

**IDENTIFICACIÓN DE GENES CON VALOR
PRONÓSTICO EN TUMORES NEUROBLÁSTICOS
INFANTILES**

PREMIO PROF. ANTONIO MARTÍNEZ VALVERDE 2008

LEMA: *Carassius auratus*

ÍNDICE

Resumen	3
Introducción y justificación del estudio	4
Objetivos	16
Materiales y métodos	17
Resultados	21
Discusión.....	31
Conclusiones.....	37
Bibliografía	38

RESUMEN

El neuroblastoma es un tumor de origen embrionario que se desarrolla durante la vida fetal o postnatal temprana a partir de células inmaduras de la cresta neural, siendo el tumor sólido maligno más frecuente en la infancia. La mortalidad es muy elevada, oscilando entre el 30 y el 60%, aun con la aplicación de los tratamientos más agresivos de quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia. A pesar de esta mortalidad global, el pronóstico es sumamente variable, y depende de diversos factores biológicos y genéticos aún poco conocidos. En este estudio, hemos analizado mediante microarray 10 tumores neuroblásticos pediátricos malignos (neuroblastoma), 10 tumores neuroblásticos pediátricos benignos (ganglioneuroma) y 10 muestras de tejido no tumoral pediátrico (médula ósea normal). Los resultados del análisis nos permitieron detectar un grupo numeroso de genes relacionados con la proliferación celular y la metástasis en el grupo de tumores malignos, siendo elevada la expresión de genes del sistema inmunitario en los otros tipos de tejido. La utilización de estos genes permite no sólo identificar cada tipo de muestra como neuroblastoma, ganglioneuroma o médula ósea (valor diagnóstico) sino que, además, permite pronosticar la supervivencia de los pacientes pediátricos en base a estos genes (valor pronóstico). Todo ello nos lleva a concluir que la cuantificación de la expresión de determinados genes presenta enorme utilidad clínica potencial, por lo que, si estos resultados se confirman en una cohorte diferente de muestras, esta técnica podría ser considerada durante el proceso diagnóstico y pronóstico de los tumores neuroblásticos infantiles.

INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El neuroblastoma es el tumor sólido maligno más frecuente en la infancia, y representa aproximadamente el 40% de todos los tumores sólidos durante los 4 primeros años de la vida (Castleberry, 1997; Schwab et al., 2003). La prevalencia de esta enfermedad se sitúa en torno a un caso por cada 7000 recién nacidos, lo cual corresponde a aproximadamente 700 casos nuevos al año en Estados Unidos (Brodeur y Maris, 2002) y alrededor de 1200 en Europa. El neuroblastoma es considerado un tumor de origen embrionario que se desarrolla durante la vida fetal o postnatal temprana a partir de células inmaduras de la cresta neural ya comprometidas hacia la línea de diferenciación neuronal pero que, por motivos aún desconocidos, sufren una alteración durante el proceso de diferenciación neuronal normal.

En su conjunto, los neuroblastomas constituyen un grupo muy heterogéneo de tumores en cuanto a sus características morfológicas, genéticas, biológicas y clínicas. Globalmente, la mortalidad de esta enfermedad es muy elevada, oscilando entre el 30 y el 60%, aun con la aplicación de los tratamientos más agresivos de quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia (Brodeur y Maris, 2002; Evans et al., 1976; Schilling et al., 2002). A pesar de esta mortalidad global, el pronóstico es sumamente variable, y depende de diversos factores biológicos y genéticos, entre los que destacan la edad del paciente en el momento del diagnóstico, el estadio clínico en que se encuentre la enfermedad y algunas características biológicas del tumor tales como la amplificación del oncogén *MYCN* (Brodeur y Maris, 2002) o la presencia de mutaciones o aberraciones cromosómicas.

El comportamiento clínico de los neuroblastomas es muy variable, existiendo un amplio espectro que abarca desde la involución o regresión espontánea, hasta la proliferación maligna agresiva, habiéndose descrito casos en los que ocurre una maduración sin progresión tumoral. Las bases biológicas implicadas en la existencia de esta diversidad tumoral aún no se conocen, lo cual dificulta enormemente la comprensión de los fenómenos biológicos implicados en el comportamiento clínico de estos tumores.

En general, los pacientes con neuroblastomas de estadio 4 (esto es, tumor extendido a órganos distantes, sobre todo al hueso) que tienen más de un año de edad en el momento del diagnóstico, así como los tumores de estadio 3 (importante extensión local, pero no existen metástasis a distancia) con amplificación del gen *MYCN* (Figura 1A), presentan un riesgo muy elevado de mortalidad (superior al 60% a pesar del tratamiento). Por el contrario, los niños con tumores de estadios 1, 2, y 3 (correspondientes a tumores loco-regionales, esto es, sin extensión a distancia) sin amplificación del gen *MYCN* (Figura 1B), así como los lactantes (pacientes con menos de 18 meses de edad al diagnóstico) con neuroblastoma de estadio 4S (un estadio especial en el que las metástasis están localizadas únicamente en médula ósea, piel o hígado (Castleberry, 1997; Schwab et al., 2003; Brodeur y Maris, 2002), presentan el riesgo más bajo de mortalidad (menor del 10%). Finalmente, los pacientes lactantes con neuroblastoma estadio 4 y los niños mayores de un año con la enfermedad en estadio 3 pero sin amplificación del gen *MYCN*, constituyen un grupo de riesgo intermedio.

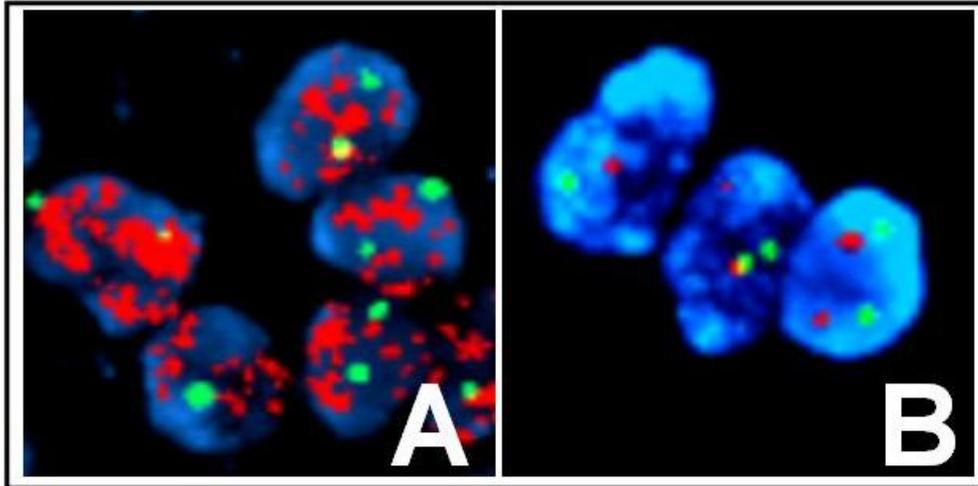


Figura 1. Células neuroblásticas correspondientes a un tumor con amplificación del gen MYCN (A) y a un tumor sin amplificación de este oncogén (B). Ambas muestras tumorales fueron sometidas a técnicas de FISH (hibridación fluorescente in situ), por lo que cada punto rojo corresponde a una copia del gen MYCN y cada punto verde a una copia del centrómero del cromosoma 17 (utilizado como control).

En una proporción sustancial de pacientes (más del 10% de todos los neuroblastomas), el tumor puede experimentar una regresión espontánea completa incluso en ausencia de cualquier intervención terapéutica (Schwab et al., 2003; Herman y Baylin, 2003). La regresión es mucho más frecuente en los tumores de estadio 4S, una enfermedad especial correspondiente a pacientes lactantes cuyo tumor primario se puede extender al hígado, la piel, o la médula ósea (Castleberry, 1997; Schwab et al., 2003; Brodeur y Maris, 2002; Herman y Baylin, 2003). La involución espontánea y la maduración son rasgos típicos del neuroblastoma de estadio 4S y constituyen un fenómeno frecuente y bien documentado (Teitz et al., 2000; Eggert et al., 2001) que también puede aparecer también en un gran número de tumores loco-regionales (van Noesel et al., 2002 y 2003). Finalmente, algunos neuroblastomas se pueden diferenciar

en lesiones benignas, llamadas ganglioneuromas (Mora et al., 2000). Todos estos fenómenos hacen del neuroblastoma un tumor muy interesante desde un punto de vista biológico.

La existencia de neuroblastomas clínicamente aparentes que experimentan una regresión espontánea es un fenómeno biológico de enorme trascendencia clínica (D'Angio et al., 1971). Un dato fundamental que avala este fenómeno de la regresión espontánea es el hecho de que el porcentaje de neuroblastomas localizados en la médula suprarrenal de neonatos fallecidos por causas no tumorales es muy elevado, superando claramente la incidencia de estos tumores en la población general (Beckwith y Perrin, 1963; Hasegawa et al, 1982). El hallazgo frecuente de agregados microscópicos de células inmaduras de la cresta neural (denominados neuroblastomas *in situ*) en autopsias, implica que las lesiones *in situ* evolucionan mayoritariamente hacia la regresión y la maduración de manera espontánea. No se ha determinado todavía si el neuroblastoma que involuciona y el neuroblastoma *in situ* son restos embrionarios persistentes, hiperplasias o neoplasias, pero las evidencias sugieren que existen prerrequisitos genéticos para que la regresión tenga lugar (Ambros et al., 1995; Hiyama et al., 1995; Mora et al., 2000).

Histológicamente, la capacidad de maduración espontánea del neuroblastoma se manifiesta en tres categorías morfológicas: el neuroblastoma indiferenciado (neuroblastos inmaduros), el ganglioneuroblastoma (nivel intermedio de diferenciación neuronal/ganglionar) y el ganglioneuroma (la forma madura de neuroblastoma) (Shimada, 1993). En la mayor parte de los casos, el neuroblastoma está constituido por una abundante población celular

correspondiente a los neuroblastos indiferenciados, los cuales forman rosetas de células pequeñas y redondeadas, con el núcleo prominente (Figura 2A). Por este motivo, los neuroblastomas forman parte de los denominados “tumores de células pequeñas redondas”, de difícil diagnóstico diferencial y mal pronóstico clínico. En contadas ocasiones, sin embargo, el tumor está mayoritariamente compuesto por células estromales, siendo muy escasas las células neuroblásticas (Figura 2B). Este tipo de tumores tienden a un crecimiento autolimitado y suelen asociarse a un pronóstico favorable. Curiosamente, los neuroblastomas con potencial madurativo pueden afectar los ganglios linfáticos locoregionales sin presentar metástasis a distancia (enfermedad loco-regional o neuroblastoma-LR). En la actualidad no es posible determinar con toda precisión qué casos de neuroblastoma evolucionarán como enfermedad loco-regional y cuáles desarrollarán metástasis, por lo que muchos casos de neuroblastoma-LR acaban siendo sometidos a quimio- y/o radioterapia.

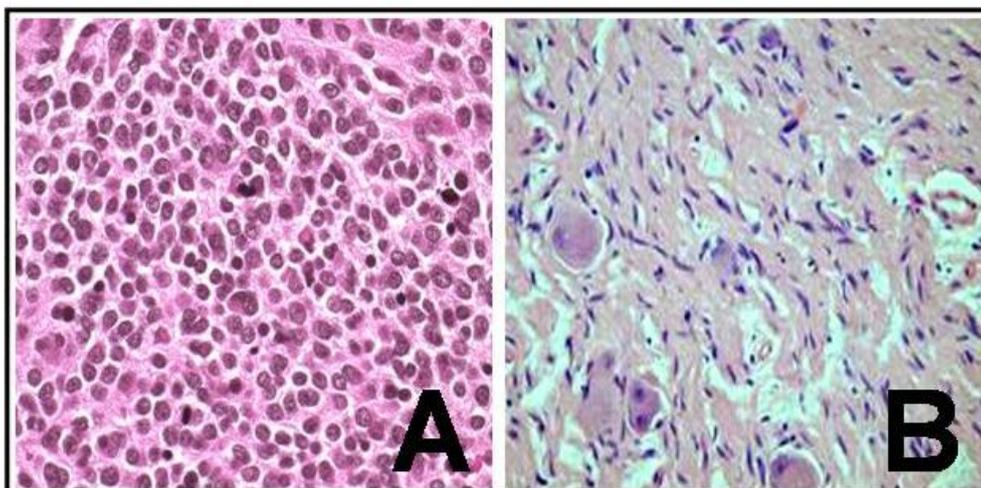


Figura 2. Examen histológico de un neuroblastoma rico en células neuroblásticas (A) y un tumor rico en células estromales (B).

A pesar de lo dicho hasta ahora, la mayoría de los neuroblastomas clínicamente detectables no involucionan ni maduran espontáneamente, sino que se presentan desde el inicio como tumores en estadio avanzado (estadio 4). Habitualmente, estos tumores avanzados responden inicialmente a la radio- y quimioterapia, pero es muy frecuente apreciar una recurrencia del tumor y una gran resistencia de las células neuroblásticas al tratamiento quimioterápico.

A nivel microscópico, los neuroblastomas maduros comprenden dos subtipos de poblaciones celulares: las células ganglionares o neuroblásticas y las células de Schwann o estromales. Tradicionalmente, se pensaba que ambos tipos celulares derivaban de un único clon tumoral neuroblástico. Una hipótesis alternativa, sin embargo, sugiere que las células de Schwann presentes en los neuroblastomas podrían ser células no tumorales de los tejidos no neoplásicos circundantes y que estas células estromales serían captadas por las células tumorales (Ambros et al., 1996). En este caso, las células de Schwann actuarían produciendo factores promotores de diferenciación y antiproliferativos fundamentales para inducir la maduración neuronal (Reynolds y Wolf, 1993). Algunos estudios, utilizando células microdisecadas mediante láser, demuestran, sin embargo, que tanto las células neuroblásticas como las células de Schwann en neuroblastoma comparten las mismas alteraciones genéticas y, por tanto, provienen de una misma célula tumoral común (Mora et al., 2001). Es un hecho conocido que el desarrollo de estroma rico en células de Schwann se asocia a un pronóstico favorable y a enfermedad loco-regional (Shimada, 1993).

A pesar de su relevancia, aún sabemos muy poco sobre las bases moleculares asociadas a la diversidad clínica de esta enfermedad y, en concreto, a la remisión y la diferenciación celular espontánea que sufren algunos casos. Las aberraciones genéticas mejor caracterizadas hasta la fecha en neuroblastoma son la ya referida amplificación del gen *MYCN*, la pérdida de algunas regiones cromosómicas en la región 1p36, y la ganancia de material genético en el brazo largo del cromosoma 17. La amplificación de *MYCN* ocurre aproximadamente en el 25% de los neuroblastomas, asociándose claramente con estadios avanzados de la enfermedad, rápida progresión del tumor, y tasas de supervivencia muy bajas (Mora et al., 2001; Alaminos et al., 2003). Sin embargo, el hecho de que estas aberraciones estén presentes únicamente en una cuarta parte de todos los tumores neuroblásticos (Schilling et al., 2002; Alaminos et al., 2004), hace necesaria la búsqueda de marcadores más universales y específicos. La clara relación causal existente entre el nivel de agresividad tumoral y la presencia de ciertas alteraciones cromosómicas, sugiere que las distintas clases de neuroblastoma podrían presentar alteraciones genéticas específicas, y que éstas probablemente contribuyen al diverso comportamiento clínico de estos tumores (Esteller, 2003; Herman y Baylin, 2003; Teitz et al., 2000; Eggert et al., 2001). El pronóstico infausto del neuroblastoma estadio 4 requiere del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y el estudio de los perfiles de expresión génica aportará nuevos conocimientos sobre la biología de estos tumores.

El diagnóstico del neuroblastoma requiere la participación de patólogos que estén familiarizados con el diagnóstico de los tumores infantiles. Al microscopio óptico, algunos neuroblastomas son muy difíciles de distinguir de otros tumores

de células redondas y pequeñas de la infancia (como linfomas, tumores neuroectodérmicos primitivos, rhabdomyosarcomas, tumores de Ewing, etc.). Por ello, en muchos casos es necesario demostrar la naturaleza neuronal simpática del tumor mediante inmunohistoquímica, microscopía electrónica o demostrando la existencia de niveles elevados de catecolaminas séricas (dopamina, noradrenalina), o sus metabolitos en la orina (ácido vainillilmandélico (VMA) o ácido homovainílico (HVA)). El criterio mínimo establecido por acuerdo internacional para diagnosticar un neuroblastoma se basa en una de las características siguientes: 1) un diagnóstico patológico inequívoco realizado por análisis del tejido tumoral mediante microscopía óptica (con o sin inmunohistoquímica, microscopía electrónica o niveles elevados de catecolaminas séricas o de sus metabolitos en orina). 2) La combinación de una muestra de médula ósea por aspiración o biopsia que contenga células tumorales inequívocas (sincitios o racimos de células inmunocitológicamente positivas) y niveles elevados de catecolaminas séricas o de sus metabolitos en orina (Brodeur, 2002).

Numerosos estudios han demostrado la existencia de una gran diversidad morfológica y estructural en las líneas celulares de neuroblastoma mantenidas en cultivo. En este sentido, podemos distinguir tres tipos fundamentales de células (Ross et al., 1995 y 2003): Las células tipo N (neuroblásticas) son de pequeño tamaño, con núcleos prominentes, y proliferan muy rápidamente en cultivo (Figura 3A). Las células tipo S (estromales o similares a las células de Schwann), por el contrario, son células aplanadas, sumamente adherentes, y expresan algunas proteínas características de los melanoblastos, células gliales inmaduras o de las células Schwann, células meníngeas, o células

mesenquimales (Figura 3B). Estas células de tipo S son muy poco tumorigénicas y son, en general, incapaces de formar tumores en ratones atímicos (Ross et al., 2003; Ciccarone et al., 1989). Finalmente, las células de tipo I son morfológicamente intermedias entre las células N y las S, y poseen características bioquímicas de ambas. Las células de tipo I tienen el potencial maligno más elevado, y son capaces de formar grandes tumores cuando son implantadas en ratones (Ross et al., 2003).

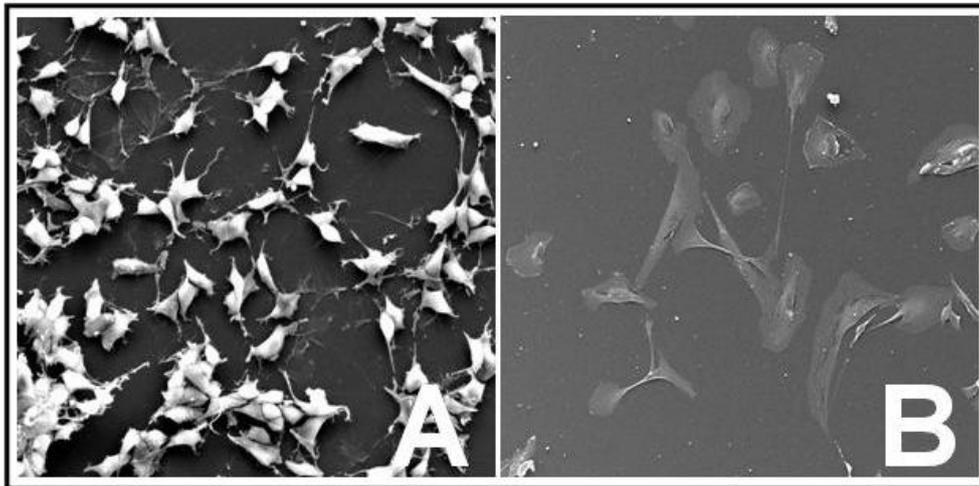


Figura 3. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de líneas celulares de neuroblastoma de tipo N (A) y de tipo S (B).

Recientemente, se ha descrito un tipo de alteración genética característica de los tumores malignos humanos: la metilación anómala de islas CpG asociadas al promotor de genes supresores tumorales. Esta alteración impide la expresión de dichos genes, produciéndose el silenciamiento de todos los *loci* implicados (Jones y Laird, 1999; Esteller 2003; Herman y Baylin, 2003). El silenciamiento de estos genes supresores juega un papel fundamental en la patogénesis de la

mayor parte de los tumores malignos, ya que las alteraciones del patrón normal de metilación de ADN pueden conducir al desarrollo y progresión de todas las formas comunes de cáncer humano (Jones y Laird, 1999; Esteller 2003; Herman y Baylin, 2003). La hipermetilación de islas CpG, que normalmente no se encuentran metiladas, ha demostrado jugar un papel importante para la represión transcripcional de numerosos genes cuya función es la prevención del crecimiento y el desarrollo de tumores (Jones y Laird, 1999; Esteller 2003; Herman y Baylin, 2003).

La utilización clínica de los marcadores de hipermetilación génica de cara al diagnóstico, tiene varias ventajas potenciales respecto a los factores genéticos clásicos: 1) el número de genes que sufren silenciamiento epigenético incluye todas las rutas y funciones fundamentales de la célula; 2) el número total de genes que se pueden encontrar metilados en una célula humana es cada vez mayor; 3) seleccionando una serie de marcadores de hipermetilación, es posible cubrir el 100 % de tumores (Herman y Baylin, 2003; Esteller et al., 2001); 4) los ensayos para detectar la metilación de ADN son fáciles de llevar a cabo y de estandarizar (Harden et al., 2003; Jeronimo et al., 2001).

Pocos genes supresores tumorales se han descrito hasta ahora como metilados y silenciados epigenéticamente en neuroblastoma. Entre ellos, se encuentran caspasa-8 (*CASP8*), *EMP3* (Alaminos et al., 2005) y los receptores del factor de necrosis tumoral *DR4*, *DR5*, *DcR1*, y *DcR2* (Teitz et al., 2000; Eggert et al., 2001; van Noesel et al., 2002 y 2003). En este sentido, algunos trabajos han demostrado que la hipermetilación de ciertos genes relacionados con la biología del neuroblasto pueden sufrir hipermetilación bajo determinadas

circunstancias y que, en tales casos, la hipermetilación se asocia a una elevada progresión tumoral y un mal pronóstico vital del paciente (Alaminos et al., 2004).

Las variaciones en la expresión de genes asociadas con cada tipo de enfermedad pueden proporcionar claves importantes para el conocimiento etiológico y contribuir eventualmente a un diagnóstico y toma de decisión terapéutica individualizada para cada paciente. Las nuevas tecnologías de análisis de alto rendimiento de ARNm en forma de *microarrays* permiten el estudio de la expresión génica en su totalidad, traduciéndola en forma de datos cuantificables, comparables y analizables (Hessner et al., 2006). Esta medida de la expresión génica global tiene el potencial de mostrar una visión completamente nueva de la biología a nivel molecular. Los actuales esquemas de clasificación clinicopatológica a menudo no son capaces de discriminar entre tumores con evolución clínica muy dispar. Por ello, se espera que métodos más objetivos de taxonomía, como pudieran ser el perfil de expresión génica global de un tumor, puedan aportar una información más ajustada que los esquemas de clasificación existentes (Modlich et al., 2006). Para muchos autores, es probable que los perfiles de expresión génica se conviertan en un futuro próximo en herramientas de uso clínico estándar. De esta manera, usando los *microarrays*, se pueden obtener perfiles de expresión génica para cada tipo concreto de tumor identificado histopatológicamente.

Una vez determinada la expresión génica global, los investigadores deberán ser capaces de correlacionar el patrón de expresión génica con la etiología y la respuesta al tratamiento. Estas correlaciones podrían ser utilizadas en el futuro

para desarrollar grupos de marcadores moleculares que permitirían la implementación de métodos para la detección precoz y el diagnóstico más preciso de la enfermedad. El conocimiento de las correlaciones entre patrones de expresión génica y parámetros clínicos relevantes permitiría a los clínicos basar la toma de decisiones en las características moleculares del tumor de cada paciente (Matthay et al., 1999; Herman y Baylin, 2003; van Noesel et al., 2003).

En los últimos años, los análisis de expresión de alto rendimiento con microarrays han contribuido a refinar la clasificación de diversas neoplasias, identificar grupos de genes con importancia pronóstica y detectar grupos de pacientes con distinta capacidad de respuesta a la terapia (Mora et al., 2000; Mora et al., 2001; Alaminos et al., 2003; Brodeur 2002; Ross et al., 1995 y 2003; Ciccarone et al., 1989; Jones y Laird 1999). Por ello, parecen constituir una herramienta especialmente útil para investigar si existe un patrón de expresión característico al diagnóstico, que nos permita distinguir los neuroblastomas exclusivamente loco-regionales de aquellos con capacidad para metastatizar. Dichos patrones de expresión, junto con los parámetros clínicos y moleculares que ya han mostrado su importancia en el pronóstico de los neuroblastomas, permitirían la toma de decisiones terapéuticas más apropiadas para cada caso.

OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es contribuir a un mejor diagnóstico y estadiaje pronóstico de los niños afectos de tumores neuroblásticos. En concreto, para ello abordaremos los siguientes objetivos específicos:

1- Identificar los genes que están significativamente más expresados en cada uno de los grupos de estudio (neuroblastomas pediátricos de mal pronóstico, ganglioneuromas benignos y médula ósea normal).

2- Identificar los genes que están significativamente más expresados en el grupo de muestras de tejido maligno (neuroblastoma) y en el grupo de tejidos normales (médula ósea).

3- Determinar el valor diagnóstico y pronóstico de los genes previamente seleccionados a la hora de identificar cada tipo de muestra y de predecir la supervivencia de los pacientes en cada uno de los grupos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. TUMORES NEUROBLÁSTICOS Y TEJIDOS DE ORIGEN HUMANO

Para la determinación de la expresión génica global mediante microarray, en este trabajo se analizaron 10 tumores neuroblásticos pediátricos malignos de estadio 4 (metastásicos), así como 10 tumores neuroblásticos pediátricos benignos (ganglioneuromas) y 10 muestras de tejido normal (médula ósea). Todas estas muestras se analizaron mediante el sistema de microarrays de oligonucleótidos Affymetrix Genechip Human Genome U95 SetTM, el cual contiene 62839 genes y secuencias génicas expresadas (EST).

Todas las muestras fueron revisadas por un mismo patólogo, descartándose aquéllos que presentaban un porcentaje de células neuroblásticas inferior al 70%. Para el análisis mediante microarray, se utilizaron únicamente las áreas del tumor que presentaban un elevado porcentaje de células neuroblásticas (macrodissección).

Los tejidos utilizados en este estudio correspondían a muestras de niños de 3 a 9 años afectados de neuroblastoma y tratados en un mismo servicio clínico, los cuales dieron su consentimiento para ser incluidos en este estudio.

2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROARRAY

Para el análisis de expresión génica, se extrajo ARN total de cada una de las muestras normales o tumorales utilizando Trizol (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, EEUU) y purificado mediante el sistema comercial Qiagen RNeasy System (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá). Una vez extraído, se comprobó la integridad y la calidad del ARN mediante visualización directa del ARN ribosómico de 28 y 18S en ARN total separado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% y tinción con bromuro de etidio.

Para el análisis, todos los ARN fueron transformados en ADNc mediante una transcriptasa inversa (Superscript II, Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, EEUU) con un oligonucleótido rico en colas de timina (T7-polyT primer), el cual permitió la amplificación de cualquier ARN mensajero presente en la célula.

A continuación, se sintetizaron los ARNc correspondientes a todos los ADNc mediante transcripción in vitro, utilizando para ello UTP y CTP marcados con biotina (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY). Una vez sintetizados, y para favorecer la hibridación, estos ARNc se fragmentaron químicamente añadiendo una concentración elevada de sales y altas temperaturas.

Finalmente, los ARNc marcados y fragmentados se hibridaron frente a los chips que constituyen el sistema de microarray U95 de la casa comercial Affymetrix durante 16 h a 45°C. Tras un proceso totalmente estandarizado y automatizado, los chips se lavaron y se escanearon para obtener valores absolutos de expresión génica expresados en una escala arbitraria. Todos los valores de expresión se normalizaron utilizando el programa informático Affymetrix Microarray Suite 5.0 suministrado por la casa comercial Affymetrix.

3. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN OBTENIDOS MEDIANTE MICROARRAY

En primer lugar, para identificar genes cuya expresión fuese significativamente elevada en grupos específicos de muestras, se seleccionaron todos los genes que mostraron niveles de expresión superiores a 5000 unidades fluorescentes en el análisis de microarray.

En segundo lugar, para identificar aquellos genes que mostrasen una expresión significativamente superior en el grupo de los tumores malignos (neuroblastoma), se llevó a cabo el siguiente análisis secuencial:

1. Identificación y selección de todos los genes cuya expresión fue significativamente mayor en neuroblastoma que en ganglioneuroma ($p < 0.01$ para el test t de Student y expresión media *-fold change-* al menos dos veces mayor en neuroblastoma que en ganglioneuroma).
2. Identificación y selección de todos los genes cuya expresión fue significativamente mayor en ganglioneuroma que en médula ósea normal ($p < 0.01$ para el test t de Student y expresión media *-fold change-* al menos dos veces mayor en ganglioneuroma que en médula ósea normal).
3. Selección de todos aquellos genes que cumplieran los dos primeros criterios.

A continuación, para identificar aquellos genes que mostrasen una expresión significativamente superior en el grupo de los tejidos no tumorales (médula ósea), se llevó a cabo el siguiente análisis secuencial:

1. Identificación y selección de todos los genes cuya expresión fue significativamente mayor en médula ósea que en ganglioneuroma ($p < 0.01$ para el test t de Student y expresión media *-fold change-* al menos dos veces mayor en médula ósea que en ganglioneuroma).
2. Identificación y selección de todos los genes cuya expresión fue significativamente mayor en ganglioneuroma que en neuroblastoma ($p < 0.01$ para el test t de Student y expresión media *-fold change-* al menos dos veces mayor en ganglioneuroma que en neuroblastoma).
3. Selección de todos aquellos genes que cumplieran los dos primeros criterios.

Una vez seleccionados los genes, se utilizó el programa Cytoscape-BINGO para identificar las funciones genéticas y celulares estadísticamente más representadas dentro del grupo de genes significativos.

Finalmente, la clasificación de las muestras de acuerdo a sus perfiles de expresión génica se realizó utilizando el programa Cluster-TreeView de la Universidad de Stanford.

4. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

El análisis de supervivencia para los pacientes pediátricos incluidos en este trabajo se llevó a cabo mediante la prueba *log-rank* del análisis de supervivencia de Kaplan-Mayer, utilizando para ello el programa estadístico SPSS 12.0. Se consideró que existían diferencias significativas cuando se obtuvo un valor $p < 0,05$ en los tests de doble cola.

RESULTADOS

1- IDENTIFICACIÓN DE GENES EXPRESADOS EN CADA GRUPO DE MUESTRAS

El análisis de microarray demostró la existencia de un grupo de genes específico de cada grupo de muestras (neuroblastomas, ganglioneuromas y médula ósea normal). En concreto, el grupo de tumores pediátricos malignos mostró sobreexpresión de 990 genes y secuencias génicas expresadas, mientras que los ganglioneuromas expresaron 1087 genes o secuencias y la médula ósea normal expresó 1236 genes o secuencias génicas. Curiosamente, 592 de estos genes o secuencias fueron comunes a los tres grupos de estudio.

Cuando se analizaron los genes que aparecieron sobreexpresados en cada grupo, se pudo comprobar que los genes sobreexpresados en el grupo de los neuroblastomas pertenecían a 164 funciones génicas y celulares interrelacionadas unas con otras. La representación gráfica de todas estas funciones génicas y celulares mostró un grupo complejo de funciones entre las que destacaba la proliferación celular, el metabolismo y la síntesis de componentes intra y extracelulares (Figura 4). Sin embargo, los genes sobreexpresados por el grupo de los tumores benignos (ganglioneuromas) estaba fundamentalmente formado por genes pertenecientes a 91 funciones, destacando la diferenciación celular, la transmisión sináptica y la síntesis de mielina, pero no la proliferación celular (Figura 5). Finalmente, los genes seleccionados en el grupo de muestras de tejido no tumoral pertenecieron a

227 funciones génicas muy diversas, destacando aquéllas relacionadas con el sistema inmunitario, la diferenciación hematopoyética y la proliferación celular (Figura 6).

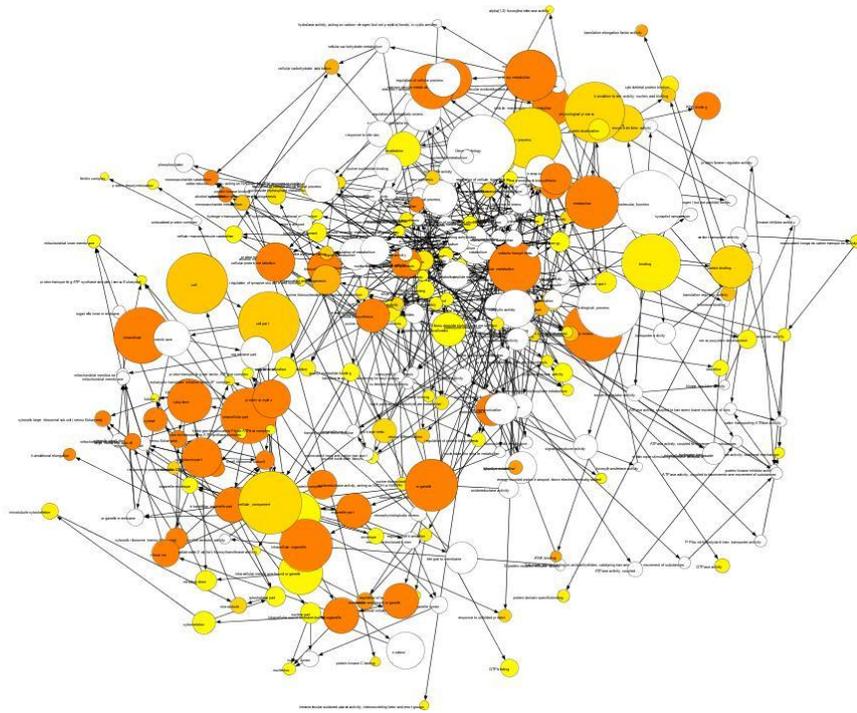


Figura 4. Interrelación entre las diferentes funciones génicas sobreexpresadas en el grupo de los tumores pediátricos malignos (neuroblastomas). En color naranja oscuro se muestran los grupos de genes de significativamente más representados, mientras que en blanco se muestran aquéllos que no aparecían sobrerrepresentados en este grupo.

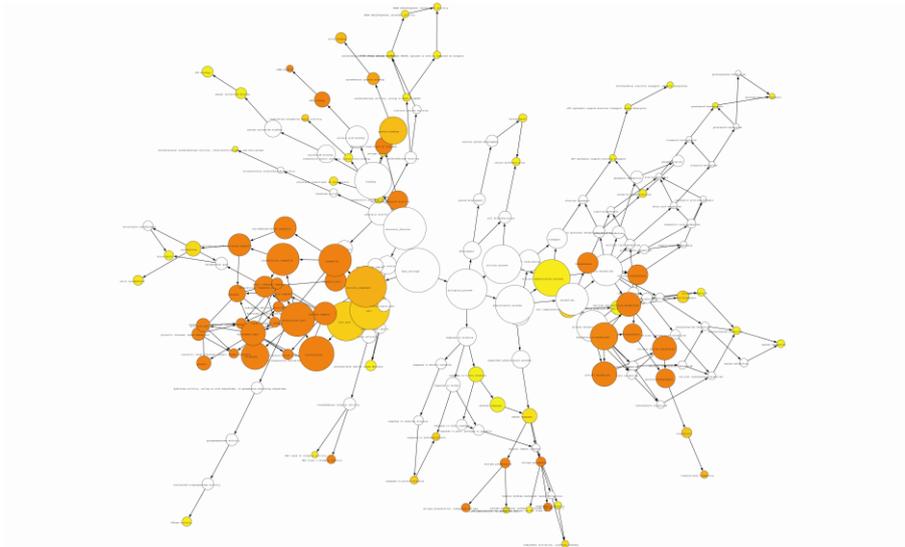


Figura 5. Interrelación entre las diferentes funciones génicas sobreexpresadas en el grupo de los tumores pediátricos benignos (ganglioneuromas). En color naranja oscuro se muestran los grupos de genes de significativamente más representados, mientras que en blanco se muestran aquéllos que no aparecían sobrerrepresentados en este grupo.

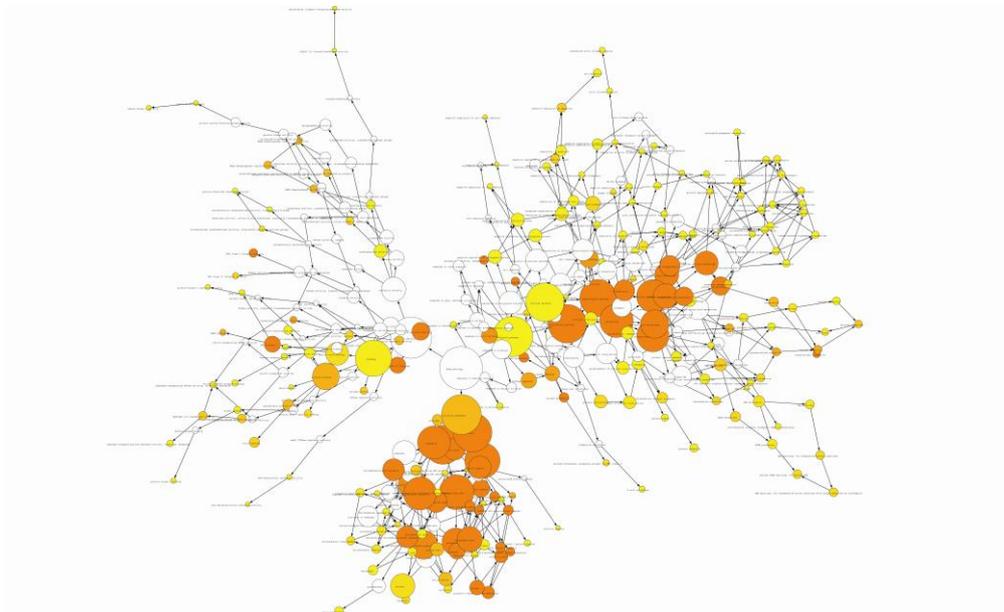


Figura 6. Interrelación entre las diferentes funciones génicas sobreexpresadas en el grupo de los tejidos normales (médula ósea). En color naranja oscuro se muestran los grupos de genes de significativamente más representados, mientras que en blanco se muestran aquéllos que no aparecían sobrerrepresentados en este grupo.

2- ANÁLISIS COMPARADO DE GENES EXPRESADOS EN LOS DIFERENTES TEJIDOS ANALIZADOS

Una vez efectuado el análisis individualizado para cada grupo de muestras, quisimos identificar los genes que mostraban una expresión significativamente mayor en uno de los grupos frente a los otros. Así, el análisis de los datos de expresión génica comparada en muestras de neuroblastoma, ganglioneuroma y médula ósea normal mostró que 2408 genes y secuencias génicas expresadas cumplían los criterios de selección previamente establecidos en el apartado Materiales y Métodos de este trabajo. Todos estos genes, por tanto, mostraron mayores niveles de expresión o bien en los tumores malignos o bien en los tejidos normales, siendo intermedios los valores mostrados por los tumores benignos.

De los 2408 genes seleccionados, 937 correspondían a genes con escasa expresión en neuroblastoma y elevada expresión en médula ósea normal, mientras que 1471 correspondían a genes muy expresados en neuroblastoma y poco expresados en tejidos normales (Figuras 7 y 8).

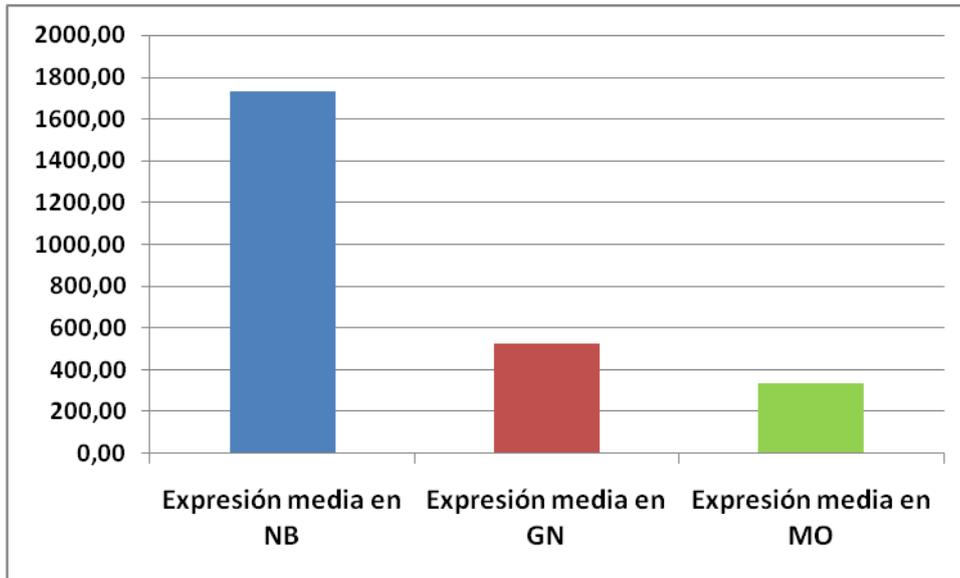


Figura 7. Expresión media de los genes seleccionados por su mayor expresión en el grupo de tumores malignos frente a los tumores benignos y los tejidos normales. NB: neuroblastoma, GN: ganglioneuroma, MO: médula ósea normal.

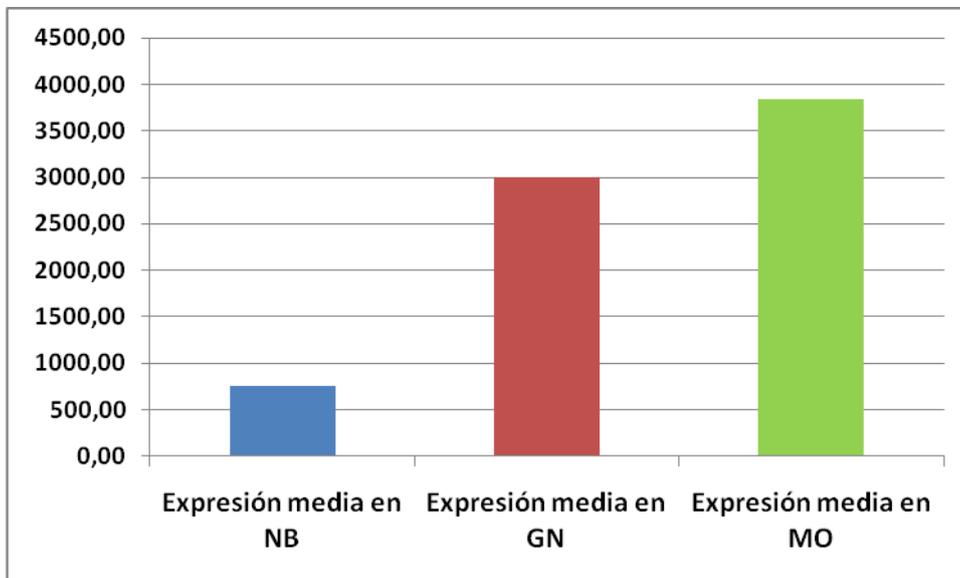


Figura 8. Expresión media de los genes seleccionados por su mayor expresión en el grupo de tejidos normales (médula ósea) frente a los tumores neuroblásticos malignos (neuroblastoma). NB: neuroblastoma, GN: ganglioneuroma, MO: médula ósea normal.

Por otro lado, el análisis de los genes seleccionados en cada grupo de muestras mediante el programa Cytoscape-BiNGO reveló la existencia de funciones génicas relevantes dentro del grupo de genes sobreexpresados tanto en el grupo de tumores malignos (neuroblastoma) como en el grupo de tejidos normales (médula ósea).

En primer lugar, dentro de los 1471 genes significativamente sobreexpresados en los neuroblastomas, se encontró que gran número de éstos pertenecían a la familia de genes involucrados en actividades relevantes para la célula, especialmente para la célula nerviosa. En concreto, gran parte de los genes sobreexpresados en este grupo de muestras ejercía funciones relevantes en una o varias de las funciones celulares que se muestran en la Tabla 1.

Actividad de canales de calcio	Polarización celular
Actividad difosfoinositol-polifosfato difosfatasa	Polimerización y despolimerización de microtúbulos
Actividad guanilato-quinasa	Regulación de la despolimerización de microtúbulos
Actividad quinasa	Regulación de la polimerización y despolimerización de microtúbulos
Control de la secreción celular	Regulación de la salida de ARN del núcleo
Crecimiento celular	Regulación de procesos biológicos
Dendritas	Secreción celular
Desarrollo de sistemas	Sinapsis
Desarrollo del sistema nervioso	Síntesis de catecolaminas
Desarrollo en general	Transmisión del impulso nervioso
Despolimerización de microtúbulos	Transmisión sináptica
Entrada de proteínas al núcleo	Unión a ácidos nucleicos
Exocitosis	Unión a ARN
Extensión axonal	Unión a ARNm
Extensión neuronal	Unión a magnesio
Inhibición de la despolimerización de microtúbulos	Unión a nucleótidos
Inhibición de la polimerización de microtúbulos	Unión a proteínas
Núcleo celular	Unión al extremo 3' del ARN

Tabla 1. Principales funciones celulares codificadas por los genes sobreexpresados por los tumores neuroblásticos malignos (neuroblastomas) de acuerdo con el programa Cytoscape-BiNGO.

Además, el programa Cytoscape-BiNGO demostró que la mayor parte de los 937 genes identificados en el grupo de muestras de tejido normal estaban relacionados con las funciones celulares que se muestran en la Tabla 2.

Activación celular	Procesamiento antigénico
Activación celular	Procesamiento de antígenos endógenos
Activación celular inmunitaria	Procesamiento de antígenos exógenos
Activación de células B	Procesos fisiológicos
Activación de la proliferación celular	Producción de citoquinas
Activación de macrófagos	Proliferación celular
Activación de procesos celulares	Proteín kinasas
Activación de procesos fisiológicos	Proteínas HLA
Activación fisiológica	Proteínas intrínsecas de membrana
Activación inmunitaria	Proteínas intrínsecas de membrana plasmática
Activación NF-Kappa	Quimiotaxis
Actividad aminopeptidasa	Quimiotaxis
Actividad caspasa	Quimiotaxis inmune
Actividad celular	Receptor de TNF
Actividad enzimática	Receptores celulares
Actividad GTPasa	Receptores de interferón
Actividad guanil-nucleótida	Receptores de interferón gamma
Actividad manosidasa	Receptores de interleucina
Actividad manosil-alfa	Receptores de interleucina 10
Actividad manosil-manosidasa	Receptores de MHC-II
Actividad proteica de receptores	Receptores de mortalidad celular
Actividad transductora	Receptores HLA
Apoptosis	Regulación biológica
Canales de inositol	Regulación celular
Cascada JAK-STAT	Regulación de actividad GTPasa
Cascada NF-kappa	Regulación de citoquinas
Catabolismo de ARN	Regulación de GTPasa
Citoquinas	Regulación de la apoptosis
Complejo HLA	Regulación de la muerte celular programada
Componentes celulares	Regulación de la producción de citoquinas
Comportamiento locomotor	Regulación de la proliferación celular
Comunicación celular	Regulación de la respuesta inmune
Cuerpo nuclear	Regulación de NF-Kappa
Cuerpos PML	Regulación de procesos biológicos
Defensa	Regulación de procesos celulares
Desarrollo de órganos	Regulación de transducción de señales
Desarrollo hematopoyético	Regulación enzimática
Detección de estímulos externos	Respuesta a bacterias
Detección de bacterias	Respuesta a estímulos
Detección de estímulos	Respuesta a estímulos bióticos
Detección de parásitos	Respuesta a estímulos externos
Detección de estímulos	Respuesta a estímulos químicos
Diferenciación mieloide	Respuesta a heridas
Dimerización de proteínas	Respuesta a otros organismos
Eicosanoides	Respuesta a parásitos
Hematopoyetina	Respuesta a patógenos
Hemopoyesis	Respuesta a virus
Inhibición celular	Respuesta al estrés
Inhibición de citoquinas y quimioquinas	Respuesta inflamatoria
Inhibición de fosfolipasa	Respuesta inmune
Inhibición de la proliferación celular	Respuesta inmunitaria
Inhibición de procesos fisiológicos	Señalización intracelular
Inhibición del metabolismo celular	Sinapsis inmunológica
Inhibición del metabolismo de nucleótidos	Síntesis de ácidos carboxílicos

Inhibición fisiológica	Síntesis de ácidos orgánicos
Inhibición metabólica	Taxis
Inhibición transcripcional	Transducción
Localización celular	Transducción de GTPasa
Locomoción	Transducción de señales
Membrana	Transducción de señales Rho
Membrana plasmática	Transporte de vesículas
Membrana plasmática	Unión a citoquinas
Membranas celulares	Unión a enzimas
Metabolismo de prostaglandinas	Unión a fosfolípidos
Metabolismo de prostanooides	Unión a glicoproteínas
Metabolismo graso	Unión a IgG
Migración celular inmune	Unión a inmunoglobulinas
Modificación de lípidos	Unión a interferón
Movilidad celular	Unión a interferón gamma
Muerte	Unión a interleucina 10
Muerte celular	Unión a lípidos
Muerte celular programada	Unión a lipopolisacáridos
Partes de la célula	Unión a MHC-II
Partes de la membrana	Unión a proteínas
Partes de la membrana plasmática	Unión a proteínas
Presentación de antígenos	Unión a TNF
Presentación de antígenos endógenos	Unión al receptor de TNF
Presentación de antígenos exógenos	

Tabla 2. Principales funciones celulares codificadas por los genes sobreexpresados por las muestras normales (médula ósea) de acuerdo con el programa Cytoscape-BiNGO.

3- VALOR DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO DE LOS GENES SELECCIONADOS

Cuando se llevó a cabo un análisis de estratificación y clasificación (*clustering*) de las muestras humanas utilizando únicamente los 2408 genes y secuencias génicas previamente seleccionadas (genes significativamente más expresados en neuroblastoma o en médula ósea), se comprobó que todas las muestras correspondientes a un mismo tipo de patología (neuroblastoma, ganglioneuroma y médula ósea) se agrupaban en un mismo grupo o en una misma rama del árbol clasificatorio, sin que existiese ninguna excepción (Figura 9). De este modo, todos los neuroblastomas (tumores malignos) se agrupaban

en un único grupo homogéneo en una de las dos grandes ramas del árbol clasificatorio, mientras que el grupo en el que estaban todos los ganglioneuromas (tumores benignos), así como el grupo de todas las muestras de médula ósea (tejidos normales) partían de la segunda gran rama del árbol clasificatorio. Todo ello demuestra el valor diagnóstico de estos genes.

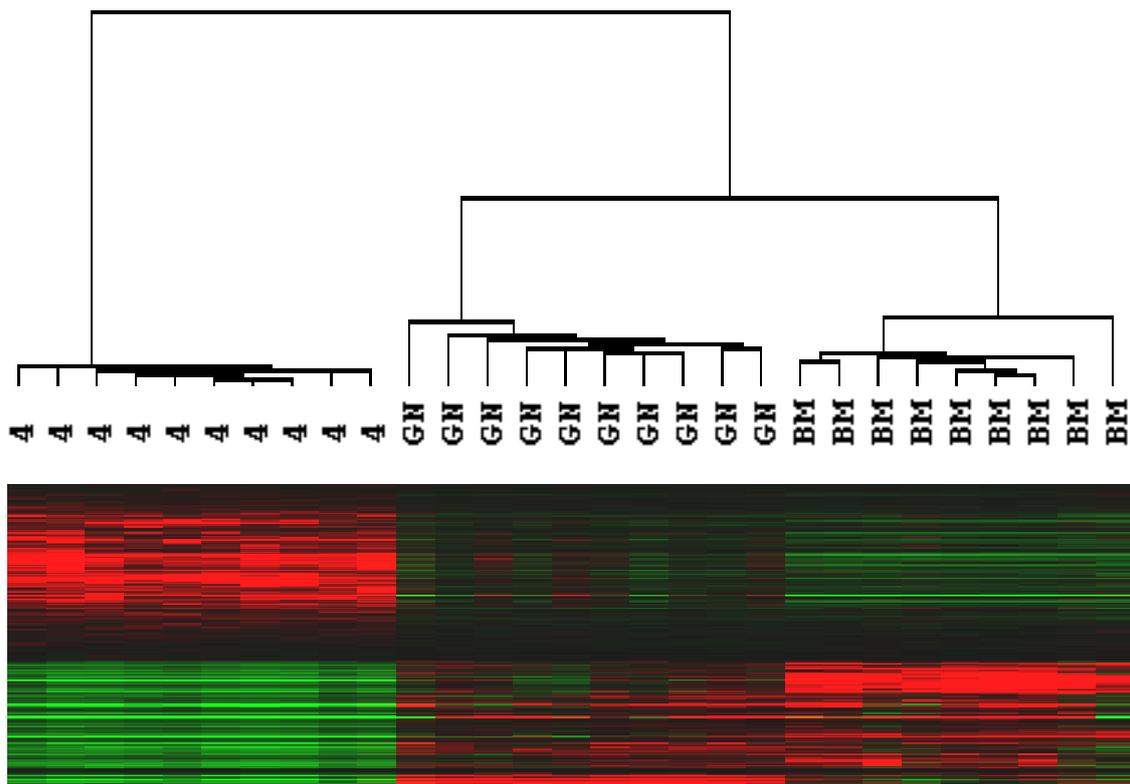


Figura 9. Árbol clasificatorio de las distintas muestras analizadas en este trabajo (*cluster*) según la expresión génica por *microarray*. El color verde corresponde a genes altamente expresados y el rojo a genes muy poco expresados en cada muestra específica. 4: neuroblastomas de estadio 4, GN: ganglioneuromas, BM: muestras de médula ósea normal.

A continuación, y para determinar la posible utilidad pronóstica de la determinación de la expresión génica mediante *microarray* en las distintas muestras analizadas en este trabajo, se llevó a cabo un estudio de

supervivencia mediante la técnica de Kaplan-Meier. De este modo, se observó que los tejidos que expresaban elevadas cantidades de los 1471 genes que se encontraron sobreexpresados en tumores malignos en este estudio siempre correspondían a tumores malignos de mal pronóstico y elevada malignidad, mientras que las muestras que expresaban los 937 genes característicos de tejidos normales, presentaban excelente supervivencia ($p < 0,001$) (Figura 10). Todo ello sugiere que el análisis de expresión de los 2408 genes identificados en este estudio tiene valor pronóstico.

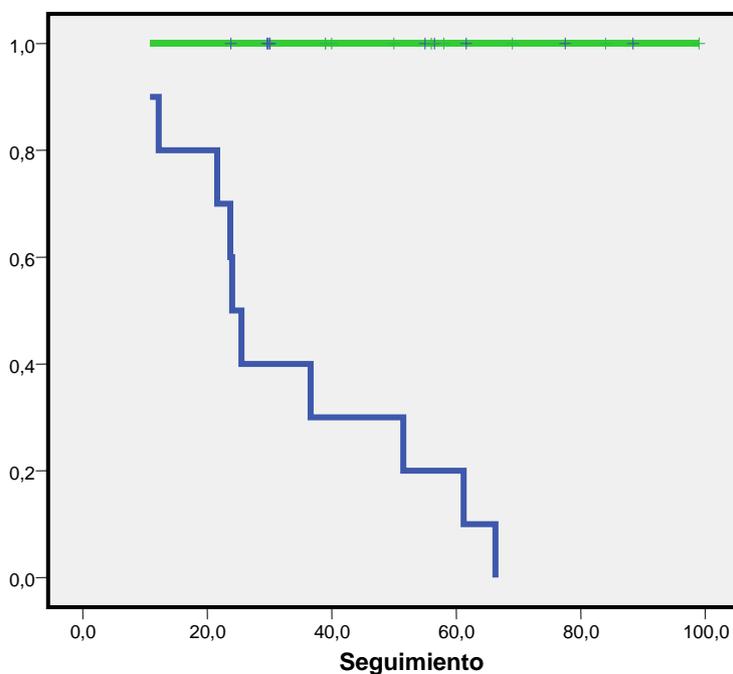


Figura 10. Gráfica de supervivencia Kaplan-Meier para el grupo de casos que mostraban elevada expresión de los genes relacionados con neuroblastoma según nuestro análisis y muy escasa expresión de los genes relacionados con médula ósea normal. Seguimiento: periodo de tiempo tras el diagnóstico de la enfermedad (en meses). En el eje Y se muestra la proporción de individuos que continúan vivos tras un determinado periodo de seguimiento. La recta de color verde corresponde a los casos que expresaban el grupo de genes detectado en este estudio en los tejidos normales, mientras que en azul se representa el grupo que expresaba los genes identificados en los tumores malignos.

DISCUSIÓN

Los **tumores neuroblásticos** constituyen un serio problema de salud en todos los países civilizados, especialmente en la población infantil (Castleberry, 1997; Schwab et al., 2003). Aunque el pronóstico suele ser muy bueno en aproximadamente la mitad de los casos, la mortalidad global aún se sitúa por encima del 50% en los pacientes afectados de neuroblastoma (Brodeur y Maris, 2002; Mora et al., 2001; Oppenheimer et al., 2003). Este comportamiento clínico tan diverso hace necesaria la búsqueda de **nuevos marcadores** biológicos, genéticos y moleculares que contribuyan a una mejor clasificación de los pacientes para una adecuada decisión terapéutica. En este sentido, el reciente desarrollo de las técnicas genéticas basadas en chips de microarray permite establecer perfiles de expresión génica global en todo tipo de muestras de origen humano, incluyendo los tumores neuroblásticos (Hessner et al., 2006). Por otro lado, los análisis genéticos permiten evaluar el estado de activación o inactivación de determinados genes cuya función podría ser relevante en la génesis y la clasificación de los tumores neuroblásticos (Alaminos et al., 2004).

En este trabajo, hemos llevado a cabo un estudio de **expresión génica global** en tres grupos bien caracterizados de muestras de origen pediátrico: neuroblastoma maligno, ganglioneuroma benigno y médula ósea no tumoral. De este modo, pudimos identificar y caracterizar los factores implicados en el control de la diferenciación celular neuroblástica y de la progresión tumoral en neuroblastoma. Así, en primer lugar se analizó cada uno de los grupos de

muestras mediante microarray, lo cual nos permitió obtener perfiles de expresión génica global para distintos grupos.

En concreto, en el grupo de los **tumores neuroblásticos malignos** se encontró un gran número de genes sobreexpresados que jugaban un papel relevante en funciones celulares tales como proliferación celular, inhibición de la apoptosis, crecimiento y síntesis de organelas intracelulares, movilidad celular, síntesis y reparación de ADN y síntesis de proteínas. Todo ello ayudaría a explicar por qué estas células tienden a crecer de forma descontrolada in vivo, desplazándose por el organismo para generar metástasis e induciendo la generación de neovasos que contribuyen a la nutrición del tumor en continuo crecimiento y expansión.

Sin embargo, en los **tumores neuroblásticos benignos** (ganglioneuroma) se encontró un gran número de genes cuya función se centraba en la regulación y activación del sistema inmunitario, el metabolismo celular, la adhesión celular, el desarrollo del sistema nervioso y el control de la proliferación celular. Todos estos genes y funciones génicas están relacionados con la capacidad de crecimiento autolimitado de estos tumores y la ausencia de expansión metastásica a distancia, así como por la capacidad del sistema inmunitario del propio paciente de invadir y destruir el tumor.

Por otro lado, los tejidos correspondientes a **médula ósea normal**, a diferencia de los tumores neuroblásticos malignos y benignos, mostraron sobreexpresión de un elevado número de genes y funciones génicas. Entre ellas, destacan el procesamiento y reconocimiento de antígenos, el desarrollo hematopoyético, la

proliferación celular y la quimiotaxis, todas ellas relacionadas con el sistema inmunitario y la generación de nuevos componentes celulares de la sangre.

Junto al análisis individualizado para detectar los genes que estaban expresados en grandes cantidades en los grupos específicos de muestras, en este trabajo quisimos efectuar un **estudio comparado** para identificar genes que estuviesen activados en alguno de los grupos de estudio, pero no en otros. De este modo, el análisis estadístico nos permitió identificar un gran número de genes cuya expresión era, al menos, un 100% más alta en los tumores neuroblásticos más agresivos que en los tumores benignos y, al menos, un 200% más alta que en las muestras de médula ósea no tumoral. Estos genes son, por tanto, específicos de neuroblastoma y constituyen una herramienta potencialmente muy útil para el diagnóstico de este tipo de tumores. De igual modo, nuestro análisis nos permitió encontrar otro grupo de genes cuya expresión, por el contrario, era muy elevada en las muestras no tumorales y muy reducida en neuroblastoma, siendo intermedia en los ganglioneuromas. La ausencia de expresión de estos genes en los tumores más agresivos presenta igualmente un enorme **interés clínico**, puesto que su determinación en niños con sospecha de neuroblastoma podría ayudar al pediatra o al cirujano pediátrico a descartar esta enfermedad.

La caracterización genética de los diferentes tipos de muestras presenta un enorme interés clínico en pediatría oncológica. De hecho, nuestro análisis clasificatorio (*cluster*) demostró claramente que las muestras de neuroblastoma, ganglioneuroma y médula ósea presentaban perfiles de expresión muy diferentes en cada uno de los grupos, siendo muy fácil clasificar

cada una de las muestras según el **perfil de expresión** que mostrasen para los genes seleccionados en este trabajo. Por todo ello, creemos que el grupo de genes identificado en este estudio presenta gran **utilidad diagnóstica**, al menos en teoría, lo que posibilitaría diagnosticar una muestra como neuroblastoma, ganglioneuroma o tejido no tumoral en base a la cuantificación de la expresión de 2408 genes y secuencias génicas expresadas. Frente a algoritmos diagnósticos basados en parámetros clínicos, la utilización de los genes presenta ventajas indudables, destacando especialmente su objetividad.

Pero, además, la determinación de los niveles de expresión de los genes detectados en este estudio posee un valor añadido de tipo **pronóstico**. En efecto, nuestro análisis de supervivencia (Kaplan-Meier) demostró que los casos que presentaban perfiles de expresión compatibles con neuroblastoma, poseían muy escasa supervivencia, mientras que los niños cuyos tejidos poseían caracteres genéticos similares a los encontrados en tejidos normales, sobrevivían de modo significativamente muy superior. Por ello, y teniendo en cuenta que los tumores neuroblásticos presentan elevada frecuencia y una gran mortalidad, creemos que sería necesario evaluar los niveles de expresión de estos genes para efectuar una previsión pronóstica en pacientes con sospecha de neuroblastoma previamente a la aplicación de un tratamiento clínico agresivo basado en la utilización de quimio y/o radioterapia.

Respecto al análisis de genes concretos que se encontraron sobreexpresados en algunos de los grupos de muestras, llama la atención el hecho de que un gran número de genes relacionados con el **sistema inmunitario** se encontraron sobreexpresados no sólo en la médula ósea normal, sino también

en los tumores benignos (ganglioneuromas), estando ausentes en los neuroblastomas. En concreto, numerosos genes del sistema inmunitario mostraron una expresión significativamente superior en los tumores benignos, estando muy poco expresados en los neuroblastomas de elevada malignidad y elevada mortalidad (Mora et al., 2001). Entre estos genes, encontramos algunos loci relacionados con el **complejo mayor de histocompatibilidad** (MHC o HLA). Este hecho podría explicar por qué los neuroblastomas de alto grado son capaces de escapar a la vigilancia del sistema inmunitario y, por tanto, sobrevivir a pesar de haber adquirido carácter neoplásico (Wolfl et al., 2005). Por el contrario, los tumores benignos conservarían la expresión de marcadores de superficie celular, lo cual facilitaría el reconocimiento de estas células por parte del sistema inmunitario y, por tanto, el control de los neuroblastos neoplásicos por parte de los linfocitos y las células *natural-killer*. Estudios previos ya sugirieron que ciertos neuroblastomas podrían escapar al sistema de vigilancia inmunitaria mediante la represión de ciertas proteínas relacionadas con el reconocimiento autoinmune (Raffaghello et al., 2004).

Por otro lado, nuestros resultados demostraron que la expresión de genes relacionados con la función de los **linfocitos humanos** fue significativamente superior en los tumores benignos que en los neuroblastomas. De confirmarse nuestros resultados, los tumores benignos presentarían una mayor infiltración de células linfocitarias y, lo que es más relevante, estas células del sistema inmunitario se encontrarían funcionalmente activadas en este tipo de tumores. Las consecuencias de este hecho son muy relevantes desde un punto de vista clínico. Por un lado, la mayor infiltración tumoral por linfocitos B podría estar relacionada con una eventual producción de anticuerpos que contribuirían a la

destrucción del tumor benigno y a su eventual regresión espontánea. Por otro lado, la infiltración de los ganglioneuromas por linfocitos T contribuiría de forma directa a la acción citotóxica sobre las células tumorales y, por tanto, a la regresión tumoral por un mecanismo directo (Feinmesser et al., 2004). La regresión tumoral espontánea y la diferenciación celular hacia neuroblastos no tumorales, serían, por tanto, procesos mediados por la acción de los linfocitos B y T que, a su vez, vendría determinada por la mayor expresión de antígenos de histocompatibilidad en la superficie de los tumores de bajo riesgo.

Además de lo dicho anteriormente, los neuroblastomas más malignos presentaron niveles significativamente más bajos de expresión de dos genes cuya función está relacionada con la **adhesión de las células** al tejido en el que se originaron (por ejemplo, *CD44* y *CD58*), por lo que, teóricamente, estos tumores podrían tener menos dificultades a la hora de liberarse de su entorno tisular para migrar a distancia y generar metástasis en otros órganos y tejidos. Por otra parte, estudios previos demostraron que el gen *CD58* lleva a cabo una función importante en la atracción de los linfocitos T hacia los diferentes tejidos, por lo que la sobreexpresión de este gen podría estar igualmente relacionada con la mayor presencia de genes linfocitarios en tumores neuroblásticos de bajo grado (Shao et al., 2005). A su vez, López y colaboradores (2001) lograron demostrar que la activación de los linfocitos T mediante la proteína CD58 está relacionada directamente con la producción de diferentes interleucinas, especialmente interleucina 12, por parte de estos linfocitos T.

CONCLUSIONES

De los resultados de este estudio, podemos inferir las siguientes conclusiones:

1- El análisis de muestras de neuroblastoma, ganglioneuroma y médula ósea normal mediante microarray permitió identificar **perfiles de expresión específicos para cada tipo de muestra**. En general, los neuroblastomas mostraron mayor expresión de genes relacionados con proliferación celular y metástasis, mientras que los ganglioneuromas expresaron genes de diferenciación celular y la médula ósea, genes de hematopoyesis.

2- El análisis comparado permitió identificar un grupo de genes cuya expresión era significativamente distinta entre los tres grupos de muestras, siendo **específicos de los tumores más agresivos** o bien de los **tejidos no tumorales**.

3- La utilización de los genes previamente seleccionados por su especificidad permitió clasificar las muestras en el 100% de los casos (**valor diagnóstico**), así como efectuar pronósticos de supervivencia vital (**valor pronóstico**).

4- Por todo lo anterior, concluimos que la **cuantificación de la expresión** de determinados genes presenta enorme **utilidad clínica potencial**, por lo que, si estos resultados se confirman en una cohorte mayor de tumores, esta técnica podría ser considerada durante el proceso diagnóstico y pronóstico de los tumores neuroblásticos infantiles.

BIBLIOGRAFÍA

Alaminos M, Davalos V, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M. Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(16):1208-19.

Alaminos M, Davalos V, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M. Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(16):1208-19.

Alaminos M, Davalos V, Ropero S, Setien F, Paz MF, Herranz M, Fraga MF, Mora J, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M. EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma. *Cancer Res.* 2005;65(7):2565-71.

Alaminos M, Mora J, Cheung NK, Smith A, Qin J, Chen L, Gerald WL. Genome-wide analysis of gene expression associated with MYCN in human neuroblastoma. *Cancer Res.* 2003;63(15):4538-46.

Ambros IM, Zellner A, Roald B, Amann G, Ladenstein R, Printz D, et al. Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *New Engl J Med* 1996; 334 (23):1505-11.

Ambros PF, Ambros IM, Strehl S, Bauer S, Luegmayr A, Kovar H, et al. Regression and progression in neuroblastoma, Does genetics predict tumor behavior? *Eur J Cancer* 1995;31A: 510-15.

Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998;72:141-96.

Beckwith JB, Perrin EV. In-situ neuroblastoma: its contribution to the natural history of neural crest tumors. *Am J Pathol* 1963;43: 1089-104.

Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* Philadelphia (PA): Lippincott; 2002. p. 895-937.

Brodeur MB. Clinical and biological aspects of neuroblastoma. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer.* New York (NY): McGraw-Hill; 2002. p. 751–72.

Castleberry RP. Neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997;33:1430-7.

Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of neural crest lineages. *Cancer Res* 1989;49:219–25.

D'Angio GJ, Evans AE, Koop CE. Special pattern of widespread neuroblastoma with a favorable prognosis. *Lancet* 1971;1:1046-9.

Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, Wiewrodt BR, Ho R, Ikegaki N, et al. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res* 2001;61:1314–9.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225–9.

Esteller, M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 2003;4:351–8.

Evans AE, Gerson J, Schnauffer L. Spontaneous regression of neuroblastoma. *Natl Cancer Inst Monogr* 1976;44:49–54.

Feinmesser M, Okon E, Schwartz A, Kaganovsky E, Hardy B, Aminov E, Nageris B, Sulkes J, Feinmesser R. Histologic and immunohistochemical characterization of tumor and inflammatory infiltrates in oral squamous cell carcinomas treated with local multikine immunotherapy: the macrophage at the front line. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2004;261(7):359-68.

Hasegawa R, Tatematsu M, Imaida K, Murasaki G, Ito N, Watanabe I, Nakazato M. Neuroblastoma in situ. *Acta Pathol Jpn.* 1982;32(3):537-46.

Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-54.

Hessner MJ, Liang M, Kwitek AE. The application of microarray analysis to pediatric diseases. *Pediatr Clin North Am.* 2006;53(4):579-90.

Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nature Med* 1995;1(3):249-55.

Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21:163–7.

Lopez RD, Waller EK, Lu PH, Negrin RS. CD58/LFA-3 and IL-12 provided by activated monocytes are critical in the in vitro expansion of CD56+ T cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2001;49(12):629-40.

Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cisretinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* 1999;341:1165–73.

Modlich O, Prisack HB, Bojar H. Breast cancer expression profiling: the impact of microarray testing on clinical decision making. *Expert Opin Pharmacother*. 2006;7(15):2069-78.

Mora J, Cheung NK, Kushner BH, et al. Loss of Heterozygosity on chromosome arm 1p correlates with clinical categories of neuroblastoma. *J Mol Diagn* 2000, 2:37-46.

Mora J, Cheung NKV, Juan G, Illei P, Cheung I, Chi S, Ladanyi M, Cordon-Cardo C and Gerald WL. Schwannian cells of neuroblastoma are derived from a tumoral cell progenitor. *Cancer Res* 61: 6892-6898, 2001.

Mora J, Gerald WL, Qin J, Cheung NK. Molecular genetics of neuroblastoma and the implications for clinical management: a review of the MSKCC experience. *Oncologist* 2001;6:263–8.

Oppenheimer O, Alaminos M, Gerald WL. Genomic medicine and neuroblastoma. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:39–54

Raffaghello L, Prigione I, Airoidi I, Camoriano M, Levreri I, Gambini C, Pende D, Steinle A, Ferrone S, Pistoia V. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia*. 2004;6(5):558-68.

Reynolds ML, Woolf. Reciprocal Schwann cell-axon interactions. *Curr Opin Neurobiol* 1993;3:683-93.

Ross RA, Biedler JL, Spengler BA. A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Lett* 2003;197:35–9.

Ross RA, Spengler BA, Domenech C, Porubcin M, Rettig WJ, Biedler JL. Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth Differ* 1995;6:449–56.

Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Fehse N, Hero B, et al. Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med* 2002;346:1047-53.

Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Fehse N, Hero B, et al. Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med* 2002;346:1047-53.

Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 2003;4:472-80.

Shao JY, Yu Y, Dustin ML. A model for CD2/CD58-mediated adhesion strengthening. *Ann Biomed Eng*. 2005;33(4):483-93.

Shimada H. Tumors of the neuroblastoma group. In: Pathology: State of the art reviews, R. Williams, ed., Philadelphia, Pa, Hanley & Belfus, Inc., 1993;2:43-59.

Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, et al. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2000;6:529–35.

van Noesel MM, van Bezouw S, Salomons GS, Voute PA, Pieters R, Baylin SB, et al. Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DCR1 and DCR2 is associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Res* 2002;62: 2157–61.

van Noesel MM, van Bezouw S, Voute PA, Herman JG, Pieters R, Versteeg R. Clustering of hypermethylated genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:226–33.

Wolfl M, Jungbluth AA, Garrido F, Cabrera T, Meyen-Southard S, Spitz R, Ernestus K, Berthold F. Expression of MHC class I, MHC class II, and cancer germline antigens in neuroblastoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54(4):400-6.