



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'INGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA  
CURSO 2016-2017

---

**TRABAJO FINAL DE GRADO**

---

**ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA  
EN NEUROBLASTOMAS NO  
METASTÁSICOS L2**

**Blanca García Micó**

**Tutoras:** Dra. Yania Yáñez Peralta  
Dra. Eloisa Jantus Lewintre

València, 10 de julio de 2017



## RESUMEN

**Título:** Estudio de la enfermedad mínima en neuroblastomas no metastásicos L2

**Palabras clave:** Neuroblastoma, enfermedad mínima, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR), *TH*, *DCX*, *PHOX2B*.

**Resumen:** El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente en niños, el cual destaca por su heterogeneidad clínica y biológica. Constituye aproximadamente el 5% de los cánceres pediátricos y el 40% de los diagnosticados durante el primer año de vida. Se trata de un tumor producido por el crecimiento aberrante de las células progenitoras de la cresta neural que migran durante el desarrollo embrionario para formar los ganglios simpáticos, la médula suprarrenal y las cadenas laterales simpáticas. Es por ello que pueden aparecer a lo largo de todo el sistema nervioso simpático, siendo las localizaciones más comunes el abdomen, la médula suprarrenal, el tórax o el cuello. Alrededor del 50% de pacientes presentan metástasis al diagnóstico, que se producen por vía hematológica y linfática, siendo las más comunes en médula ósea, hígado, piel y hueso.

Las principales variables con valor pronóstico, consensuadas por los grupos cooperativos internacionales y que se tienen en cuenta para la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo pre-tratamiento son: la edad al diagnóstico, el estadio tumoral, la amplificación del oncogén *MYCN* y la histología. A ellos, recientemente, se han añadido la ploidía y las aberraciones en el brazo largo del cromosoma 11.

Los neuroblastomas no metastásicos generalmente tienen un buen pronóstico, sin embargo, aproximadamente el 10% de ellos desarrolla recaídas locales o metastásicas y como consecuencia, fallecen. Es por ello que el estudio y la evaluación de biomarcadores con valor pronóstico, es vital para identificar pacientes con mayor riesgo de recaídas y poder optimizar su tratamiento y mejorar las tasas de supervivencia. En neuroblastomas metastásicos y de alto riesgo se han evaluado un gran número de biomarcadores de expresión mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Se ha demostrado que los genes *TH* (tirosina hidroxilasa), *DCX* (doblecortina) y *PHOX2B* (*paired-likehomeobox 2b*), son marcadores idóneos por su sensibilidad y especificidad en la detección de células de neuroblastoma circulantes. Además, se ha comprobado que los niveles de expresión de los marcadores permiten identificar pacientes de ultra-alto riesgo al diagnóstico y evaluar de manera óptima la respuesta al tratamiento. Sin embargo, el valor pronóstico de la detección de los marcadores de enfermedad mínima residual en pacientes con tumores localizados ha sido muy poco estudiado.

El objetivo de este estudio es comprobar el valor pronóstico de la detección de enfermedad mínima en pacientes con neuroblastoma no metastásico. La identificación de aquellos con mayor riesgo de recaídas podría ayudar a optimizar las estrategias de tratamiento y mejorar las tasas de supervivencia de los pacientes.

## ABSTRACT

**Title:** Minimal disease study in non-metastatic stage L2 neuroblastoma patients

**Key words:** Neuroblastoma, minimal disease, real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), *TH*, *DCX*, *PHOX2B*.

Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumor in early childhood, which is remarkable for its clinical and biological heterogeneity. This disease represents approximately 5% of childhood cancers and 40% of all diagnosed cancers during the first year of children life. It consists in a tumor caused by the aberrant growth of neural crest progenitor cells which migrates during the embryonal developing to form the sympathetic nervous system. Therefore neuroblastoma can arises anywhere in the sympathetic nervous system as the adrenal medulla or the paraspinal sympathetic ganglia, forming masses in the abdomen, chest or neck. About 50% of patients present metastases at diagnosis, which is produced by hematologic and lymphatic route, being the most common in bone marrow, liver, skin and bones.

The most important variables with prognostic value, established by most of the international cooperative groups for pre-treatment risk group classification are: age at diagnosis, tumor stage, *MYCN* oncogene amplification and histology. Recently, ploidy and aberrations in chromosome arm 11q, have been added to these risk factors.

Non-metastatic neuroblastomas generally have good prognosis, however, approximately 10% of them develop local or metastatic relapses and, consequently die due to disease progression. For this reason, the study and evaluation of biomarkers with prognostic value is vital for identifying patients with high risk of relapse in order to optimize their treatment and improve their survival rates. In high-risk and metastatic neuroblastomas, a great deal of expression biomarkers has been assessed by real time quantitative PCR (RT-qPCR). It has been demonstrated that *TH* (tyrosine hydroxylase), *DCX* (doublecortine) and *PHOX2B* (*paired-like homeobox 2b*) genes are suitable markers because of their sensitivity and specificity in the detection of circulating neuroblastoma cells. Moreover, it has been proven that high expression levels of these markers allow to identify ultra-high risk patients at diagnosis and to optimally evaluate response to treatment. However, the prognostic value of the detection of minimal residual disease markers in patients with localized tumors has been poorly studied.

The aim of this study is to verify the prognostic value of minimal disease detection in patients with localized neuroblastoma. Identifying those patients at increased risk of relapse could help optimize treatment strategies and improve survival rates of these patients.

**Alumna:** Dña. Blanca García Micó

**Tutora UPV:** Prof. Dña. Eloisa Jantus Lewintre

**Tutora externa:** Dña. Yania Yáñez Peralta

València, julio del 2017

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que me han ayudado en la realización de este trabajo final de grado:

A la Dra. Victoria Castel, por darme la oportunidad de hacer mi TFG en el servicio de oncología pediátrica del Hospital La Fe.

A Yania i a Desi, per fer-me tan fàcil l'estància a l'hospital i treballar amb elles. A Desi per la seua simpatia diària i l'ajuda amb les bases de dades. I a Yania per tot el que m'ha ensenyat, al laboratori i amb la redacció d'aquest treball, per les correccions i la seua paciència i, sobre tot, per la dolçor amb la que sempre m'ha tractat.

Als meus amics de classe, pels quatre anys que hem passat junts, i també pels nervis compartits.

A Marta, per estar sempre disposada a ajudar-me i donar-me suport, pels seus consells.

A Edu, per escoltar-me i estimar-me, per estar incondicionalment.

I a tota la meua família, per entendre'm, suportar-me i estimar-me sempre.



# ÍNDICE

1. Abreviaturas .....	1
2. Introducción .....	3
2.1. Neuroblastoma.....	3
2.2. Histopatología .....	4
2.3. Alteraciones genéticas en neuroblastoma.....	5
2.3.1. Amplificación del oncogén <i>MYCN</i> .....	5
2.3.2. Ganancia del cromosoma 17q.....	6
2.3.3. Deleción del cromosoma 1p.....	6
2.3.4. Pérdida del cromosoma 11q .....	6
2.3.5. Aneuploidía .....	6
2.3.6 Mutaciones somáticas.....	6
2.4. Factores con valor pronóstico en neuroblastoma .....	8
2.4.1. Edad de diagnóstico .....	8
2.4.2. Estadío clínico.....	8
2.5. Neuroblastomas no metastásicos .....	10
2.6. Detección de enfermedad mínima residual en neuroblastoma .....	10
3. Hipótesis y Objetivos.....	13
3.1. Hipótesis.....	13
3.2. Objetivo principal .....	13
3.2.1. Objetivos específicos.....	13
4. Materiales y métodos .....	14
4.1 Pacientes y muestras.....	14
4.2. Extracción de RNA de las muestras.....	14
4.3. Retrotranscripción del RNA a cDNA .....	15
4.4. PCR cuantitativa a tiempo real.....	16
4.5. Análisis estadísticos.....	16
5. Resultados .....	17
6. Discusión .....	22
7. Conclusiones.....	25
8. Referencias.....	26

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Localizaciones anatómicas más frecuentes del tumor primario en neuroblastoma. ....	3
<b>Figura 2.</b> Clasificación histológica de los tumores neuroblásticos.....	4
<b>Figura 3.</b> Detección de amplificación del oncogén <i>MYCN</i> mediante hibridación <i>in situ</i> por fluorescencia. ....	5
<b>Figura 4.</b> Alteraciones estructurales y numéricas en neuroblastoma. ....	7
<b>Figura 5.</b> Métodos de detección de EMR en neuroblastoma.. ....	10
<b>Figura 6.</b> Efecto de la detección de la expresión de <i>DCX</i> en sangre periférica en la supervivencia libre de eventos de la cohorte de NB no metastásicos.....	18
<b>Figura 7.</b> Efecto del estadio 2 o 3 (según el <i>INSS</i> ) en la supervivencia libre de eventos. ....	19
<b>Figura 8.</b> Efecto de la edad, mayor o menor de 18 meses, en la supervivencia libre de eventos .....	19
<b>Figura 9.</b> Efecto del estado de <i>MYCN</i> (no amplificado, amplificado o ganado) en la supervivencia libre de eventos.....	20
<b>Figura 10.</b> Efecto del estado del cromosoma 11q (delecionado o no) en la supervivencia libre de eventos.....	20

### ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los neuroblastomas en grupos de riesgo pre-tratamiento.....	9
<b>Tabla 2.</b> Cantidades de los reactivos necesarios por muestra para la realización de la retrotranscripción .....	15
<b>Tabla 3.</b> Datos clínicos y biológicos de la cohorte de estudio.....	17
<b>Tabla 4.</b> Datos de expresión de <i>TH</i> , <i>DCX</i> y <i>PHOX2B</i> detectados en sangre periférica y médula ósea en la cohorte de neuroblastomas no metastásicos.....	18
<b>Tabla 5.</b> Modelo de regresión de Cox penalizada ( <i>Cox-elastic-net</i> ).....	21



## 1. Abreviaturas

*ALK: anaplastic lymphoma kinase*

Anti-GD2: anticuerpo anti-Disialogangliósido

*ARID1A: AT rich interactive domain 1A*

*ARID1B: AT rich interactive domain 1B*

*ATRX: alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

*DCX: doublecortin*

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: *deoxynucleotide triphosphates*

EM: enfermedad mínima

EMR: enfermedad mínima residual

FISH: *fluorescence in situ hybridation*

GD2: disialogangliósido 2

GN: ganglioneuroma

GNB: ganglioneuroblastoma

IDRF: *Image-defined risk factor*

*INPC: The International Neuroblastoma Pathology Classification*

*INRG: International Neuroblastoma Risk Group*

*INSS: International Neuroblastoma Staging System*

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

*MYCN: v-mycmyelocytomatosis viral related oncogene neuroblastoma derived*

NB: neuroblastoma

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

*PHOX2B: paired-like homeobox 2b*

*PTPN11: protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11*

RNA: ácido ribonucleico

RT-qPCR: *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*

SEHOP: Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica

SIOPEN: *International Society of Pediatric Oncology European Neuroblastoma*

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

TH: *tyrosine hydroxylase*

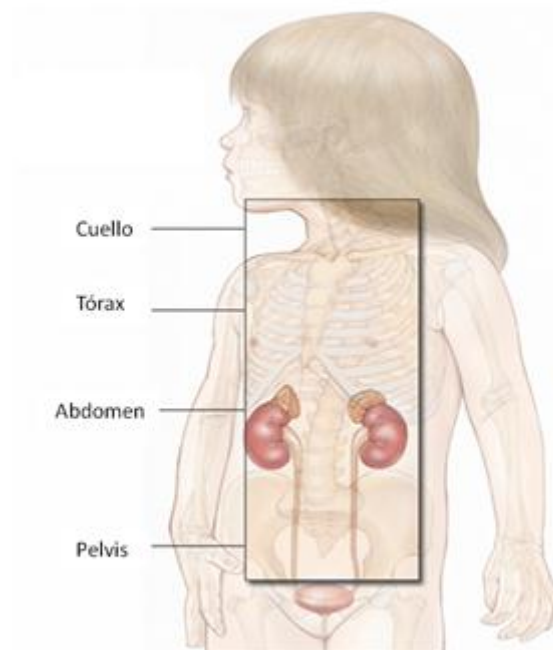
TIAM1: *T-cell lymphoma invasion and metastasis 1*

UNG: *Uracil-N-Glycosylase*

## 2. Introducción

### 2.1. Neuroblastoma

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente en niños, el cual destaca por su heterogeneidad clínica y biológica (Brodeur y Maris, 2002). Constituye aproximadamente el 5% de los cánceres pediátricos y el 40% de los diagnosticados durante el primer año de vida. La prevalencia en España es de 1 caso por cada 100.000 nacimientos, diagnosticándose con más frecuencia en niños de corta edad (Peris-Bonet, 2008). Se trata de un tumor infantil producido por el crecimiento aberrante de las células progenitoras de la cresta neural que migran durante el desarrollo embrionario para formar los ganglios simpáticos, la médula suprarrenal y las cadenas laterales simpáticas. Es por ello, que la localización más común del tumor primario es el abdomen (65%), especialmente en la médula suprarrenal (al menos el 50% de ellos), aunque también aparecen con frecuencia en el cuello, el tórax y la pelvis (Maris, 2010)(Figura 1). Alrededor del 50% de pacientes presentan metástasis al diagnóstico, que se producen por vía hematológica y linfática, siendo las más comunes en médula ósea, hígado, piel y hueso (Brodeur, 2003).



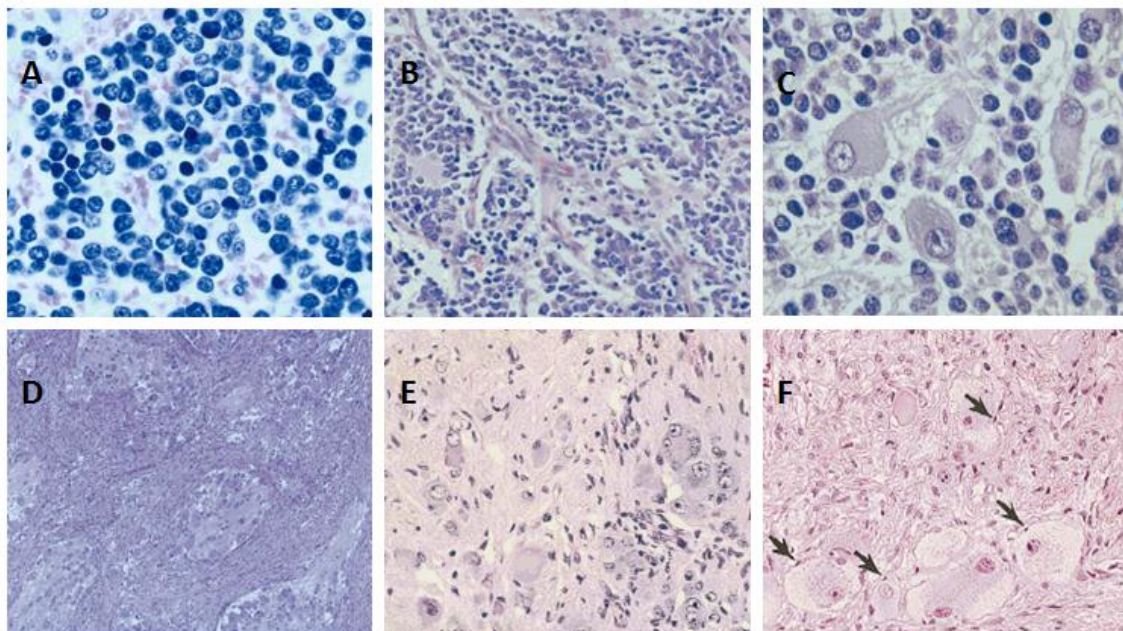
**Figura 1.** Localizaciones anatómicas más frecuentes del tumor primario en neuroblastoma (*American Society of Clinical Oncology, 2005*).

El diagnóstico del neuroblastoma se basa en la existencia de rasgos histopatológicos característicos de tejido tumoral, así como en la presencia de células tumorales en aspirados y biopsias de médula ósea, además de altas concentraciones de catecolaminas urinarias (Brodeur y Maris, 2002; Brodeur *et al.*, 1988). En la mayoría de los casos, este tumor aparece de forma esporádica aunque existen casos familiares, en los que la enfermedad presenta una herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta. Sin embargo, éstos son raros, suponiendo sólo el 2% de los casos diagnosticados (Kushner *et al.*, 1996).

## 2.2. Histopatología

Los tumores neuroblásticos están compuestos fundamentalmente por dos tipos de células: células neuroblásticas, de estirpe neural, y células estromales de estirpe glial. En función de la proporción de estos dos tipos celulares y del grado de diferenciación, los tumores se clasifican en tres grupos con características histológicas específicas (Figura 2):

- **Neuroblastomas (NB):** son los tumores más indiferenciados, formados en su mayoría por neuroblastos y menos de un 50% de células de Schwann. Esta categorial tumoral, a su vez, se subdivide en función de la madurez de los neuroblastos en NB indiferenciados (formados únicamente por células indiferenciadas, con citoplasma escaso y núcleos redondos), NB pobremente diferenciados (que contienen hasta un 5% de neuroblastos diferenciados), y NB en diferenciación (formados por más de un 5% de neuroblastos diferenciados, con citoplasma abundante y núcleos prominentes).
- **Ganglioneuroblastomas (GNB):** presentan un nivel medio de diferenciación y están formados por más del 50% de células de Schwann y por células neuroblásticas en diferentes estadios de diferenciación.
- **Ganglioneuomas (GN):** es el tipo de tumor más diferenciado, formado fundamentalmente por células ganglionares maduras y abundante estroma schwanniano. Se subdivide en GN en maduración, si todavía quedan neuroblastos en diferenciación o células ganglionares madurando, o GN maduro, si la maduración de las células ganglionares es completa.



**Figura 2.** Clasificación histológica de los tumores neuroblásticos (Shimada *et al.*, 1999b).

A: Neuroblastoma indiferenciado; B: Neuroblastoma poco diferenciado; C: Neuroblastoma en diferenciación; D: Ganglioneuroblastoma; E: Ganglioneuoma en maduración; F: Ganglioneuoma maduro.

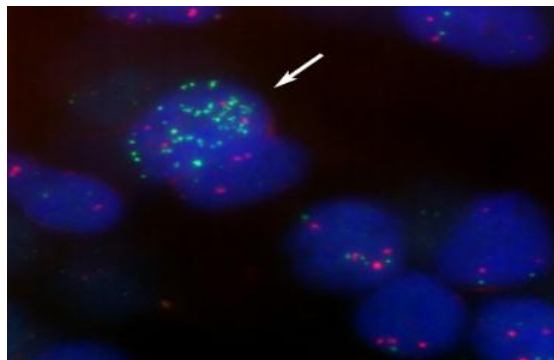
La clasificación histopatológica actual "*The International Neuroblastoma Pathology Classification*" (INPC) distingue entre tumores con pronóstico favorable o desfavorable teniendo en cuenta factores como la edad de diagnóstico, el índice de mitosis-cariorrhexis, el contenido de células estromales de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

### 2.3. Alteraciones genéticas en neuroblastoma

Las células tumorales de neuroblastoma pueden presentar alteraciones genéticas muy diversas. Las mejor caracterizadas son la amplificación del oncogén *MYCN* (Brodeur *et al.*, 1984; Seeger *et al.*, 1985), las alteraciones de la ploidía (Look *et al.*, 1991), la ganancia del brazo cromosómico 17q (Caron, 1995), y la delección de 1p (Christiansen y Lampert, 1998) y de 11q (Spitz *et al.*, 2006). También se dan, aunque con baja frecuencia, mutaciones somáticas en ciertos genes.

#### 2.3.1. Amplificación del oncogén *MYCN*

La amplificación del oncogén *MYCN* es la primera alteración genética descrita asociada a neuroblastomas agresivos, de mal pronóstico y con alto riesgo de recaídas. Este gen se localiza en el cromosoma 2p24 y su amplificación se detecta aproximadamente en un 35 % de los tumores primarios (Brodeur *et al.*, 1984; Seeger *et al.*, 1985). *MYCN* codifica para un factor de transcripción que regula genes implicados en el control del ciclo celular, la apoptosis y la angiogénesis, y su sobreexpresión en neuroblastoma contribuye a la tumorigénesis (Bell *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que la amplificación de *MYCN* es un marcador inequívoco de un comportamiento tumoral agresivo, que se utiliza en la estratificación de pacientes para su tratamiento, se ha desarrollado una metodología estandarizada para garantizar la calidad de los estudios del estatus de dicho gen (Ambros *et al.*, 2003). La técnica estándar para la detección de amplificación de *MYCN* es la hibridación *in situ* por fluorescencia o FISH (*fluorescence in situ hybridation*) (Figura 3), y más recientemente los SNP-arrays (Ambros *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Detección de amplificación del oncogén *MYCN* mediante hibridación *in situ* por fluorescencia.

### 2.3.2. Ganancia del cromosoma 17q

La ganancia del brazo largo del cromosoma 17 es la aberración cromosómica más frecuente, la cual está presente en el 70% de todos los tumores y aproximadamente en el 100% de los neuroblastomas de alto riesgo (Caron, 1995; Lastowska *et al.*, 1997; Mosse *et al.*, 2007). La ganancia de 17q es debida fundamentalmente a translocaciones con otros cromosomas. La translocación más frecuente se produce con el brazo corto del cromosoma 1 (Caron *et al.*, 1994; Savelyeva *et al.*, 1994), y también con el brazo largo del 11 (Van Roy *et al.*, 1994). Esta alteración suele estar asociada a estadios avanzados de la enfermedad, amplificación de *MYCN*, deleción de 1p o diploidía, y su valor pronóstico independiente aún es un tema controvertido (Bown *et al.*, 1999; Theissen *et al.*, 2014).

### 2.3.3. Deleción del cromosoma 1p

La deleción del brazo corto del cromosoma 1 se detecta en aproximadamente el 30% de los casos de neuroblastoma, siendo un indicador de mal pronóstico. Se asocia frecuentemente con la amplificación de *MYCN* y con un mayor riesgo de recaídas locales (Christiansen y Lampert, 1998; Caron *et al.*, 1996; Maris *et al.*, 2007). La mayoría de estas deleciones tienen lugar en la región 1p36, donde se han localizado genes supresores de tumores, sin embargo no se ha demostrado que, de forma independiente, esto sea suficiente para desencadenar la enfermedad (Henrich *et al.*, 2011; White *et al.*, 2005).

### 2.3.4. Pérdida del cromosoma 11q

Las aberraciones genéticas en el brazo largo del cromosoma 11 como deleciones, translocaciones y pérdidas alélicas también son recurrentes en neuroblastoma. La deleción más común se produce en la región 11q23 y está presente en aproximadamente el 30-40% de los tumores primarios (Spitz *et al.*, 2006; Ora y Eggert, 2011). La pérdida de 11q está relacionada inversamente con la amplificación de *MYCN* y se asocia a neuroblastomas muy agresivos y de mal pronóstico (Attiyeh *et al.*, 2005; Caren *et al.*, 2010).

### 2.3.5. Aneuploidía

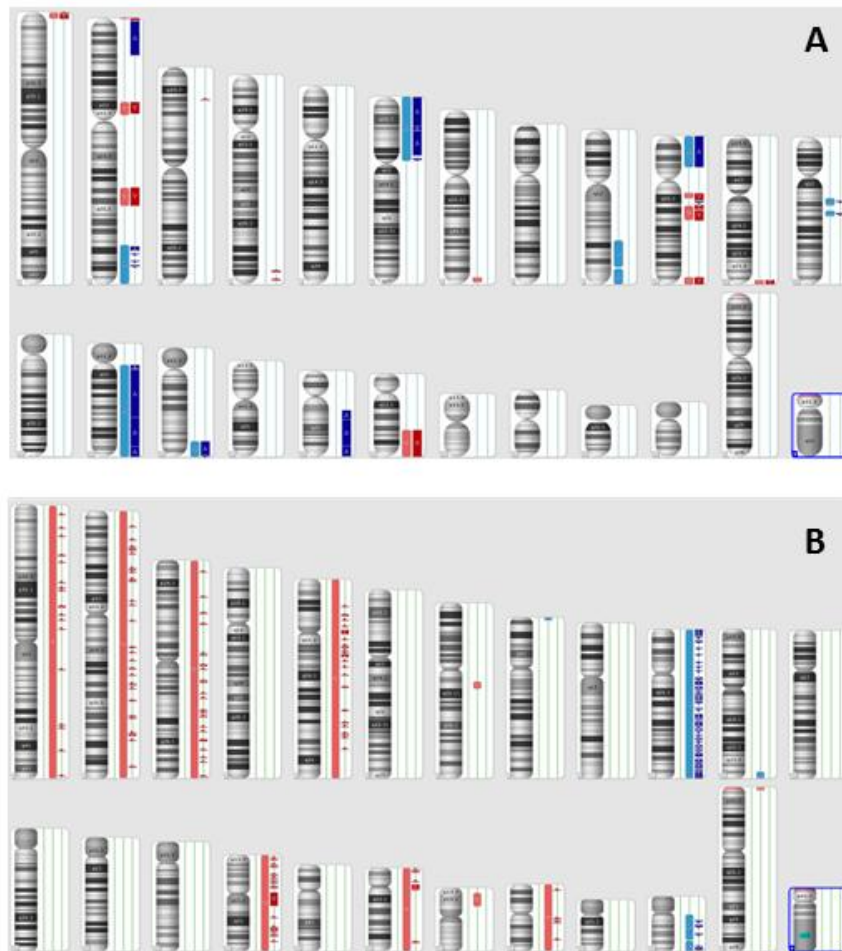
Las alteraciones en el contenido de DNA o en el número de cromosomas es un hallazgo frecuente en neuroblastoma que ha sido incluido recientemente como factor pronóstico en el actual sistema de clasificación de los pacientes en grupos de riesgo pre-tratamiento (*INRG*) (Look *et al.*, 1991; George *et al.*, 2005). En general, los pacientes con tumores que presentan ganancias o pérdida completas de cromosomas (cariotipo hiperploide, con un número de cromosomas en el rango de la triploidía, de 58 a 80) y pocas alteraciones estructurales, tienen un pronóstico favorable (Schneiderman *et al.*, 2008). Sin embargo, los tumores cuasi-diploides (de 44 a 57 cromosomas) o cuasi-tetraploides (de 81 a 103) que presentan alteraciones segmentarias asociadas con una inestabilidad genómica, tienen un comportamiento más agresivo (Kaneko y Knudson, 2000; Schleiermacher *et al.*, 2012) (Figura 4).

### 2.3.6 Mutaciones somáticas

Las mutaciones somáticas no son muy frecuentes en neuroblastoma, sin embargo, estudios recientes han identificado, mediante técnicas de secuenciación masiva, mutaciones recurrentes en algunos genes como *ARID1A* y *ARID1B* (11%), *ALK* (7-9%), *TIAM1* (3-10%), *PTPN11* (2,9%), *ATRX* (2,5%), *MYCN* (1,7%) o *NRAS* (0,83%), entre otros (Molenaar *et al.*, 2012; Pugh *et al.*, 2013). No obstante, en los casos de neuroblastoma familiar, el 90% de los pacientes presentan mutaciones en el gen *ALK* (*anaplastic lymphoma kinase*). *ALK* codifica

para un receptor tirosina quinasa implicado en la diferenciación neuronal, la proliferación y la supervivencia celular, por lo que está relacionado con diversos cánceres humanos. Aunque en los neuroblastomas esporádicos la mutación de este gen no es tan frecuente, también es posible identificarla en aproximadamente el 15% de los tumores primarios, sobre todo en la recaída (Janoueix-Lerosey *et al.*, 2008). Actualmente existen tratamientos dirigidos con inhibidores de *ALK* en ensayos clínicos en fases tempranas como el Crizotinib o el Brigatinib (ARIAD PHARMACEUTICALS, 2017; M.D. ANDERSON CANCER CENTER, 2017).

Las mutaciones en el gen *PHOX2B* (*paired-likehomeobox 2b*) se producen entre un 2 y un 10% de los neuroblastomas hereditarios y de forma muy infrecuente en los esporádicos. Este gen codifica para un factor de transcripción implicado en el desarrollo de la cresta neural y su mutación está asociada al aumento de proliferación y diferenciación de células del linaje simpático-adrenérgico. Las alteraciones en *ALK* y *PHOX2B*, y su sobreexpresión, están relacionadas con un mal pronóstico de la enfermedad (Trochet *et al.*, 2004).



**Figura 4.** Alteraciones estructurales (A) y numéricas (B) en neuroblastoma.

## 2.4. Factores con valor pronóstico en neuroblastoma

Aunque se ha estudiado el valor pronóstico de un gran número de variables, muchas de ellas no tienen valor independiente sino que se asocian a otras con más peso en el desarrollo de la enfermedad. Las principales variables con valor pronóstico independiente consensuadas por la mayoría de los grupos cooperativos y que se tienen en cuenta para la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo pre-tratamiento son: la edad al diagnóstico (Brodeur y Maris, 2002; London *et al.*, 2005), el estadio tumoral (Brodeur *et al.*, 1993), la amplificación del oncogén *MYCN* y la histología (Shimada *et al.*, 1999a). A ellos, recientemente, se han añadido la ploidía y las aberraciones en el brazo largo del cromosoma 11.

### 2.4.1. Edad de diagnóstico

La edad a la que se diagnostica la enfermedad es un factor fundamental para determinar el pronóstico de la misma. Los pacientes menores de 18 meses generalmente tienen mejor pronóstico que los niños de mayor edad, mientras que los pacientes mayores de 18 meses y con metástasis presentan muy mal pronóstico. Por otra parte, los pacientes mayores de 5 años tienen mal pronóstico, alto riesgo de recaída y la enfermedad cursa más lentamente que en pacientes de menor edad (London *et al.*, 2005; Evans y D'Angio, 2005).

### 2.4.2. Estadio clínico

En la década de los 90 se desarrolló un sistema de estadiaje conocido como "*The International Neuroblastoma Staging System*" (*INSS*) (Brodeur *et al.*, 1993). Este sistema se basaba en una evaluación clínica, radiológica y quirúrgica, y clasificaba a los pacientes en los siguientes estadios:

- Estadio 1: tumor localizado con escisión macroscópica completa, con o sin enfermedad residual microscópica; ganglios linfáticos ipsilaterales representativos, negativos para el tumor microscópicamente, ya que los nódulos adheridos al tumor primario y extirpados con él, pueden ser positivos.
- Estadio 2A: tumor localizado con escisión quirúrgica incompleta; ganglios linfáticos ipsilaterales representativos, negativos para el tumor microscópicamente.
- Estadio 2B: tumor localizado con o sin resección macroscópica completa; ganglios linfáticos ipsilaterales no adherentes, positivos para el tumor. Los ganglios linfáticos contralaterales agrandados deben ser negativos microscópicamente.
- Estadio 3: tumor irresectable infiltrante más allá de la línea media (determinada por la columna vertebral), con o sin afectación de los ganglios linfáticos regionales; o tumor unilateral localizado con compromiso de los ganglios regionales contralaterales; o tumor irresectable en la línea media con extensión bilateral por infiltración.
- Estadio 4: tumor primario con diseminación a ganglios linfáticos distantes, huesos, médula ósea, hígado piel u otros órganos, con excepción de lo definido para el estadio 4S.
- Estadio 4S: tumor primario localizado como se define en los estadios 1 y 2, con diseminación limitada a piel, hígado o médula ósea, en lactantes menores de un año de edad. La afectación medular debe ser mínima (menos del 10% de células nucleadas totales identificadas como malignas por biopsia de hueso o por aspirado de médula ósea). Una afectación más extensa de la médula ósea se consideraría como enfermedad en estadio 4.



No obstante, este sistema de estadiaje tiene en cuenta factores post-quirúrgicos y no resulta del todo adecuado para la estratificación de los pacientes previo al tratamiento. Por ello, más recientemente se desarrolló un nuevo sistema, “*The International Neuroblastoma Risk Grouping Staging System*” (INRGSS), el cual tiene en cuenta la presencia o ausencia de factores de riesgo valorados por imagen o IDRFs (Image-defined risk factors), y la presencia o no de metástasis, en el momento del diagnóstico. Según este sistema, los tumores localizados en una región concreta se clasifican como L1 (tumores localizados 1, sin IDRFs) o L2 (localizados 2, con IDRFs); y los tumores metastásicos, como M (metastásicos) o MS (metastásicos especiales). Estos últimos se diferencian de los M en que las metástasis están confinadas exclusivamente a la piel, hígado y/o médula ósea en pacientes menores de 18 meses. En base a este sistema de estadiaje se definen pacientes de muy bajo riesgo, con una tasa de supervivencia a los 5 años superior al 85%; pacientes de bajo riesgo, con tasas de supervivencia entre 75-85%; pacientes de riesgo intermedio, con tasas de supervivencia entre 50-75%; y pacientes de alto riesgo, con una tasa de supervivencia inferior al 50% (Tabla 1) (Shimada *et al.*, 1999a; Cohn *et al.*, 2009; Monclair *et al.*, 2009).

**Tabla 1.** Clasificación de los neuroblastomas en grupos de riesgo pre-tratamiento (Cohn *et al.*, 2009).

GN: Ganglioneuroma; GNB: Ganglioneuroblastoma.

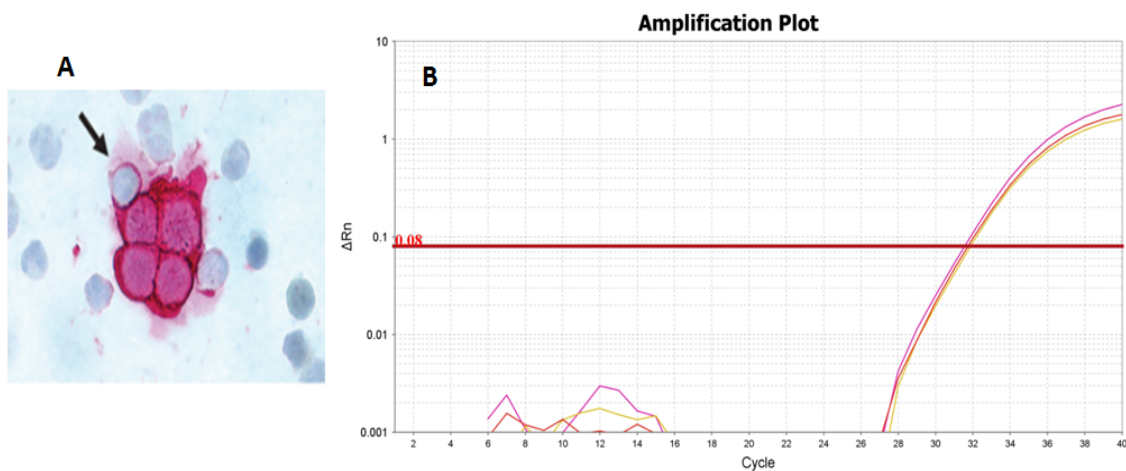
Estadio INRG	Edad (meses)	Categoría Histológica	Diferenciación del tumor	MYCN	Delección de 11 q	Ploidia	Grupos de riesgo pretratamiento
L1/L2		GN en maduración; GNB entremezclado					A-Muy bajo
L1		cualquiera excepto GN en maduración; GNB entremezclado		No Amplificado			B-Muy bajo
				Amplificado			K-Alto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

## 2.5. Neuroblastomas no metastásicos

Los neuroblastomas no metastásicos generalmente tienen un buen pronóstico, sin embargo, aproximadamente el 10% de ellos desarrolla recaídas locales o metastásicas y como consecuencia, fallecen. Los pacientes con neuroblastoma localizado y sin amplificación del oncogén *MYCN* presentan muy buen pronóstico y son tratados únicamente con cirugía o con una dosis de quimioterapia estándar seguida de cirugía, mostrando buenos resultados (Rubie *et al.*, 2011). Sin embargo, los pacientes con el tumor localizado pero con amplificación de *MYCN*, son incluidos en el protocolo de alto riesgo y reciben un tratamiento intensivo que consiste en quimioterapia de inducción, cirugía, trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos, radioterapia, terapia biológica con ácido retinoico-13-cis e inmunoterapia. No obstante, pese a la intensidad del tratamiento, los pacientes de alto riesgo presentan tasas de supervivencia que no superan el 50% (Brodeur, 2003; Yáñez *et al.*, 2011). El estudio y la evaluación de biomarcadores con valor pronóstico es vital para identificar neuroblastomas no metastásicos con alto riesgo de presentar recaídas o progresiones y poder así, optimizar su tratamiento y mejorar las tasas de supervivencia.

## 2.6. Detección de enfermedad mínima residual en neuroblastoma

Desde que en los años 90 se detectaron por primera vez células neuroblásticas en sangre periférica y médula ósea de pacientes con neuroblastoma, se han dedicado grandes esfuerzos en desarrollar y optimizar los métodos de detección de enfermedad mínima residual (EMR) en este tumor (Moss y Sanders, 1990). La EMR o micrometástasis no es más que la persistencia de pequeñas cantidades de células tumorales durante el tratamiento oncológico o tras finalizar el mismo. Su detección se puede realizar mediante diversas técnicas, las más utilizadas y estandarizadas en neuroblastoma son la inmunocitología y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR por sus siglas en inglés) (Figura 5) (Burchill y Selby, 1999; Beiske *et al.*, 2009).



**Figura 5.** Métodos de detección de EMR en neuroblastoma. **A:** Detección por inmunocitología de las células circulantes de neuroblastoma. **B:** Gráfico de la amplificación de la PCR cuantitativa a tiempo real.

La inmunocitología consiste en la detección de células tumorales a través de la unión específica de anticuerpos a antígenos de membrana de las células neuroblásticas. Esta técnica tiene una sensibilidad de detección de 1 célula tumoral en un millón de células, no obstante, depende del número de células analizadas y de la disponibilidad de anticuerpos específicos que se unan a antígenos de membrana de las células tumorales. Los anticuerpos *anti*-GD2 son específicos y sensibles para la detección de células de neuroblastoma en médula ósea puesto que el disialogangliósido (GD2) es un glicoesfingolípido de membrana presente en la mayoría de los neuroblastos (Cheung *et al.*, 1985; Faulkner *et al.*, 1998).

La RT-qPCR es un método ampliamente utilizado para la detección de EM y EMR en diversos tipos de cáncer, entre ellos el neuroblastoma (Burchill y Selby, 2000). Se trata de una técnica extremadamente sensible que permite la detección de una célula tumoral entre  $10^6$  células hematopoyéticas, sin embargo, se ha de realizar de forma rigurosa ya que la expresión de los mRNA diana puede verse afectada por diversos factores como son las condiciones de recogida y almacenamiento de las muestras, el procesado inadecuado de las mismas y cambios en la transcripción de los genes empleados como marcadores. Se han desarrollado métodos semicuantitativos que comparan la cantidad de mRNA del gen utilizado como biomarcador con la de un gen de expresión constitutiva. Esto permite evaluar de forma eficaz los cambios en la carga tumoral en médula ósea y sangre periférica durante el transcurso de la enfermedad (Burchill *et al.*, 2001; Cheung y Cheung, 2001).

Se han llevado a cabo numerosos estudios para identificar y evaluar el valor pronóstico de la detección de un gran número de biomarcadores (Viprey *et al.*, 2008; Cheung *et al.*, 2008; Träger *et al.*, 2008). Los genes *TH* (tirosín hidroxilasa), *DCX* (doblecortina) y *PHOX2B* (*paired-likehomeobox 2b*) han sido identificados como biomarcadores sensibles y específicos para la detección de células de neuroblastoma y son los consensuados por el grupo europeo de monitorización molecular SIOPEN. El gen *TH* codifica para la tirosín hidroxilasa, el primer enzima de la ruta de síntesis de las catecolaminas, las cuales son producidas por las células neuroblásticas (Burchill *et al.*, 2001; Lambooy *et al.*, 2003; Ootsuka *et al.*, 2008). El gen *DCX* codifica para una proteína que interacciona y regula los microtúbulos del citoesqueleto y está implicado en la migración de neuroblastos durante el desarrollo del córtex cerebral. Este marcador se expresa específicamente en neuronas en migración a través del sistema nervioso central y periférico durante el desarrollo embrionario y post-natal (Gleeson *et al.*, 1999; Oltra *et al.*, 2005). Algunos autores han detectado la expresión de *TH* y *DCX* a bajos niveles en muestras de sangre periférica y médula ósea de donantes sanos. Para evitar el problema de la expresión inespecífica de estos marcadores se utilizan diversas aproximaciones estadísticas (Kuçi *et al.*, 2006; Corrias *et al.*, 2012). Recientemente se ha identificado el gen *PHOX2B* como un biomarcador 100% específico para la detección de células neuroblásticas (Stutterheim *et al.*, 2008). Este gen codifica un factor de transcripción que promueve la formación y diferenciación neuronal durante el desarrollo neural, expresándose únicamente en células del sistema nervioso (Pattyn *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta la gran heterogeneidad tumoral del neuroblastoma, la utilización de varios biomarcadores, aumenta la especificidad y la sensibilidad de detección de EM o EMR en este tumor.

Al diagnóstico, la detección de EM en sangre periférica y médula ósea permite identificar neuroblastomas metastásicos de muy alto riesgo para los cuales deben plantearse nuevas estrategias de tratamiento. El valor pronóstico de la detección de EMR y su utilidad para evaluar la respuesta al tratamiento ha sido extensamente estudiado en neuroblastomas metastásicos de alto riesgo (Fukuda *et al.*, 2001; Tchirkov *et al.*, 2003; Reynolds, 2004; Burchill *et al.*, 2001; Träger *et al.*, 2008; Viprey *et al.*, 2014; Yáñez *et al.* 2016). Por el contrario, existen muy pocos estudios sobre el valor pronóstico de la detección de EMR en pacientes con tumores localizados (Pérez *et al.*, 2000; De Bernardi *et al.*, 2008). Un estudio reciente de un grupo cooperativo español en los estudios de neuroblastoma de la SEHOP (Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica) revela que la detección de expresión de *TH* y *DCX* en sangre periférica de pacientes con neuroblastoma no metastásico al diagnóstico, se asocia a un mayor riesgo de recaída (Yáñez *et al.*, 2011). No obstante el valor pronóstico independiente de la detección de EM en pacientes con enfermedad localizada y su utilidad clínica no está del todo esclarecido.

## **3. Hipótesis y Objetivos**

### **3.1. Hipótesis**

Los neuroblastomas no metastásicos tienen un pronóstico variable. Algunos pacientes desarrollan recaídas metastásicas y a consecuencia fallecen por progresión de la enfermedad. La hipótesis del presente trabajo plantea que la detección de enfermedad mínima al diagnóstico mediante técnicas altamente sensibles permitiría identificar pacientes con alto riesgo de recaídas para los que deberían contemplarse nuevas estrategias de tratamiento.

### **3.2. Objetivo principal**

El objetivo de este estudio es comprobar el valor pronóstico de la detección de enfermedad mínima en pacientes con neuroblastoma no metastásico.

#### **3.2.1. Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto en la supervivencia de la detección de la expresión génica de TH, DCX y *PHOX2B* en pacientes neuroblastoma localizado.
2. Comprobar el efecto en la supervivencia de factores de riesgo conocidos en neuroblastoma en la serie de pacientes estudiada.
3. Elucidar el valor pronóstico independiente de la detección de los marcadores de enfermedad mínima residual en pacientes con enfermedad localizada

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Pacientes y muestras

La cohorte de estudio consistió en 73 pacientes con neuroblastoma no metastásico procedentes de la mayoría de hospitales españoles que cooperan en los estudios de neuroblastoma actualmente abiertos. Todos los pacientes seleccionados presentaban tumores neuroblásticos en estadio L2, según el criterio de clasificación del “*International Neuroblastoma Risk Grouping Staging System*” (INRGSS) (Monclair *et al.*, 2009), y estaban incluidos en diferentes ensayos clínicos nacionales o europeos (LNESEG-I Y II, INES, EUNS, HR-NBL 1 y otros). Se excluyeron del estudio los pacientes con tumores localizados estadio L1, debido a que presentan altas tasas de supervivencia y la detección de los biomarcadores de EMR es muy infrecuente y no parece tener valor pronóstico en este grupo (Yáñez *et al.*, 2011).

Se analizaron un total de 67 muestras de sangre periférica y 70 aspirados de médula ósea al diagnóstico. Las muestras de médula ósea fueron previamente analizadas mediante estudios citológicos e histológicos y todas estaban libres de infiltración por neuroblastos. Las muestras fueron coleccionadas dentro de los protocolos de tratamiento, sin suponer extracciones adicionales y con la firma previa de un consentimiento informado por parte de los padres o tutores legales de los pacientes según la normativa vigente. Se recolectaron 2 mL de sangre periférica y 0,5 mL de médula ósea en tubos *Vacutainer* EDTA (BD, UK). Se evaluaron al menos un tipo de muestra por cada paciente, aunque en la mayoría de los casos se disponía de muestras pareadas.

### 4.2. Extracción de RNA de las muestras

Para la extracción de RNA de las muestras de sangre periférica y médula ósea, en primer lugar, se realizó una centrifugación en gradiente para separar las células mononucleadas. Para ello se utilizó el gradiente *Lymphoprep* (AXIS-SHIELD, PoC, AS) siguiendo el siguiente protocolo:

- Se centrifugan las muestras de sangre periférica a 2000 rpm durante 10 minutos para obtener el plasma.
- Tras su separación de la fase celular, el plasma se trasvasa con una pipeta *pasteur* a un tubo de criocongelación y se almacena a -80°C.
- Las muestras de médula ósea y de sangre periférica (tras haber separado el plasma), se lavan con el mismo volumen de suero fisiológico.
- En un tubo de 15 mL se añaden 2 mL de solución de *Lymphoprep*.
- Las muestras lavadas con suero se transfieren al tubo de 15 mL con la *Lymphoprep*, con cuidado y lentamente para no mezclar las dos fases.
- Se centrifugan a 2000 rpm durante 20 minutos, creando un gradiente de densidad que permite separar las diferentes fases. Las células mononucleadas quedan en un halo blanquecino en el centro del tubo, entre el suero y la solución *Lymphoprep*.
- El halo de linfocitos se recoge con cuidado de no mezclar las tres fases con una pipeta *pasteur* y se trasvasa a otro tubo de 15 mL.
- Se añade suero fisiológico al nuevo tubo hasta un volumen final de 8 mL y se centrifuga a 2000 rpm durante 10 minutos.

- Se decanta el sobrenadante y el pellet celular es resuspendido con 350  $\mu\text{L}$  de RLT, tampón de lisis que contiene tiocianato de guanidinio, el cual lisa las células y evita la desnaturalización del DNA y el RNA, para su posterior extracción. Inmediatamente se almacena a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El RNA total de estas células se aisló utilizando el kit de extracción *RNAeasy kit* (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante:

- A las muestras de sangre periférica y médula ósea resuspendidas en RLT se les añade el mismo volumen de etanol Rnasa-free al 70% que del añadido previamente de RLT (350  $\mu\text{L}$ ).
- A continuación, se transfieren los 700  $\mu\text{L}$  de muestra a la columna de extracción de RNA y se centrifuga a 11000 rpm durante un minuto. Tras desechar el filtrado, se añaden 700  $\mu\text{L}$  de tampón RW1, se centrifuga bajo las mismas condiciones y se elimina el filtrado.
- La columna se transfiere a un nuevo tubo recolector y se añaden 500  $\mu\text{L}$  de tampón RPE. Se centrifuga a 11000 rpm durante un minuto y se desecha el filtrado.
- Se añaden otros 500  $\mu\text{L}$  del mismo tampón, se vuelve a centrifugar durante 2 minutos, y se elimina el filtrado.
- La columna se transfiere a un tubo *Eppendorf* donde se recogerá el RNA extraído.
- Se añaden 40  $\mu\text{L}$  de agua destilada Rnasa-free y se centrifuga a 11000 rpm durante un minuto para eluir el RNA y, a continuación, el RNA obtenido es cuantificado mediante Nanodrop.

### 4.3. Retrotranscripción del RNA a cDNA

Se retrotranscribieron en cada caso 1,2  $\mu\text{g}$  de RNA en un volumen de reacción de 60  $\mu\text{L}$  utilizando el kit *TaqMan Gold RT-PCR* (PE AppliedBiosystems, Foster City, CA USA). Para ello se emplearon los siguientes reactivos:

**Tabla 2.** Cantidades de los reactivos necesarios por muestra para la realización de la retrotranscripción.

REACTIVO	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración
H2O Rnasa Free	1,10	
10X Buffer	6,00	1X
25 mM MgCl <sub>2</sub>	13,20	5.5 mM
dNTPs (10 Mm)	6,00	1mM
Hexámeros Random (50uM)	3,00	2.5 $\mu\text{M}$
Rnasin (20 U/ $\mu\text{L}$ )	1,20	0.4 U/ $\mu\text{L}$
Multireverse Transcriptasa (50 U/ $\mu\text{L}$ )	1,50	1.25 U/ $\mu\text{L}$
SUBTOTAL	32,00	
Muestra	28,00	1,2 $\mu\text{g}$

El programa del termociclador utilizado para llevar a cabo la retrotranscripción de las muestras de RNA a cDNA fue el siguiente:

1. Incubación: 10 minutos a  $25^{\circ}\text{C}$ .
2. Retrotranscripción: 30 minutos a  $48^{\circ}\text{C}$ .
3. Inactivación: 5 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4. PCR cuantitativa a tiempo real

Los estudios de expresión de *TH*, *DCX* y *PHOX2B* se llevaron a cabo mediante RT-qPCR en el equipo *VIIA7* (Applied Biosystems), utilizando las sondas *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) para determinar la expresión de cada uno de los marcadores con respecto a la de un gen de expresión constitutiva, *β2M*, y que sirve de referencia endógena para controlar la diferencia entre el RNA extraído y el cDNA sintetizado. Las referencias de las sondas utilizadas son: Hs00167057\_m1 (*DCX*), Hs00165941\_m1 (*TH*), Hs00921342\_m1 (*PHOX2B*) y Hs00984230\_m1 (*β2M*).

Cada reacción de amplificación tuvo lugar en una placa de 96 pocillos en la que cada pocillo contenía un total de 25 μL; siendo 4μL de muestra de cDNA y los 21μL restantes de *PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y de las sondas fluorescentes que permiten la visualización de cada marcador. Las muestras se evaluaron por triplicado para cada uno de los cuatro genes analizados (*TH*, *DCX*, *PHOX2B* y *β2M*) y se empleó en todos los casos un control positivo.

El programa utilizado para la amplificación fue el siguiente:

1. 2 minutos a 50°C, para optimizar la actividad de la UNG.
2. 10 minutos a 95°C, para activar la DNA polimerasa *AmpliTaq Gold* y desactivar la UNG.
3. 40 ciclos de amplificación de dos pasos, un paso de 15 segundos a 95°C y otro de 1 minuto a 60°C.
4. 2 minutos de incubación a 4°C para detener la reacción.

Para normalizar los valores de expresión de cada marcador se utilizó la fórmula del  $\Delta CT$ :

$$\Delta CT = CT[TH, DCX, PHOX2B] - CT[\beta 2M]$$

Al valor medio de CT de cada marcador se resta el valor medio de CT de *β2M* para cada muestra. Se consideran positivas aquellas muestras en las que al menos dos de las réplicas muestran un valor de CT inferior a 40, aplicando un valor de *Threshold* de 0,08.

#### 4.5. Análisis estadísticos

Para contrastar la posible asociación entre la detección de los diferentes marcadores en sangre periférica y en médula ósea, y la supervivencia, tanto global como libre de eventos, se utilizaron modelos de regresión de *Cox*. La supervivencia libre de eventos (SLE) se define como el tiempo transcurrido desde la fecha de diagnóstico hasta el momento que se produce una recaída, progresión tumoral o *éxitus*, mientras que la supervivencia global (SG) se define como el tiempo transcurrido hasta la muerte o última revisión del paciente. Los *p-values* menores que 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Para determinar el valor pronóstico independiente de la detección de los biomarcadores en sangre periférica y médula ósea se realizó un modelo de regresión de *Cox* penalizada (*Cox-elastic-net*) que incluía variables de conocido valor pronóstico como el estatus de *MYCN* y de 11q, el estadio tumoral y la edad al diagnóstico. Todos los análisis se realizaron mediante el software R (versión 3.4.0).



## 5. Resultados

La cohorte de estudio consistió en 73 pacientes con neuroblastoma no metastásico estadio L2 (según el sistema de estadiaje del *INRG*). De acuerdo a la clasificación del *INSS*, 15 pacientes eran estadios 2 y 58 estadios 3. Los tumores primarios se localizaban fundamentalmente en el abdomen (43,8%), las glándulas suprarrenales (20,6%) y, en menor número, en el tórax (11%) y en la zona cervical (6,9%). Más de la mitad de los pacientes fueron diagnosticados antes de los 18 meses de edad (60,3%), mientras que en el 39,7% de los casos, los pacientes tenían más de un año y medio en el momento del diagnóstico. La cohorte de estudio estaba formada por 44 hembras y 39 varones, de los cuales el 19,2% presentaba amplificación del gen *MYCN* y el 5,5% ganancia de dicho oncogén. Sólo el 9,6% de los pacientes presentaban tumores con delección en el brazo largo del cromosoma 11. De toda la cohorte de estudio, 13 pacientes presentaron recaídas (8,2% locales, 6,8% metastásicas y 2,7% locales y metastásicas), y el 6,8% de los mismos fallecieron por progresión de la enfermedad (Tabla 3).

**Tabla 3.** Datos clínicos y biológicos de la cohorte de estudio.

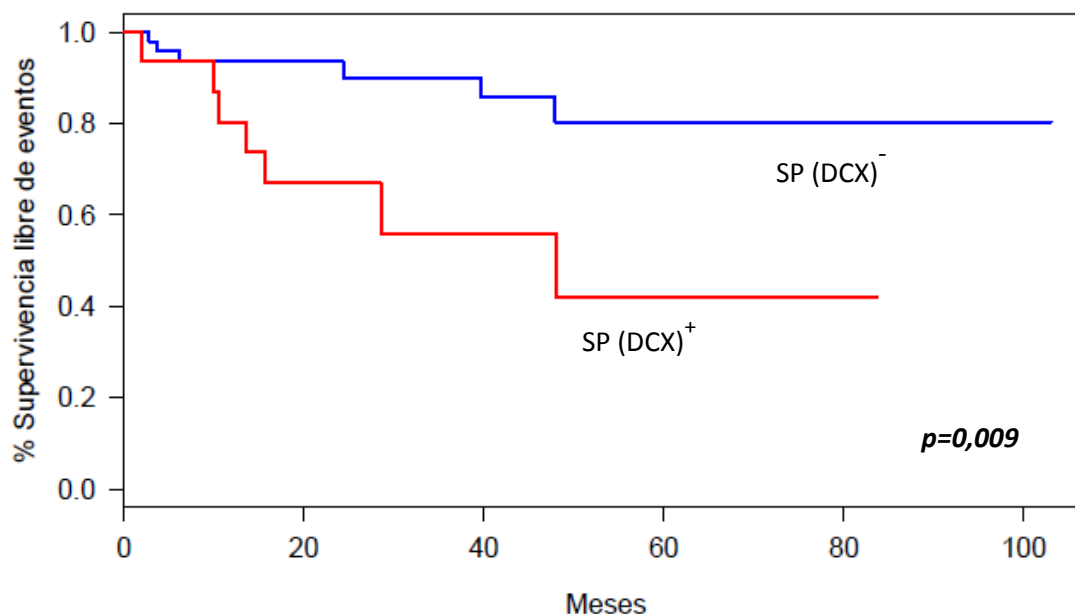
NB L2 (INRGSS)			
Características	Estadios (INSS)		
	2	3	Total
<b>Número de pacientes</b>	15	58	73
<b>Localización del tumor primario</b>			
Suprarrenal	3	12	15
Abdominal	5	27	32
Cervical	2	3	5
Torácica	3	5	8
Cervico-torácica	1	4	5
Toraco-abdominal	0	3	3
Pélvica	1	3	4
Otros sitios	0	1	1
<b>Edad al diagnóstico</b>			
Mayores de 18 meses	4 (26,7%)	25 (43,1%)	29 (39,7%)
Menores de 18 meses	11 (73,3%)	33 (56,9%)	44 (60,3%)
<b>Sexo</b>			
Hembra	5 (33,3%)	34 (58,6%)	39 (53,4%)
Varón	10 (66,7%)	24 (41,4%)	34 (46,6%)
<b>Estado de MYCN</b>			
Amplificado (%)	2 (13,3%)	12 (20,7%)	14 (19,2%)
No amplificado (%)	12 (80%)	43 (74,1%)	55 (75,3%)
Ganancia (%)	1 (6,7%)	3 (5,2%)	4 (5,5%)
<b>Estado de 11q</b>			
Delecionado (%)	2 (13,3%)	5 (8,6%)	7 (9,6%)
No delecionado (%)	12 (80%)	46 (79,3%)	58 (79,5%)
No informado (%)	1 (6,7%)	7 (12,1%)	8 (10,9%)
<b>Recaídas</b>			
Local (%)	0 (0,0%)	6 (10,3%)	6 (8,2%)
Metastásica (%)	0 (0,0%)	5 (8,6%)	5 (6,8%)
Local + metastásica (%)	1 (6,7%)	1 (1,7%)	2 (2,7%)
<b>Exitus</b>			
Porcentaje (%)	1 (6,7%)	4 (6,9%)	5 (6,8%)

Se analizó la expresión relativa de *TH*, *DCX* y *PHOX2B* mediante RT-qPCR en 67 muestras de sangre periférica y 70 aspirados de médula ósea obtenidos en el momento del diagnóstico. Se detectó expresión génica de *TH* y *DCX* en el 24% de las muestras de sangre periférica y de *PHOX2B* en el 28% de ellas. En médula ósea, se detectó la expresión de *TH* en el 44% de los casos, *DCX* en el 46% y *PHOX2B* en el 41% de las muestras. Los datos relacionados con la detección de expresión de los marcadores se reflejan en la tabla 4.

**Tabla 4.** Datos de expresión de *TH*, *DCX* y *PHOX2B* detectados en sangre periférica y médula ósea en la cohorte de neuroblastomas no metastásicos.

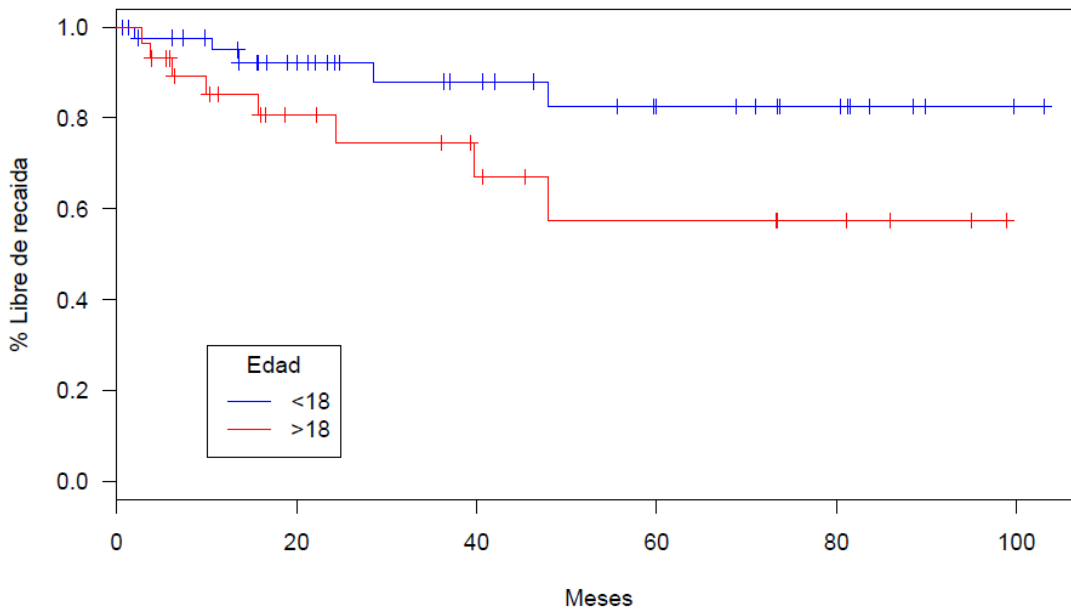
MARCADORES	SANGRE PERIFÉRICA		MÉDULA ÓSEA	
	positivas (%)	mediana	positivas (%)	mediana
<i>TH</i>	16 (24%)	17,8	31 (44%)	15,3
<i>DCX</i>	16 (24%)	19,2	32 (46%)	17,2
<i>PHOX2B</i>	19 (28%)	17,5	29 (41%)	16

Para determinar el valor pronóstico de la detección de enfermedad mínima al diagnóstico en los pacientes con enfermedad localizada estadio L2, se evaluó el efecto de la detección de la expresión de los marcadores, tanto en sangre periférica como en médula ósea, en la SG y SLE de los pacientes. Los resultados de dicho análisis revelan que los pacientes en los que se detecta la expresión génica de *DCX* en sangre periférica tienen más propensión a recaer que aquellos en los que no se detecta la expresión de dicho marcador ( $p=0,009$ ) (Figura 6). El resto de comparaciones con *TH* y *PHOX2B*, tanto en sangre periférica como en médula ósea, incluyendo el análisis de la detección de la expresión conjunta de los tres marcadores, no arrojaron resultados estadísticamente significativos.

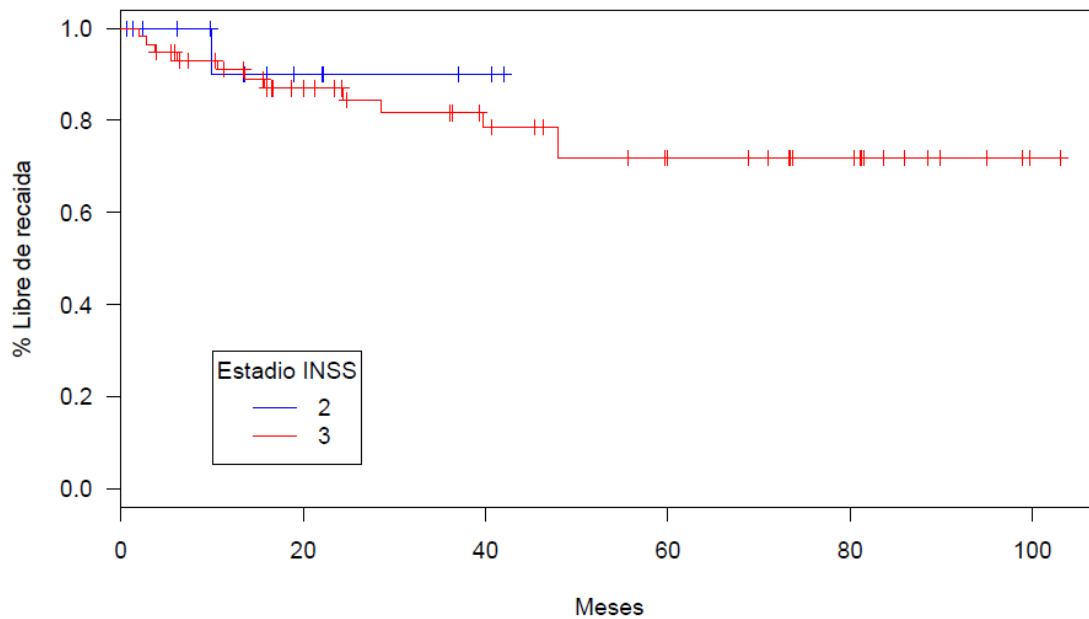


**Figura 6.** Efecto de la detección de la expresión de *DCX* en sangre periférica en la supervivencia libre de eventos de la cohorte de NB no metastásicos. SP: sangre periférica.

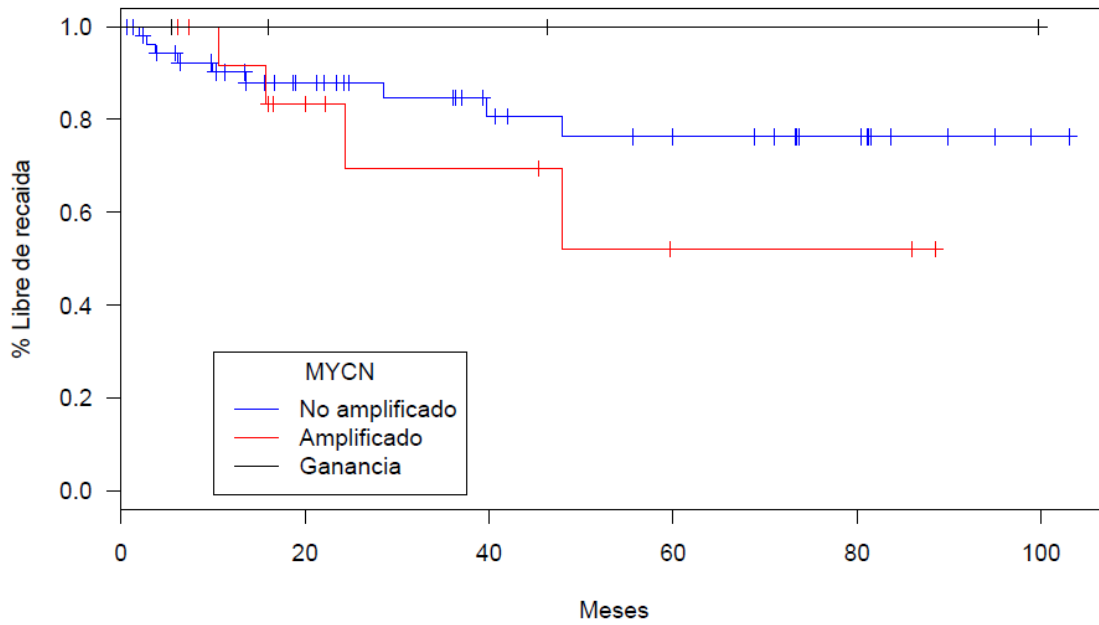
Se comparó el efecto en la supervivencia de otros factores de conocido valor pronóstico en neuroblastoma como: la edad, el estadio tumoral según el *INSS*, y el estatus de *MYCN* y de 11q. Los resultados de este análisis revelaron que aquellos pacientes con NB en estadio 3, mayores de 18 meses, con *MYCN* amplificado y 11q delecionado, tienen tasas de supervivencia inferiores a los NB estadios 2, menores de 18 meses, con *MYCN* no amplificado y 11q no delecionado (Figuras 7, 8, 9 y 10). No obstante, es necesario aumentar el tamaño muestral para evaluar la potencia estadística de estos resultados.



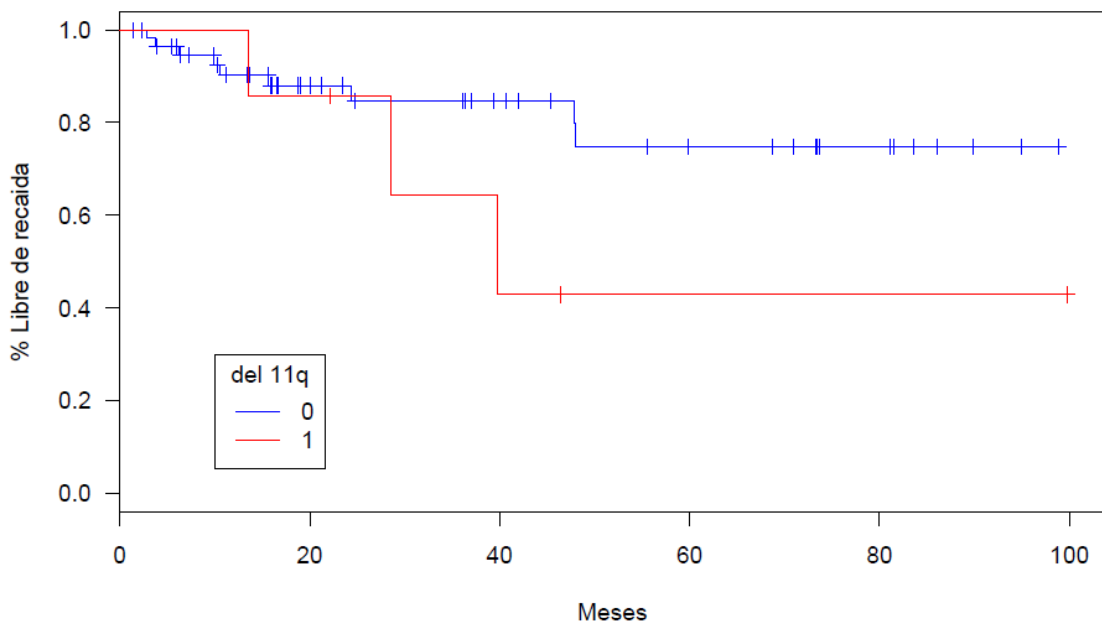
**Figura 7.** Efecto del estadio 2 o 3 (según el *INSS*) en la supervivencia libre de eventos.



**Figura 8.** Efecto de la edad, mayor o menor de 18 meses, en la supervivencia libre de eventos.



**Figura 9.** Efecto del estado de *MYCN* (no amplificado, amplificado o ganado) en la supervivencia libre de eventos.



**Figura 10.** Efecto del estado del cromosoma 11q (delecionado o no) en la supervivencia libre de eventos.

Finalmente, se realizó un modelo de regresión de Cox penalizada para evaluar el valor pronóstico independiente de la detección de *DCX* en sangre periférica. En este modelo se incluyen como covariables el estatus de *MYCN*, la delección de 11q, la edad (mayor o menor de 18 meses), y el estadio tumoral (2 o 3 según el *INSS*). En la tabla 5 se muestran los resultados de dicho análisis, el coeficiente para cada variable como su respectivo *hazard ratio* (HR), el cual no es más que el exponencial del coeficiente de regresión.

**Tabla 5.** Modelo de regresión de Cox penalizada (*Cox-elastic-net*).

<b>Variable</b>	<b>Coeficiente</b>	<b>HR</b>
Edad	0,02	1,02
Amplificación de <i>MYCN</i>	0,499	1,65
Ganancia de <i>MYCN</i>	0	1
Delección de 11q	0,34	1,41
Estadio tumoral	0	1
Expresión de <i>DCX</i> en sangre	0,056	1,06

Los resultados del modelo de regresión muestran que la detección de la expresión de *DCX* al diagnóstico tiene valor pronóstico independiente y que la amplificación de *MYCN* (0,499) y la delección de 11q (0,34) son las variables con valor pronóstico que mayor efecto tienen en la supervivencia de los pacientes, seguido de la detección de la expresión de *DCX* en sangre periférica (0,056) y de la edad al diagnóstico (0,02).

## 6. Discusión

En neuroblastomas localizados continúa siendo difícil la identificación de casos que requieren especial atención, sobre todo los estadios L2, grupo clínica y biológicamente heterogéneo en el que, aunque infrecuentes, se producen recaídas metastásicas. El actual sistema de estratificación de los neuroblastomas en grupos de riesgo pre-tratamiento, tiene en cuenta además de factores clínicos e histopatológicos, factores biológicos como la amplificación del oncogén *MYCN*, la deleción de 11q y cambios en el contenido del DNA o en el número de cromosomas. No obstante existen casos en los que no se dan dichos factores de riesgo y los pacientes recaen y fallecen a causa de la enfermedad. Teniendo en cuenta que la presencia de células tumorales circulantes en sangre periférica y médula ósea de pacientes con tumores sólidos, incluyendo el neuroblastoma, se ha correlacionado con mal pronóstico (Swartz *et al.*, 1999; Steen *et al.*, 2008; Mocellin *et al.*, 2006), la detección de la expresión de marcadores de EMR podría ayudar a identificar pacientes con enfermedad localizada con un mayor riesgo de recaídas, en los que serían necesarias nuevas estrategias terapéuticas.

Diversos estudios han revelado el valor pronóstico de la detección de EM y EMR en neuroblastomas metastásicos de alto riesgo. En este grupo de pacientes, la detección de mRNA de *TH* y de otros biomarcadores de neuroblastoma como *DCX* en sangre periférica y médula ósea al diagnóstico es un indicador de mal pronóstico, pues su detección se asocia con un mayor riesgo de recaída y *éxitus* (Reynolds, 2004; Burchil *et al.*, 2001, Fukuda *et al.*, 2001; Tchirkov *et al.*, 2003, Träger *et al.*, 2008). Recientemente, el Grupo Europeo de Monitorización Molecular de SIOPEN realizó un estudio multicéntrico internacional en el que se refleja que altos niveles de expresión génica de *TH* y *PHOX2B* en sangre periférica permiten identificar pacientes de ultra alto riesgo, los cuales deberían beneficiarse de nuevas estrategias de tratamiento (Viprey *et al.* 2014). Dicho estudio además postula que *TH*, *DCX* y *PHOX2B* son biomarcadores idóneos para la detección de EMR en neuroblastoma y que altos niveles de expresión de los mismos se asocia, de manera independiente a otros factores de riesgo, con una peor supervivencia de los pacientes. Otro estudio más reciente del grupo cooperativo español en los estudios de neuroblastoma de la SEHOP (Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica), describe que la detección de la expresión de *TH* en sangre periférica, así como la detección de expresión de *DCX* en médula ósea al diagnóstico, predicen una peor supervivencia de los pacientes independientemente del estatus de *MYCN* y la edad de los pacientes al debutar con la enfermedad, por lo que la determinación del nivel de expresión de los marcadores de EM al diagnóstico, tanto en sangre periférica como en médula ósea, sería de gran utilidad para optimizar el actual sistema de estratificación de los pacientes en grupos de riesgo y adecuar mejor el tratamiento. Así mismo, este y otros estudio europeos refuerzan la utilidad de la detección de los marcadores de EMR al finalizar la quimioterapia de inducción y al finalizar el tratamiento en los neuroblastomas de alto riesgo, para evaluar la respuesta al tratamiento y el estado de remisión de los pacientes (Yáñez *et al.*, 2016; Viprey *et al.*, 2014).

En neuroblastomas localizados existen pocos estudios enfocados a determinar el valor pronóstico y la utilidad clínica de la detección de EM y EMR. En este grupo de pacientes, los NB estadios 1 y 2 presentan altas tasas de supervivencia y las recaídas son bastante infrecuentes (Pérez *et al.*, 2000; De Bernardi *et al.*, 2008, Yáñez *et al.*, 2011). Los NB estadio 3, en cambio, pueden presentar un comportamiento más agresivo que generalmente está asociado a la edad

de los pacientes en el momento del diagnóstico y a la presencia de alteraciones genéticas en el tumor. No obstante, hay pacientes sin estos factores de riesgo conocidos que presentan recaídas metastásicas y que fallecen por progresión de la enfermedad.

Otro estudio del grupo cooperativo español en los estudios de neuroblastoma de la SEHOP revela que la detección de la expresión génica de *TH* y *DCX* al diagnóstico en sangre periférica de neuroblastomas no metastásicos, predice una peor supervivencia libre de eventos. Al separar a los pacientes por estadios, en los L1 (estadios 1 o 2 según el *INSS*), la detección de EM no parece tener valor pronóstico (Yáñez *et al.*, 2011). Sin embargo, los neuroblastomas estadios L2 en los que se detectan los marcadores en sangre periférica, muestran una mayor propensión a sufrir recaídas pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además en este trabajo tampoco se pudo esclarecer el valor pronóstico independiente de la detección de los marcadores al diagnóstico por el limitado número de pacientes de la serie en los que se detectaba la expresión de los marcadores.

Con todo lo expuesto, el presente trabajo estaba enfocado a evaluar el valor pronóstico independiente de la detección de EM en sangre periférica y médula ósea al diagnóstico. Para ello se estudió una serie de 73 pacientes con NB no metastásico estadio L2. Las tasas de supervivencia libre de eventos y global se corresponden con las esperadas en pacientes con enfermedad localizada (De Bernardi *et al.*, 2008), sólo el 18% presentó recaídas y el 7% falleció por progresión de la enfermedad. La frecuencia de detección de los marcadores en sangre periférica fue baja (inferiores al 30%) y ligeramente superior en médula ósea (aproximadamente del 43%). Los resultados de los análisis de supervivencia y los modelos de regresión que incluían factores de conocido valor pronóstico, revelan que la detección de expresión de *DCX* al diagnóstico en sangre periférica se asocia a una peor supervivencia libre de eventos de los NB no metastásicos L2, lo que refleja la propensión a la diseminación de la enfermedad por vía hematológica. Cabe destacar la ventaja que supone que la detección de enfermedad mínima al diagnóstico en sangre periférica tenga valor pronóstico por la facilidad de obtención de estas muestras, siendo un proceso poco invasivo en comparación con la realización de aspirados medulares.

Al analizar cómo afecta a la supervivencia global y libre de eventos la detección de la expresión *TH* y *PHOX2B*, tanto en sangre periférica como en médula ósea, así como la expresión conjunta de los tres, no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos. Teniendo en cuenta que la frecuencia de detección de los marcadores en este subgrupo de pacientes en el momento del diagnóstico es baja, en comparación a pacientes con enfermedad metastásica, en los que la frecuencia de detección de los marcadores es de alrededor de un 70% en SP y de más de un 86% en MO (Yáñez *et al.*, 2016), es necesario aumentar la serie de pacientes para valorar la relevancia estadística de estos resultados y elucidar el significado clínico de la detección de los tres marcadores tanto en sangre periférica como en médula ósea. En el modelo de regresión de Cox penalizada se confirmó el valor pronóstico independiente de la detección de *DCX* en sangre periférica al diagnóstico así como la de otros factores de riesgo ya conocidos en neuroblastoma como la amplificación de *MYCN*, la delección de 11q y la edad al diagnóstico, lo cual apoya la validez del mismo .

En resumen, la detección de la expresión de marcadores de EM en sangre periférica de pacientes con NB no metastásico predice una peor supervivencia libre de eventos de los pacientes. No obstante, es necesario continuar investigando en estudios multicéntricos cooperativos internacionales para poder esclarecer la utilidad clínica la detección de los marcadores de EMR en este subgrupo de pacientes. La evaluación de la EMR durante el curso de la enfermedad y al finalizar el tratamiento en estos pacientes podría ser de gran utilidad a la hora de tomar decisiones terapéuticas y para valorar el estatus de remisión de los pacientes.



## 7. Conclusiones

Tras el trabajo de investigación realizado y en base a los resultados obtenidos, se puede concluir que:

1. En neuroblastomas no metastásicos estadíos L2, la detección de la expresión génica de *DCX* en sangre periférica y no en médula ósea al diagnóstico, predice de manera independiente una peor supervivencia libre de eventos de los pacientes.
2. No se encontraron evidencias de que la detección de expresión de *TH* o *PHOX2B* al diagnóstico, así como la expresión conjunta de los tres biomarcadores, ni en sangre periférica ni en médula ósea, tenga valor pronóstico. No obstante, se considera que aumentar la serie de pacientes y el número de muestras analizadas permitirá esclarecer el valor pronóstico de la detección de la expresión de *TH*, *DCX* y *PHOX2B* al diagnóstico en NB no metastásicos estadíos L2.
3. En esta serie de pacientes se comprobó que los NB estadíos 3, mayores de 18 meses, con *MYCN* amplificado y 11q deleciónado, muestran una tendencia a una peor supervivencia libre de eventos que los NB estadíos 2, menores de 18 meses, con *MYCN* no amplificado y 11q no deleciónado. No obstante, es necesario aumentar el tamaño muestral para evaluar la potencia estadística de estos resultados.
4. El valor pronóstico de la detección de los marcadores de EMR y su significado clínico debe ser evaluado en estudios multicéntricos internacionales con el fin de elucidar si la detección o los niveles de expresión de los marcadores ayuda a identificar pacientes con enfermedad localizada con un mayor riesgo de recaídas y definir nuevos enfoques terapéuticos que mejoren la supervivencia de los mismos.

## 8. Referencias

AMBROS I.M., BERNARD J., BOAVIDA M., *et al.* 2003. Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification. *J Clin Oncol.* 21:2077-2084.

AMBROS P.F., AMBROS I.M., BRODEUR G.M, *et al.* 2009. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer.* 100(9):1471-82.

ARIAD PHARMACEUTICALS. *A Phase 3 Multicenter Open-label Study of Brigatinib (AP26113) Versus Crizotinib in Patients With ALK-positive Advanced Lung Cancer.* ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02737501. Last verified: January 2017.

ATTIYEH E.F., LONDON W.B., MOSSE Y.P., *et al.* 2005. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Eng J Med.* 353(21):2243-53.

BEISKE K., BURCHILL S.A., CHEUNG I.Y., *et al.* 2009. Consensus criteria for sensitive detection of minimal neuroblastoma cells in bone marrow, blood and stem cells preparations by immunocytology and QRT-PCR: recommendations by the International Neuroblastoma Risk Group Task Force. *Br J Cancer.* 100:1627-1637.

BELL E., CHEN L., LUI T., *et al.* 2010. *MYCN* oncoprotein targets and their therapeutical potential. *Cancer Lett.* 293:144-157.

BOWN N., COTTERILL S., LASTOWSKA M., *et al.* 1999. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med.* 340(25):1954-61.

BRODEUR G.M. 2003. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer.* 3(3):203-16.

BRODEUR G.M. & MARIS J.M. 2002. *Neuroblastoma.* In Pizzo PA, Poplak DG (eds). Principles and Practice of Pediatric Oncology, 4<sup>th</sup>edn. Philadelphia: JB Lippincott Co; 895-938.

BRODEUR G.M., SEEGER R.C., BARRETT A., *et al.* 1993. Revisions of the international criteria for diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol.* 11:1466–1477.

BRODEUR G.M., SEEGER R.C., BARRETT A., *et al.* 1988. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 6:1874–1881.

BRODEUR G.M., SEEGER R.C., SCHWAB M., *et al.* 1984. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science.* 224:1121–1124.

BURCHILL S.A., LEWIS I.J., ABRAMS K.R., *et al.* 2001. Circulating neuroblastoma cells detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA are an independent poor prognostic indicator. *J Clin Oncol.* 19:1795-1801.

BURCHILL S.A. & SELBY P. 1999. Early detection of circulating solid tumour cells using molecular technology. *Cancer Topics.* 10:1-4.

- BURCHILL S.A., SELBY P. 2000. Molecular detection of low-level disease in patients with cancer. *J Pathol.* 190:6-14.
- CARÉN H., KRYH H., NETHANDER M., *et al.* 2010. High-risk neuroblastoma tumors with 11q-deletion display a poor prognostic, chromosome instability phenotype with later onset. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(9):4323-8.
- CARON H. 1995. Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 24:215–222.
- CARON H., VAN SLUIS P., DE KRAKER J., *et al.* 1996. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavourable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med.* 334:225-230.
- CARON H., VAN SLUIS P., VAN ROY N., *et al.* 1994. Recurrent 1; 17 translocations in human Neuroblastoma reveal nonhomologous mitotic recombination for loss of heterozygosity. *Am J Hum Genet.* 55: 341-347.
- CHEUNG I.Y. & CHEUNG N.K. 2001. Quantification of marrow disease in neuroblastoma by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Cancer Res.* 7:1698–1705.
- CHEUNG I.Y., FENG Y., GERALD W., *et al.* 2008. Exploiting gene expression profiling to identify novel minimal residual disease markers of neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 14:7020-7027.
- CHEUNG N.K., HELLER G., KUSHNER B.H., *et al.* 1997. Detection of metastatic neuroblastoma in bone marrow: when is histology routine intensive? *J Clin Oncol.* 15(8):2807-2817.
- CHEUNG N.K., SAARINEM U.M., NEELY J.E., *et al.* 1985. Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 45:2642-2649.
- CHRISTIANSEN H., LAMPERT F. 1998. Tumour karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma. *Br J Cancer.* 57:121–126.
- COHN S.L., PEARSON A.D., LONDON W.B., *et al.* 2009. The international neuroblastoma risk group (INRG) classification system: an INRG task force report. *J Clin Oncol.* 27:289–297.
- CORRIAS M.V., HAUPT R., CARLINI B., *et al.* 2012. Multiple target molecular monitoring of bone marrow and peripheral blood samples from patients with localized neuroblastoma and healthy donors. *Pediatr Blood Cancer.* 58:43-49.
- DE BERNARDI B., MOSSERI V., RUBIE H., *et al.* 2008. Treatment of localised resectable neuroblastoma. Results of the LNESG I study by the SIOP Europe Neuroblastoma Group. *Br J Cancer.* 99:1027-1033.
- EVANS A.E. & D'ANGIO G.J. 2005. Age at diagnosis and prognosis in children with neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 23:6443-6444.
- FAULKNER L.B., TINTORI V., TAMBURINI A., *et al.* 1998. High sensitivity immunocytologic analysis of neuroblastoma cells in paired blood and marrow samples. *J Hematother.* 4:361-366.

FUKUDA M., MIYAJIMA Y., MIYASHITA Y., *et al.* 2001. Disease outcome may be predicted by molecular detection of minimal residual disease in bone marrow in advanced neuroblastoma: a pilot study. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 23(1):10-13.

GEORGE R.E., LONDON W.B., COHN S.L., *et al.* 2005. Hyperdiploidy plus non amplified *MYCN* confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 23(27):6466-73.

GLEESON J.G., LIN P.T., FLANAGAN L.A. *et al.* 1999. Doublecortin is a microtubule associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*. 23:257–271.

HENRICH K.O., BAUER T., SCHULTE J., *et al.* 2001. CAMTA1, a 1p36 tumor suppressor candidate, inhibits growth and activates differentiation programs in neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 71(8):3142-51.

JANOUEIX-LEROSEY I., LEQUIN D., BRUGIERES I., *et al.* 2008. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*. 455:967-970.

KANEKO Y., KNUDSON A.G. 2000. Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma. *Genes Chromosomes & Cancer*. 29(2):89-95.

KUÇI Z., SEITZ G., KUÇI S., *et al.* 2006. Pitfalls in detection of contaminating neuroblastoma cells by tyrosine hydroxylase RT-PCR due to catecholamine-producing hematopoietic cells. *Anticancer Res*. 26:2075-2080.

KUSHNER B.H., GILBERT F & HELSON L. 1996. Familial Neuroblastoma. *Cancer*. 57:1887-11893.

LAMBOUY L.H., GIDDING C.E., VAN DEN HEUVEL L.P., *et al.* 2003. Real-time analysis of TH gene expression: a sensitive and semiquantitative marker for minimal residual disease detection of neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. 9:812–819.

LASTOWSKA M., COTERIL S., PEARSON A.D., *et al.* 1997. Gain of chromosome arm 17q predicts unfavourable outcome in Neuroblastoma patients. *Eur Cancer*. 33: 1627-1633.

LONDON W.B., CASTLEBERRY R.P., MATTHAY K.K., *et al.* 2005. Evidence for an age cut-off greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the children's oncology group. *J Clin Oncol*. 23(27):6459–6465.

LOOK A.T., HAYES F.A., SHUSTER J.J., *et al.* 1991. Clinical relevance of tumour cells ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a pediatric oncology group study. *J Clin Oncol*. 9:581–591.

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

MARIS J.M., HOGARTY M.D., BAGATELL R., *et al.* 2007. Neuroblastoma. *Lancet*. 369(9579):2106-20.

M.D. ANDERSON CANCER CENTER. *A Phase I Trial of Sorafenib (CRAF, BRAF, KIT, RET, VEGFR, PDGFR Inhibitor) or Crizotinib (MET, ALK, ROS1 Inhibitor) in Combination With Vemurafenib*

(*BRAF Inhibitor*) in Patients With Advanced Malignancies. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01531361. Last verified: March 2017.

MOCELLIN S., KEILHOLZ U., ROSSI C.R., *et al.* 2006. Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers. *Trends Mol Med.* 12:130-139.

MOLENAAR J.J., KOSTER J., ZWIJNENBURG D.A., *et al.* 2012. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature.* 483:589-593.

MONCLAIR T., BRODEUR G.M., AMBROS P.F., *et al.* 2009. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* 27(2):298-303.

MOSS J, SANDERS DG. 1990. Detection of neuroblastoma cells in blood. *J Clin Oncol.* 8:736-740.

MOSSE Y.P., DISKIN S.J., WASSERMAN N., *et al.* 2007. Neuroblastomas have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional expression. *Genes, chromosomes & cancer.* 46:936-949.

OLTRA S., MARTÍNEZ F., ORELLANA C., *et al.* 2005. The doublecortin gene, a new molecular marker to detect minimal residual disease in neuroblastoma. *Diagn Mol Pathol.* 14(1):53-57.

OOTSUKA S., ASAMI S., SASAKI T., *et al.* 2008. Useful markers for detecting minimal residual disease in cases of neuroblastoma. *Biol Pharm Bull.* 31:1071-1074.

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

PATTYN A., MORIN X., CREMER H., *et al.* 1999. The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature.* 399(6734):366-370.

PEREZ C., MATTHAY K., ATKINSON J., *et al.* 2000. Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a children's cancer group study. *J Clin Oncol.* 18(1):18-26.

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

PUGH T.J., MOROZOVA O., ATTIYEH E.F., *et al.* 2013. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nature genetics.* 45:279-284.

REYNOLDS C.P. 2004. Detection and treatment of minimal residual disease in high-risk neuroblastoma. *Pediatr Transplant.* 8(5):56-66.

RUBIE H., DE BERNARDI B., GERRARD M., *et al.* 2011. Excellent outcome with reduced treatment in infants with non-metastatic and unresectable neuroblastoma without *MYCN* amplification: results of the prospective INES 99.1. *J Clin Oncol.* 29(4):449-455.

SAVELYEVA L., CORVI R., SCHWAB M. 1994. Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells. *Am J Hum Genet.* 55(2):334-40.

SEEGER R.C., BRODEUR G.M, SATHER H., *et al.* 1985. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med.* 313:1111–1116.

SCHLEIERMACHER G., MOSSERI V., LONDON W.B., *et al.* 2012. Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project. *Br J Cancer.* 107:1418-1422.

SCHNEIDERMAN J., LONDON W.B., BRODEUR G.M., *et al.* 2008. Clinical significance of MYCN amplification and ploidy in favorable-stage neuroblastoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 26(6):913-18.

SHIMADA H., AMBROS I.M., DEHNER L.P., *et al.* 1999a. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer.* 86:364-372.

SHIMADA H., AMBROS I.M., DEHNER L.P., *et al.* 1999b. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the international neuroblastoma pathology committee. *Cancer.* 86(2):349–363.

SPITZ R., HERO B., SIMON T, *et al.* 2006. Loss in chromosome 11q identifies tumors with increased risk for metastatic relapses in localized and 4S neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 12(11): 3368–3373.

STEEN S., NEMUNAITIS J., FISHER T., *et al.* 2008. Circulating tumor cells in melanoma: a review of the literature and description of a novel technique. *Bayl Univ Med Cent.* 21:127-132.

STUTTERHEIM J., GERRITSEN A., ZAPPEIJ-KANNEGIETER L., *et al.* 2008. PHOX2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma. *J ClinOncol.* 26:5443-5449.

SWARTZ M.A., KRISTENSEN C.A., MELDER R.J., *et al.* 1999. Cells shed from tumours show reduced clonogenicity, resistance to apoptosis, and in vivo tumorigenicity. *Br J Cancer.* 81:756-759.

TCHIRKOV A., PAILLARD C., HALLE P., *et al.* 2003. Significance of molecular quantification of minimal residual disease in metastatic neuroblastoma. *Journal of hematotherapy & stem cell research.* 12(4):435-442.

THEISSEN J., OBERTHUER A., HOMBACH A., *et al.* 2014. Chromosome 17/17q gain and unaltered profiles in high resolution array-CGH are prognostically informative in neuroblastoma. *Genes, chromosomes & cancer.* 53:639-649.

TRÄGER C., VERNBY A., KULLMAN A., *et al.* 2008. mRNAs of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase but not of GD2 synthase are specific for neuroblastoma minimal disease and predicts outcome for children with high-risk disease when measured at diagnosis. *Int J cancer.;* 123:2849-2855.

TROCHET D., BOURDEAUT F., JANOUEIX-LEROSEY I., *et al.* 2004. Germline mutations of the paired-like homeobox 2b (*phox2b*) gene in neuroblastoma. *The American Journal of Human Genetics.* 74(4):761-764.

VAN ROY N., LAUREYS G., CHENG N.C., *et al.* 1994. 1;17 translocations and other chromosome 17 rearrangements in human primary neuroblastoma tumors and cell lines. *Genes Chromosomes & Cancer*. 10(2):103-14.

VIPREY V.F., LASTOWSKA M.A., CORRIAS M.V., *et al.* 2008. Minimal disease monitoring by QRT-PCR: guidelines for identification and systematic validation of molecular markers prior to evaluation in prospective clinical trials. *J Pathol*. 216:245–252.

VIPREY V.F., GREGORY W.M., CORRIAS M.V., *et al.* 2014. Neuroblastoma mRNAs predict outcome in children with stage 4 neuroblastoma: a European HR-NBL1/SIOPEN study. *J Clin Oncol*. 32:1074-1083.

WHITE P.S., THOMPSON P.M., GOTOH T., *et al.* 2005. Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma. *Oncogene*. 24:2684-2694.

YÁÑEZ Y., GRAU E., OLTRA S., *et al.* 2011. Minimal disease detection in peripheral blood and bone marrow from patients with non-metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 137(8):1263-1272.

YÁÑEZ Y., HERVÁS D., GRAU E., *et al.* 2016. *TH* and *DCX* mRNAs in peripheral blood and bone marrow predict outcome in metastatic neuroblastoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 142(3):573-80.