	386	147	43	263	112	201
Media	959	995	950	662	415	758	855
Desv estándar	2800	3185	1945	1041	1137	2484	1743
Mínimo	1	2	1	6	1	1	1
Máximo	36334	36334	11325	5312	10823	18729	11325
Cuartiles (Q)							
1	62	62	71	57	31	31	69
2	204	191	255	135	105	79	231
3	727	664	884	1072	363	329	836
Negativos	14	11	3	0	3	7	4
%+	98	97	98	100	99	94	98
Perdidos	28	23	5	0	16	6	6
OBJETIVO RANGO	C. TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
Validos	590	397	150	43	266	119	205
Positivos:	381	253	102	26	172	73	136
1 (moderada: 99 a 360)	154	106	38	10	69	34	51
2 (alta: ≥361)	227	147	64	16	103	39	85
0 (negat y débil: 0 a 98)	209	144	48	17	94	46	69
%+	65	64	68	60	65	61	66
Perdidos	28	23	5	0	16	6	6
SUBJETIVO	C. TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
Validos	414	229	143	42	156	62	196
Positivos:	394	222	130	42	150	61	183
1	168	80	69	19	51	22	95
2	119	66	38	15	42	20	57
3	107	76	23	8	57	19	31
Negativos	20	7	13	0	6	1	13
%+	95	97	91	100	96	98	93
Perdidos	33	20	12	1	15	3	15

Abreviaturas pág. 13.

Anexo 9. Estadísticos descriptivos del marcador CD68⁺.

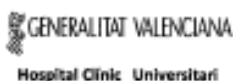
CD68	COHORTE	C. Diag. Anual.			C. Proc. Mat.		
OBJETIVO CONTINUO	TOTAL	ā1	ā2	ā3	T1	T2	T3
Validos	567	384	147	36	254	117	195
Positivos	531	349	146	36	221	115	194
Media	337	281	394	654	37	91	431
Desv estándar	484	474	459	541	63	131	475
Mínimo	5	5	13	98	1	1	12
Máximo	3935	3296	3935	2624	675	728	3935
1	59	32	167	236	5	14	171
Cuartiles (Q)							
2	184	113	265	529	15	45	277
3	423	319	437	1004	44	111	480
Negativos	36	35	1	0	33	2	1
%+	94	91	99	100	87	98	99
Perdidos	51	36	8	7	28	8	16
OBJETIVO RANGO	C. TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
Validos	567	384	147	36	254	117	196
Positivos:	152	78	51	23	26	41	85
1 (moderada: 364 a 595)	69	34	28	7	14	19	36
2 (alta: ≥596)	83	44	23	16	12	22	49
0 (negat y débil: 0 a 363)	415	306	96	13	228	76	111
%+	27	20	35	64	10	35	43
Perdidos	51	36	8	7	28	8	15
SUBJETIVO	C. TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
Validos	405	222	147	36	146	62	196
Positivos:	318	136	146	36	79	45	194
1	170	78	82	10	41	34	95
2	124	56	52	16	36	11	77
3	24	2	12	10	2	0	22
Negativos	87	86	1	0	67	18	2
%+	79	61	99	100	54	73	99
Perdidos	42	27	8	7	25	2	15

Abreviaturas pág. 13.

Anexo 10. Estadísticos descriptivos del marcador CD163+.

CD163	COHORTE	C. Diag. Anual.			C. Proc. Mat.		
OBJETIVO CONTINUO	TOTAL	ā1	ā2	ā3	T1	T2	T3
Validos	588	404	145	39	276	115	197
Positivos	545	361	145	39	240	108	197
Media	453	444	486	421	68	127	457
Desv estándar	762	894	409	319	181	189	383
Mínimo	5	5	20	12	1	1	6
Máximo	10439	10439	1975	1392	2193	1133	1975
1	48	24	249	180	5	11	232
Cuartiles (Q)							
2	236	119	377	315	15	50	369
3	519	455	566	594	54	146	545
Negativos	43	43	0	0	36	7	0
%+	93	89	100	100	87	94	100
Perdidos	30	16	10	4	6	10	14
OBJETIVO RANGO	C. TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
Validos	588	404	145	39	276	115	197
Positivos:	271	134	113	24	68	54	149
1 (moderada: 237 a 440)	104	40	56	8	26	13	65
2 (alta: ≥441)	167	94	57	16	42	41	84
0 (negat y débil: 0 a 236)	317	270	32	15	208	61	48
%+	46	33	78	62	25	47	76
Perdidos	30	16	10	4	6	10	14
SUBJETIVO	C. TOTAL	ā1	ā2	ā3	t1	t2	t3
Validos	414	235	143	36	168	55	191
Positivos:	360	184	141	35	126	46	188
1	139	70	58	11	51	18	70
2	147	72	57	18	51	13	83
3	74	42	26	6	24	15	35
Negativos	54	51	2	1	42	9	3
%+	87	78	99	97	75	84	98
Perdidos	33	14	12	7	3	10	20

Abreviaturas pág. 13.



**INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL CLÍNICO
UNIVERSITARI DE VALÈNCIA**

D. Manuel Labiós Gómez, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de València

CERTIFICA


Que en este Comité, en su reunión de fecha 29 de enero de 2015, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación que lleva por título:

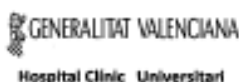
Búsqueda de dianas terapéuticas en los puntos de contacto de la célula tumoral en el neuroblastoma infantil con su matriz extracelular.

Que será llevado a cabo en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de València y cuyo investigador principal es la Dra. Rosa Noguera, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la *Declaración de Helsinki* (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edimburgo), (Octubre 2008 Seúl, Corea) y (Octubre 2013 Fortaleza, Brasil) y en la *Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO* y los acuerdos del *Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina* (París 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos de la convocatoria de Ayudas a Proyectos de Investigación sobre Cáncer Infantil de la Asociación Española Contra el Cáncer.

Valencia, 29 de enero de 2015.


Fdo.: Dr. D. Manuel Labiós Gómez
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica



Rosa Noguera
Departamento de Patología
Facultad de Medicina
Universidad de Valencia

Valencia, 10 de febrero de 2015.

Estimada Dra. Noguera,

El motivo de la presente es informarle que en la pasada reunión del Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario de Valencia de fecha 29 de enero de 2015, ha sido evaluado el proyecto titulado "Búsqueda de dianas terapéuticas en los puntos de contacto de la célula tumoral en el neuroblastoma infantil con su matriz extracelular." del cual usted es el investigador principal.

En dicha evaluación, se acordó informar favorablemente.

Así mismo, se le informa que la legislación vigente en investigaciones donde se va a proceder a la toma de muestras de pacientes, es la Ley 14/2007 de 3 de julio, de Investigación Biomédica y estas investigaciones deberán cumplir dicha normativa.

En caso de requerir información adicional, no dude en ponerse en contacto con la secretaria del Comité.

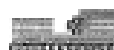
Sin otro particular, reciba un cordial saludo.


Antonió Peláez
Presidente del CEIC

F-CE-GEva-15 Dictamen proyecto



Hospital Clínic Universitari



DEPARTAMENT CLÍNIC MALVAR-ROSA

**INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACION CLÍNICA DEL HOSPITAL CLÍNICO
UNIVERSITARI DE VALENCIA**

D. Manuel Labiós Gómez, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínic Universitari de Valencia

CERTIFICA

Que en este Comité, en su reunión de fecha 24 de julio de 2014, y según consta en el acta de la misma, se han analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación que lleva por título:

Estudio de la biotensegridad en los tumores neuroblásticos.

Que será llevado a cabo en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y cuyo investigador principal es la Dr. Rosa Noguera, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la *Declaración de Helsinki* (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial, y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edimburgo) y (Octubre 2008 Seúl, Corea) en la *Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO* y los acuerdos del *Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a la aplicaciones de la biología y de la medicina* (Paris 12-1-1998, ratificado el 23-7-1999).

Lo que certifico a efectos oportunos de la convocatoria de Ayudas a Proyectos de Investigación en Salud del Instituto de Salud Carlos III.

Valencia, 24 de julio de 2014.

Fdo. : Dr. D. Manuel Labiós Gómez
Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica



En Valencia, a 31 de julio de 2017

D. Carlos Hermenegildo Caudevilla, Presidente de la Comisión Delegada del Comité Científico Interno de la Fundación de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valencia – Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA

CERTIFICA

Que el proyecto con título "Identificación y validación de nuevas terapias, modelos preclínicos y marcadores de respuesta terapéutica en neuroblastoma. (P17/01558).", presentado por la Dra. Rosa Noguera Salva perteneciente a esta institución, ha sido evaluado por este Comité en su reunión del día 27 de julio de 2017, encontrándolo conforme con los requisitos de capacitación del solicitante, la adecuación del proyecto a los medios existentes, la adecuación de la memoria y el interés de los resultados del proyecto para el área de salud.

Y para que conste, se firma en la ciudad y fecha arriba indicadas



Fdo.: Dr. Carlos Hermenegildo Caudevilla
Presidente de la Comisión Delegada

F-EG-CCH9 Certificado conformidad