



Patrón de expresión de tres genes como marcador de predicción pronóstica en neuroblastoma. Mecanismos de regulación transcripcional y función de los genes seleccionados

Gemma Mayol Ricart

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

**“Patrón de expresión de tres genes como marcador de predicción pronóstica en neuroblastoma.
Mecanismos de regulación transcripcional y función de los genes seleccionados”**

Laboratorio de tumores del desarrollo,
Hospital-Fundación Sant Joan de Déu

Gemma Mayol Ricart, Noviembre 2012



UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

**“Patrón de expresión de tres genes como marcador de predicción pronóstica en neuroblastoma.
Mecanismos de regulación transcripcional y función de los genes seleccionados”**

Memoria presentada por Gemma Mayol Ricart para optar al título de doctora
por la Universidad de Barcelona

La realización de este trabajo ha contado con el soporte económico otorgado por el Ministerio de Sanidad de España (Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria 2007; PI070286) y por la Sociedad Española Contra el Cáncer (AECC 2007). Así mismo la doctorada ha disfrutado entre los años 2011-2012 de una beca predoctoral para la formación de personal investigador concedida por el Hospital Sant Joan de Déu (BR201102).

VºBº de la directora de tesis,
Dra. Cinzia Lavarino

VºBº del codirector de tesis,
Dr. Jaume Mora

VºBº del tutor,
Dr. Diego Arango del Corro

La doctoranda,
Gemma Mayol Ricart

Índice

Anexos

Abreviaciones

Bibliografía

Conclusiones

Discusión

Resultados

Hipótesis y Objetivos

Introducción

Introducción	9
1. Tumores Neuroblásticos	11
1.1 Incidencia	11
1.2 Origen	11
1.3 Presentación clínica y sintomatología	12
1.4 Comportamiento clínico y tratamiento	13
Regresión espontánea o involución	
Maduración sin progresión	
Progresión y metástasis	
1.5 Características genético-moleculares con valor pronóstico	13
Aneuploidía	
Amplificación del oncogén MYCN	
Ganancia del cromosoma 17	
Pérdida del cromosoma 1	
Pérdida del cromosoma 11	
1.6 Variables clínicas de valor pronóstico	15
Edad	
Extensión de la enfermedad	
1.7 Sistemas de clasificación y estratificación de riesgo clínico	16
Clasificación histológica	
Clasificación Histológica Internacional del NB: Clasificación de Shimada	
Sistema Internacional de Estadificación del NB	
Sistema de Clasificación Internacional de los NB en Grupos de Riesgo	
Sistema de clasificación del riesgo clínico en NB del Grupo de Oncología Pediátrica de los Estados Unidos	
Sistema de clasificación de riesgo clínico en NB del Ensayo Clínico NB2004, del Grupo de Oncología y Hematología Pediátrica Alemán	
Sistema de clasificación del riesgo clínico en NB del Grupo Japonés de Estudios Avanzados en NB	
Sistema de clasificación del riesgo clínico en NB del Grupo de Estudio de NB de la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica Europea	
2. Clasificación molecular de los neuroblastomas	22
2.1 Análisis de expresión génica mediante <i>microarrays</i> de ADN	22
Tecnología de <i>microarrays</i> de ADN	
<i>Microarrays</i> de ADN para el análisis de la expresión génica	
2.2 Identificación de perfiles de expresión génica para la predicción de pronóstico y las aplicaciones en la práctica clínica	23
3. Mecanismos de modulación de la expresión génica	24
4. Metilación del ADN	25
4.1 Alteración del patrón de metilación del ADN en cáncer	26
Hipermetilación	
Hipometilación	
4.2 Técnicas para el análisis del patrón de metilación del ADN	27
<i>Microarrays</i> de ADN para el estudio global del patrón de metilación del ADN	
Pirosecuenciación	
5. Proteínas remodeladoras de la cromatina	30
5.1 Proteínas de la superfamilia SNF2	30
Familia SWI/SNF	
Familia ISWI	
Familia INO80	
Familia CHD	
5.2 Chromodomain Helicase DNA-binding protein 5	31
CHD5 en tejido normal	
CHD5 y cáncer	

Hipótesis y Objetivos	33
1. Hipótesis	35
2. Objetivos	35
2.1 Objetivo General	35
2.2 Objetivos Específicos	35
Resultados	37
1. Modelo estadístico de predicción de pronóstico para pacientes afectos de neuroblastoma basado en el perfil de expresión génica de tres genes.	39
2. La expresión de la proteína específica de neurona CHD5 es un marcador de pronóstico independiente en neuroblastoma.	65
3. La hipometilación del ADN afecta a funciones biológicas relacionadas con el cáncer y a genes relevantes para la patogénesis del neuroblastoma.	85
Discusión	97
Conclusiones	107
Bibliografía	111
Abreviaciones	125
Anexos	129
Anexo 1 Tabla resumen del Sistema de clasificación del riesgo clínico en NB del Grupo de Oncología Pediátrica de los Estados Unidos.	131
Anexo 2 Tabla resumen del Sistema de clasificación de riesgo clínico en NB del Ensayo Clínico NB2004, del Grupo de Oncología y Hematología Pediátrica Alemán.	131
Anexo 3 Tabla resumen del Sistema de clasificación del riesgo clínico en NB del Grupo Japonés de Estudios Avanzados en NB.	132
Anexo 4 Tabla resumen del Sistema de clasificación del riesgo clínico en NB del Grupo de Estudio de NB de la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica Europea.	132
Anexo 5 Artículos publicados donde también ha participado la doctoranda: Acosta S <i>et al. Identification of tumoral glial precursor cells in neuroblastoma. Cancer Letters</i> 2011, 312: 73–81.	133
Anexo 6 Informe de los directores de tesis acreditando la contribución de la doctoranda a los artículos que sustentan la tesis.	142
Agradecimientos	145

Introducción

Anexos

Abreviaciones

Bibliografía

Conclusiones

Discusión

Resultados

Hipótesis y Objetivos

Introducción

1. Tumores Neuroblásticos

La primera descripción histológica de los tumores neuroblásticos (TN) fue en el año 1865, cuando el patólogo alemán Rudolph Ludwig Karl Virchow, describió “distensiones nodulares de la glándula suprarrenal con dos o tres tumefacciones del tamaño de un guisante o de una cereza, que surgían de la médula suprarrenal” (Virchow R 1864). Los tumores que cumplían dichas características se clasificaron provisionalmente en el grupo de los gliomas. Hace aproximadamente un siglo, en 1910, el Dr. James Homer Wright utilizó por primera vez el término “neuroblastoma” (NB) para describir estos tumores infantiles, sugiriendo un posible origen neural (Wright JH 1910).

Los TN conforman un grupo de tumores heterogéneos debido a sus características morfológicas, genéticas y biológicas, que se manifiestan en una evolución clínica muy variable mostrando en ocasiones una proliferación agresiva y resistente al tratamiento, y en otras, una regresión o maduración espontánea (Ambros PF *et al.* 1995).

1.1 Incidencia

Los TN son los tumores sólidos extracraneales más frecuentes en niños, representan el 7-10% del conjunto de neoplasias pediátricas (Kaatsch P 2010). La incidencia anual estimada es de 10.9 casos por millón de niños de edad inferior a 15 años. Es decir, los TN afectan a 1 de cada 7000 recién nacidos vivos (Ora I y Eggert A 2011). La mayor incidencia tiene lugar durante el primer año de vida, siendo la edad media de diagnóstico de 20 meses. Es importante destacar que más del 90% de los casos de TN se diagnostica antes de los 6 años. Los TN representan el 15% de las muertes por cáncer en niños menores de 15 años (Ora I y Eggert A 2011). En el Estado Español se diagnostican aproximadamente 65 casos de TN por año, de acuerdo con las estadísticas del Registro Nacional de Tumores Infantiles de España (RNTI). Según el último informe estadístico disponible del RNTI durante el periodo 1990-2009 se registraron un total de 1351 casos de TN en niños entre 0-14 años de edad (Peris-Bonet R *et al.* 2010).

Los índices de incidencia han sido controvertidos durante las últimas décadas. Los avances en la tecnología, la mejora de la resolución de las técnicas ecográficas y de la detección de catecolaminas en orina, permitieron diseñar estudios de cribado neonatal con el objetivo de detectar de forma más precoz dicha enfermedad (Woods WG 2005). Estos estudios se sustentaron sobre la hipótesis que los tumores más agresivos y con peor pronóstico evolucionaban de formas más benignas que aparecían habitualmente en lactantes; así la detección precoz de los tumores supondría una mejora en la supervivencia de los pacientes. Los estudios de cribado neonatal se iniciaron en Japón, pero posteriormente se desarrollaron en Francia, Alemania, Canadá y Norte América. A pesar del aumento de las tasas de diagnóstico estas no repercutieron en una disminución de las tasas de mortalidad. La mayoría de los tumores detectados en los cribados neonatales eran TN de bajo riesgo (tumores no metastásicos, localizados y de regresión o maduración espontánea) que hubieran pasado desapercibidos sin consecuencias clínicas, motivo por el cual el cribado neonatal no mejoró los índices de supervivencia (Brodeur GM *et al.* 2003; Woods WG 2005; Maris JM *et al.* 2007; Esiashvili N *et al.* 2009). Todo ello ha conllevado que los cribados neonatales no se hayan implantado como una práctica clínica.

1.2 Origen

Los TN son tumores del desarrollo, puesto que su origen es embrionario. Estos tumores se originan de células inmaduras de la cresta neural ya comprometidas en la diferenciación del sistema nervioso simpático (Mora J y Gerald W 2004).

La cresta neural es una población transitoria de células embrionarias migratorias y pluripotenciales que derivan de la porción más dorsal de la capa ectodérmica. Durante la neurulación, la notocorda induce la división y reorganización del ectodermo superior en tres conjuntos celulares: el tubo neural, las células precursoras de la epidermis y las células de la cresta neural.

La cresta neural se origina de la porción medial y posterior de los pliegues neurales que rodean la placa neural y la separa de la futura epidermis. Las células de la cresta neural migran desde la porción dorsal hasta los múltiples destinos donde darán lugar a un amplio espectro de linajes celulares: células del sistema nervioso periférico (neuronas y células de Schwann), células cromafines de la médula suprarrenal, melanocitos, pericitos y células de la musculatura lisa del sistema vascular, y células del esqueleto craneofacial (condrocitos, osteoblastos y odontoblastos) (Mora J y Gerald W 2004). Las células de la cresta neural son células multipotenciales que pierden gradualmente esta potencialidad durante el proceso de migración y diferenciación.

La médula de la glándula suprarrenal es un ganglio simpático modificado al estar inervado por terminaciones preganglionares del sistema nervioso simpático. La médula de la glándula suprarrenal está constituida principalmente por células neurosecretoras, denominadas células cromafines (nombre derivado de su afinidad para los sales de cromo),

que secretan catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) estimuladas por el sistema nervioso simpático en respuesta a estados de estrés. En la médula suprarrenal se localizan, de forma fisiológica, hasta la semana 24 de gestación agregados de células neuroblásticas inmaduras que diferencian a células cromafines como consecuencia de la acción paracrina de los glucocorticoides. Se definen como NB *in situ* o microscópicos cuando estos agregados se observan en edades post-natales (Mora J y Gerald W 2004).

Evidencias *in vitro* e *in vivo* demuestran el origen embrionario de estos tumores a la vez que sugieren que derivan de un bloqueo del proceso normal de diferenciación de células progenitoras neurales (Mora J y Gerald W 2004; van Noesel MM y Versteeg R 2004).

1.3 Presentación clínica y sintomatología

Debido a su origen embrionario, los TN pueden desarrollarse en cualquier localización del sistema nervioso simpático (Figura 1) (Mora J y Gerald W 2004; Ora I y Eggert A 2011). La sintomatología y los signos de presentación clínica de los TN son dependientes de la localización del tumor primario o de la presencia de metástasis. La mayoría (65%) de TN se originan en el retroperitoneo, principalmente en la glándula suprarrenal (44%) o en ganglios paraespinales (22%).

Otras regiones menos frecuentes son el mediastino posterior (15%), la pelvis (5%) o el cuello (<5%) (Mora J *et al.* 2006). Aproximadamente el 50% de los pacientes presentan una enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico, generalmente localizada en hueso (60%), médula ósea (50%), ganglios linfáticos (42%) e hígado (15%) (David R *et al.* 1989; Kushner BH 2004). Muy raramente se observan metástasis en pulmón o en el sistema nervioso central (de la Monte SM *et al.* 1983; Kushner BH 2004).

Un 40% de los TN son tumores localizados, denominados tumores loco-regionales, con o sin afectación de ganglios linfáticos próximos, que se detectan mayoritariamente de forma fortuita (por ultrasonografía prenatal o por radiografías de pecho). Algunos de estos tumores, pueden diagnosticarse por la compresión de estructuras adyacentes, por ejemplo, aquellos tumores localizados en el mediastino superior que causan dificultades respiratorias. Ocasionalmente, los tumores loco-regionales causan síntomas derivados de la secreción paracrina tumoral de sustancias como el péptido intestinal vasoactivo, dando lugar a diarrea acuosa o la inducción de una reacción autoinmune que puede presentarse como una ataxia cerebelosa o un síndrome de opsoclonus-mioclonus (síndrome de Kinsbourne). Este último se caracteriza por movimientos multidireccionales rápidos de los ojos (opsoclonos), mioclonías y ataxia del tronco. Los pacientes metastásicos, a diferencia de los loco-regionales, presentan una sintomatología más general, que incluye dolor, fiebre y una alteración del estado general con astenia y palidez (Berthold F y Simon T 2005; Mora J *et al.* 2006).

El diagnóstico de los TN se establece únicamente mediante el análisis histológico de células tumorales en biopsias tisulares. El consenso internacional acepta asimismo que el diagnóstico pueda establecerse con la detección de células neuroblásticas tumorales en los aspirados de médula ósea, acompañado de concentraciones elevadas de catecolaminas en orina (Berthold F y Simon T 2005; Maris JM *et al.* 2007; Ora I y Eggert A 2011).

Los metabolitos urinarios de la degradación de las catecolaminas (ácido vanilmandélico y ácido homovanílico) representan uno de los marcadores más sensibles y específicos de la enfermedad. La inmadurez en el procesamiento de las catecolaminas en las células neuroblásticas, implica que en la mayoría (90-95%) de los TN se detecten concentraciones elevadas de catecolaminas. En algunos casos, los niveles elevados de catecolaminas pueden causar hipertensión (Berthold F y Simon T 2005; Mora J *et al.* 2006).

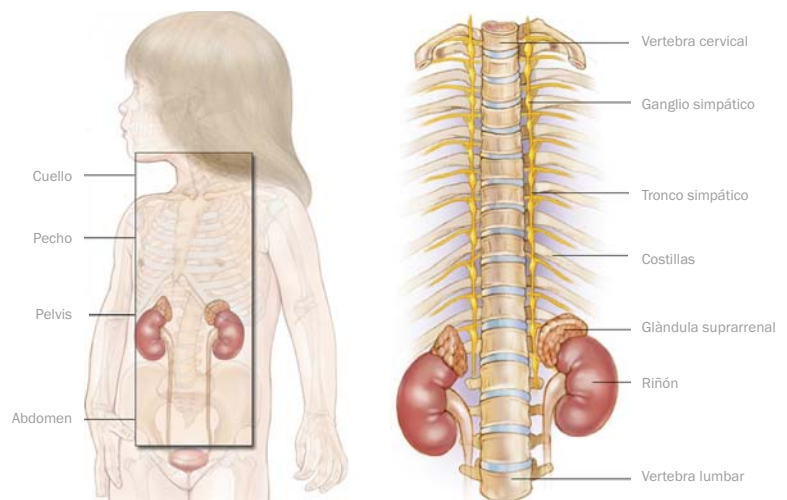


Figura 1. Distribución anatómica de la localización de los TN. Adaptación de American Society of Clinical Oncology.

1.4 Comportamiento clínico y tratamiento

La heterogeneidad biológica de los TN se ve reflejada en su comportamiento clínico (Ambros PF 1995), lo que conlleva un enfoque terapéutico distinto en cada caso. Los diferentes sistemas de estadificación y clasificación del riesgo clínico (descritos en el apartado 1.7) pretenden predecir la evolución clínica de cada tumor con el fin de poder aplicar el tratamiento más adecuado (Berthold F y Simon T 2005; Maris JM 2010; Ora I y Eggert A 2011).

Regresión o involución espontánea

La regresión o involución espontánea de tumores en pacientes con TN es una evolución clínica bien documentada (D'Angio GJ *et al.* 1971; Maris JM 2010). Es el caso de los NB estadio 4S, tumores generalmente de célula indiferenciada con elevado índice de proliferación, que se presentan en niños con edades inferiores a 12 meses, con enfermedad diseminada a hígado, piel y médula ósea (<10% de infiltración) pero sin afectación a hueso. El estadio 4S se describió clínicamente por primera vez en 1971 para discriminar aquellos lactantes con enfermedad diseminada con un patrón metastásico característico y una alta probabilidad de regresión espontánea (D'Angio GJ *et al.* 1971). Además, los hallazgos microscópicos *post-mortem* de células inmaduras de la cresta neural en glándulas suprarrenales de neonatos muertos por causas ajenas al cáncer (Beckwith JB y Perrin EV 1963) y los resultados de los cribados neonatales (Brodeur GM *et al.* 2003; Berthold F y Simon T 2005; Maris JM *et al.* 2007; Esiasvili N *et al.* 2009; Modak S y Cheung NK V 2010) indican que la incidencia de TN es mayor que el número de TN clínicamente detectado; sugiriendo que algunos tumores tienen la capacidad de regresar espontáneamente.

Los NB estadio 4S, no siempre pueden distinguirse con claridad de los NB estadio 4 de lactantes; tumores indiferenciados y metastásicos de alto riesgo clínico. La distinción entre ambos subtipos de NB es primordial para establecer un tratamiento adecuado, ya que los NB 4S presentan supervivencias superiores al 90% sin tratamiento citotóxico debido a su capacidad de involucionar espontáneamente, mientras que los NB estadio 4, con índices de supervivencia inferiores al 50%, precisan de un tratamiento intensivo multimodal (Kushaner BH y Cohn SL 2005; Maris JM 2010; Modak S y Cheung NK V 2010). La dificultad de esta distinción precisa y la falta de un marcador molecular para ello puede llevar a sobretratar los pacientes con NB 4S.

Maduración sin progresión

La capacidad de maduración sin progresión tumoral es un fenómeno biológico propio de los TN loco-regionales (Mora J *et al.* 2006; Ambros PF *et al.* 2009). Generalmente los pacientes con TN loco-regionales tienen un pronóstico clínico excelente, con índices de supervivencia superiores al 95%, independientemente de si reciben o no tratamiento con quimioterapia o radioterapia. Sin embargo existe un subgrupo de TN loco-regionales con una evolución clínica más agresiva, estos se caracterizan por poseer alteraciones genético-moleculares que se asocian a un pronóstico desfavorable (ver apartado 1.5) (Mora J *et al.* 2006; Maris JM 2010).

El potencial de maduración de la célula neuroblástica no puede ser constatado clínicamente porque no se dispone de marcadores moleculares para ello, por consiguiente muchos TN loco-regionales acaban siendo sometidos a quimio- y/o radioterapia innecesariamente (Berthold F y Simon T 2005; Kusher BH y Cohn SL 2005; Maris JM 2010).

Progresión y metástasis

Los NB estadio 4 y los tumores loco-regionales con alteraciones genético-moleculares asociadas a un pronóstico desfavorable (ver apartado 1.5), se caracterizan por tener índices de proliferación elevados y un comportamiento clínico agresivo (Maris JM *et al.* 2007; Ambros PF *et al.* 2009). La estrategia terapéutica para este grupo de tumores es compleja y se basa en un tratamiento intensivo multimodal que incluye: cirugía, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia. A pesar de ello los índices de supervivencia de estos pacientes son inferiores al 50% (Berthold F y Simon T 2005; Matthey KK y Cheung NK V 2005; Maris JM 2010; Modak S y Cheung NK V 2010). Además, aproximadamente un 60% de los supervivientes desarrollan recidivas y/o resistencias o toxicidades secundarias al tratamiento (Maris JM 2010; Modak S y Cheung NK V 2010).

1.5 Características genético-moleculares con valor pronóstico

En los últimos años se han descrito diversas anomalías genético-moleculares implicadas en el comportamiento clínico de los TN. Entre ellas destacan por su frecuencia e importancia pronóstica, las alteraciones de la ploidía, las translocaciones desequilibradas y deleciones de regiones cromosómicas recurrentes, así como la amplificación del oncogén *v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (MYCN)* (van Noesel MM y Versteeg R 2004; Maris JM *et al.* 2007; Owens C y Irwin M 2012).

Aneuploidía

La alteración del contenido de ácido desoxirribonucleico (ADN), es decir, la pérdida y/o ganancia de uno o más cromosomas en un genoma diploide, es una forma de inestabilidad génica observada en numerosas neoplasias (Gordon

DJ et al. 2012). El contenido de ADN (ploidía) de los TN nos permite distinguir tres grupos: tumores cuasi-triploides, tumores cuasi-diploides y tumores cuasi-tetraploides. Los tumores loco-regionales (pronóstico favorable) muestran habitualmente un contenido de ADN cuasi-triploide (de 58 a 80 cromosomas) caracterizado por ganancias y pérdidas de cromosomas enteros y pocas aberraciones cromosómicas estructurales. A diferencia de los anteriores, los tumores más agresivos (pronóstico desfavorable), habitualmente metastásicos, son cuasi-diploides (de 44 a 57 cromosomas) o cuasi-tetraploides (de 81 a 103 cromosomas), y presentan alteraciones estructurales con translocaciones cromosómicas desbalanceadas (Maris JM et al. 2007; Lavarino C et al. 2008).

El valor pronóstico de la ploidía tiene mayor incidencia en los pacientes menores de dos años de edad (Look AT et al. 1991; Maris JM et al. 2007; Owens C y Irwin M 2012) y en los pacientes no metastásicos (Mora J et al. 2001). Recientemente, el índice de ADN tumoral ha sido incluido, junto al estado de amplificación del oncogén *MYCN* y el estado alélico de la región cromosómica 11q23, como marcador para la predicción de pronóstico en el Sistema Internacional de Clasificación del NB (INRG, del inglés *International Neuroblastoma Risk Group*) (ver apartado 1.7) (Ambros PF et al. 2009; Owens C y Irwin M 2012).

Amplificación del oncogén *MYCN*

La amplificación del oncogén *MYCN*, localizado en la región cromosómica 2p24, es la anomalía genética más significativamente asociada con una elevada agresividad clínica del NB, baja respuesta al tratamiento e índices de supervivencia bajos en los pacientes (Brodeur GM et al. 1984; Maris JM et al. 2007; Ora I y Eggert A 2011; Owens C y Irwin M 2012).

La amplificación de *MYCN* se identifica en un 20-25% de los NB primarios (Gerard WL 2005; Maris JM et al. 2007; Ora I y Eggert A 2011), en forma de cuerpos cromatínicos (DM, del inglés *Double Minute*) o de regiones cromosómicas de tinción homogénea (HSR, del inglés *Homogeneously Staining Regions*) que contienen entre 50 y 500 copias del gen (van Noesel MM y Versteeg R 2004). Esta alteración, la amplificación de *MYCN*, se ha identificado en la mayoría de los tumores que presentan delección del cromosoma 1p, contrariamente no se presenta nunca concomitantemente con la pérdida alélica de la región cromosómica 11q (ver más adelante).

El gen *MYCN* pertenece a la familia de oncogenes *MYC*. Codifica una fosfoproteína nuclear de estructura bHLH (*basic helix-loop-helix*) que actúa como factor de transcripción (van Noesel MM y Versteeg R 2004). Esta proteína está involucrada en la regulación del ciclo celular, en la respuesta celular a daño del ADN así como en procesos de diferenciación y apoptosis (Speleman F et al. 2011).

Ganancia del cromosoma 17

La ganancia, total o parcial, del cromosoma 17 es una de las aberraciones más frecuentes en NB y se detecta aproximadamente en un 80% de los casos (van Noesel MM y Versteeg R 2004; Owens C y Irwin M 2012). La adquisición de una copia del cromosoma 17 entero se asocia a tumores cuasi-triploides (40%), TN de pronóstico menos agresivo. Mientras que la ganancia del segmento distal del brazo largo del cromosoma 17 (<50% de NB), mayoritariamente de la región 17q21-qter, se relaciona con fenotipos tumorales agresivos (van Noesel MM y Versteeg R 2004; Maris JM et al. 2007; Ora I y Eggert A 2011).

El mecanismo responsable de la ganancia de la región 17q es una translocación desequilibrada con diversas regiones receptoras. El receptor más común de la translocación es el segmento distal del brazo corto del cromosoma 1 (1p36), de modo que la ganancia de la porción distal de 17q se asocia habitualmente con la pérdida de 1p distal (Savelyeva L et al. 1994; Bown N et al. 1999; van Noesel MM y Versteeg R 2004).

La amplificación cromosómica de esta región sugiere que el incremento del número de copias de uno o más genes confiere ventajas en la supervivencia de la célula tumoral. Se ha identificado la sobreexpresión de algunos genes localizados en esta región, entre ellos *Baculoviral IAP repeat containing 5 (BIRC5)*, *Non metastatic cells 1, protein expressed in (NME1)* o *Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1D (PPM1D)* (van Noesel MM y Versteeg R 2004; Maris JM et al. 2007; Owens C y Irwin M 2012).

Pérdida del cromosoma 1

La pérdida del brazo corto del cromosoma 1 es una de las anomalías genéticas más frecuentes en NB. La delección más común es la de región 1p36, identificada en un 25-35% de los NB primarios. Dicha delección se asocia a NB de pronóstico desfavorable y a otras alteraciones moleculares como la amplificación del oncogén *MYCN* y la ganancia de la región cromosómica 17q (Mora J et al. 2000; Schwab H 2005; Mora J et al. 2006; Ora I y Eggert A 2011).

La elevada incidencia de la pérdida del cromosoma 1p ha llevado a la búsqueda de potenciales genes supresores de tumores (GST) en esta localización (White PS et al. 2005; Ora I y Eggert A 2011; Owens C y Irwin M 2012). Se han identificado varios genes posibles candidatos, como por ejemplo *Calmodulin binding transcription activator 1 (CAMTA1)*

(Barbashima V et al. 2005; Henrich KO et al. 2011), *Chromodomain helicase DNA binding protein 5 (CHD5)* (Bagchi A et al. 2007; Fujita T et al. 2008), *Retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene (RIZ)* (Geli J et al. 2010) o *Castor zinc finger 1 (CASZ1)* (Liu Z et al. 2011).

Pérdida del cromosoma 11

La pérdida alélica de la región cromosómica 11q se identifica en un 35-45% de los NB primarios, siendo la pérdida de la región 11q23 la delección más frecuente (Maris JM et al. 2007; Ora I y Eggert A 2011). Esta alteración se asocia directamente con la pérdida de la región 14q e inversamente con la pérdida de la región cromosómica 1p36, así como con la amplificación del oncogén *MYCN* (Brodeur GM 2003; Ora I y Eggert A 2011). La pérdida de la región 11q se asocia con tumores clínicamente más agresivos y con índices de supervivencia bajos en los pacientes, siendo un marcador de pronóstico independiente para la supervivencia global de pacientes cuyos tumores no presentan amplificación de *MYCN* (Simon T et al. 2006; Maris JM et al. 2007; Ora I y Eggert A 2011).

1.6 Variables clínicas de valor pronóstico

En los TN la edad, las características histológicas del tumor, la localización y diseminación de la enfermedad al diagnóstico son los factores de pronóstico clínico mejor establecidos (Mora J et al. 2006; Maris JM et al. 2007; Ora I y Eggert A 2011).

Edad

En 1970 el Dr. Norman Breslow y la Dra. Barbara McCann observaron que los niños con NB de más edad presentaban peor pronóstico (Breslow N y McCann B 1971). Diversos estudios han demostrado que existe una relación inversa entre la edad del paciente al diagnóstico y el pronóstico, disminuyendo la probabilidad de supervivencia al aumentar la edad (Mora J et al. 2006; Maris JM et al. 2007). Así, los lactantes menores del año y medio de edad tienen mejor pronóstico comparado con los niños de mayor edad.

Los lactantes presentan más frecuentemente tumores loco-regionales o de regresión espontánea, y en el caso de presentar tumores diseminados estos son, habitualmente, menos agresivos que en pacientes mayores. Por otro lado, los casos metastásicos diagnosticados en pacientes mayores de 5 años de edad y en adolescentes tienen una evolución que, si bien resulta mortal en su mayoría, su curso es más indolente comparado con los tumores metastásicos diagnosticados en niños entre año y medio y 5 años de edad (Mora J et al. 2006; Maris JM 2010; Modak S y Cheung NK V 2010).

Históricamente se consideraron los 12 meses de edad como el punto de corte para distinguir entre pacientes con pronóstico favorable y pacientes con pronóstico desfavorable (Evans AE 1980). Pero en el año 2005 diversos estudios demostraron un aumento de la supervivencia en pacientes con edades comprendidas entre los 12 y 18 meses en diferentes subgrupos clínicos y biológicos, sugiriendo que el punto de corte más apropiado podría estar en los 18 meses (London WB et al. 2005; Schimdt M et al. 2005; George RE et al. 2005).

Extensión de la enfermedad

Dada la variedad de formas de presentación de los TN, así como la diversidad de órganos que afectan, el estudio de extensión de la enfermedad requiere el uso de multitud de pruebas (Kushner BH 2004; Mora J et al. 2006).

Ante la sospecha de un TN, el análisis del tumor mediante técnicas de imagen permite determinar la localización y detallar los márgenes de la lesión primaria, determinar la presencia de calcificaciones, evaluar la presencia de vasos en la lesión tumoral y determinar el grado de diseminación tumoral (metástasis) en la médula ósea, a órganos y a ganglios linfáticos adyacentes o a distancia. Las técnicas de imagen más utilizadas son la tomografía axial computarizada (TAC), la resonancia magnética nuclear (RMN) y los estudios gammagráficos (Kushner BH 2004; Mora J et al. 2006; Maris JM et al. 2007). Además de la detección por imagen de la extensión de la enfermedad, es necesario determinar el grado de infiltración por células neuroblásticas en la médula ósea, por ser un lugar frecuente de metástasis. Esta se determina mediante técnicas de inmunocitología y evaluando la expresión de genes específicos por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR, del inglés *quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*) en muestras de aspirados de médula ósea. Los marcadores más utilizados son *Beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1 (GD2 synthase)*, *Tyrosine Hydroxylase (TH)*, *Chromogranin A (CHGA)* o *Enolase 2 (gamma, neuronal) (ENO)* (Miyajima Y et al. 1995; Cheung IY y Cheung NK 2001; Ambros PF et al. 2003; Maris JM et al. 2007).

La médula ósea es un lugar frecuente de metástasis y de recaída de enfermedad en NB. El estudio de la enfermedad mínima residual (MRD, del inglés *Minimal Residual Disease*) en aspirados de médula ósea permite evaluar la respuesta al tratamiento del paciente. Existen diversas técnicas de laboratorio que permiten identificar, aunque con sensibilidad distinta, la presencia de células neuroblásticas en la médula ósea. Entre estas se encuentra el análisis histopatológico de la médula ósea, con nivel de sensibilidad limitada (1 célula de NB en 100 células de médula ósea), así como técnicas más sensibles como la inmunocitología, la citometría de flujo y la cuantificación por qRT-PCR de los niveles de expresión

de marcadores como *GD2 synthase*, *TH*, *Cyclin D1 (CCND1)*, *Paired-like homeobox 2b (PHOX2B)*, *Doublecortin (DCX)* o *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 53 (DDX53 o CAGE)* (Berthold F y Simon T 2005; Cheung IY et al. 2007; Stutterheim J et al. 2008; Beiske K et al. 2009).

1.7 Sistemas de clasificación y de estratificación de riesgo clínico

Clasificación histológica

Los TN están compuestos por dos componentes celulares: células neuroblásticas y células estromales de tipo Schwann. El grado de diferenciación de las células neuroblásticas y la proporción de células estromales determina la clasificación histológica de los TN en neuroblastoma, ganglioneuroma y ganglioneuroblastoma (Shimada H et al. 1999).

• **Neuroblastoma (NB):** tumor compuesto primordialmente por células neuroblásticas y pobre en estroma (<50% de células de Schwann). En función del grado de diferenciación de las células neuroblásticas puede clasificarse en:

- Neuroblastoma indiferenciado (Figura 2A): compuesto por células neuroblásticas indiferenciadas. Son células de tamaño pequeño o intermedio, escaso citoplasma, núcleo redondeado, cromatina granular gruesa (cromatina en “sal y pimienta”), y pueden contener más de un nucléolo. Las células de estos NB no presentan signo de diferenciación alguno, no se disponen en nidos o rosetas (rosetas de Homer-Wright), ni presentan un fondo fibrilar eosinófilo (neuropilo).

- Neuroblastoma pobremente diferenciado (Figura 2B): compuesto mayoritariamente por neuroblastos indiferenciados, comprende un 5% de células neuroblásticas con indicios de diferenciación celular. En algunos casos se disponen formando rosetas y/o presentan neuropilo.

- Neuroblastoma en diferenciación (Figura 2C): compuesto por abundante neuropilo y más de un 5% de los neuroblastos muestran signos de diferenciación. Se trata de células neuroblásticas de núcleo grande, nucléolos prominentes, cromatina vesicular y un citoplasma grande y eosinófilo.

• **Ganglioneuroma (GN) (Figura 3A):** tumor compuesto preponderantemente por células de Schwann y células ganglionares. Según el grado de maduración de las células ganglionares se distingue entre:

- Ganglioneuroma en maduración: formado por un estroma rico en células de Schwann y focos de neuroblastos diferenciados y/o células ganglionares en maduración.

- Ganglioneuroma maduro: se caracteriza por la presencia de estroma glial maduro y células ganglionares maduras sin la presencia de componente neuroblástico.

• **Ganglioneuroblastoma (GNB):**

- Ganglioneuroblastoma intermedio (GNBi) (Figura 3B): tumor compuesto mayoritariamente (>50%) por células de Schwann y focos de células neuroblásticas y células ganglionares en un fondo de abundante neuropilo. Los focos de células neuroblásticas están formados por una mezcla de neuroblastos en diferentes estados de diferenciación y repartidos aleatoriamente en el magma de tejido gangliomatoso.

- Ganglioneuroblastoma nodular (GNBn) (Figura 3C): tumor donde coexisten nódulos neuroblásticos indiferenciados macroscópicos y frecuentemente hemorrágicos, con GNBi o GN.

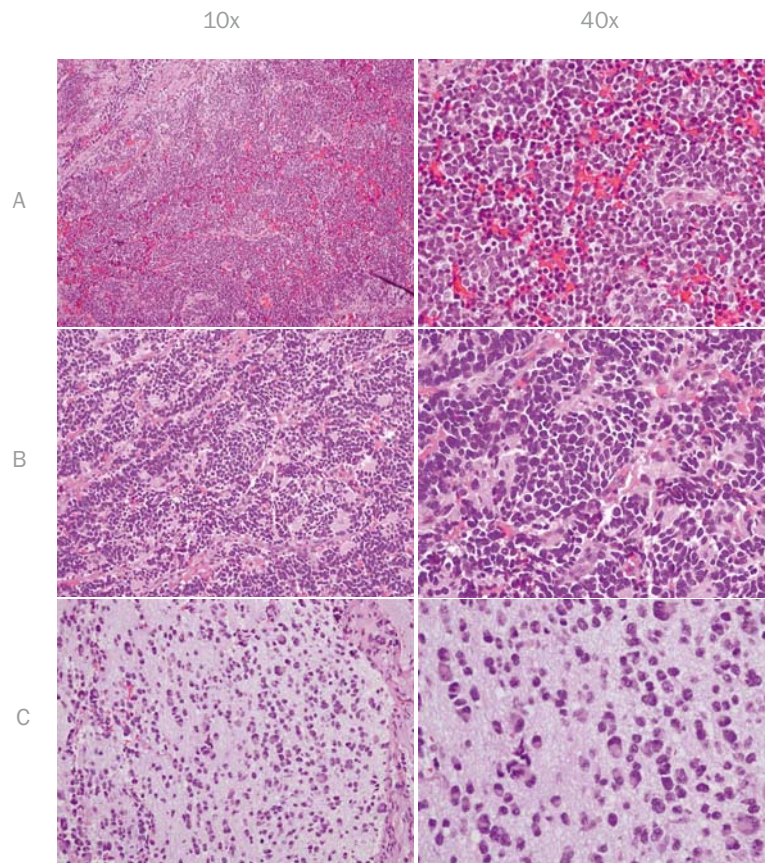


Figura 2: Fotografías de secciones tumorales teñidas con hematoxilina para ilustrar la morfología celular de los NB. A) NB indiferenciado, B) NB pobremente diferenciado y C) NB en diferenciación.

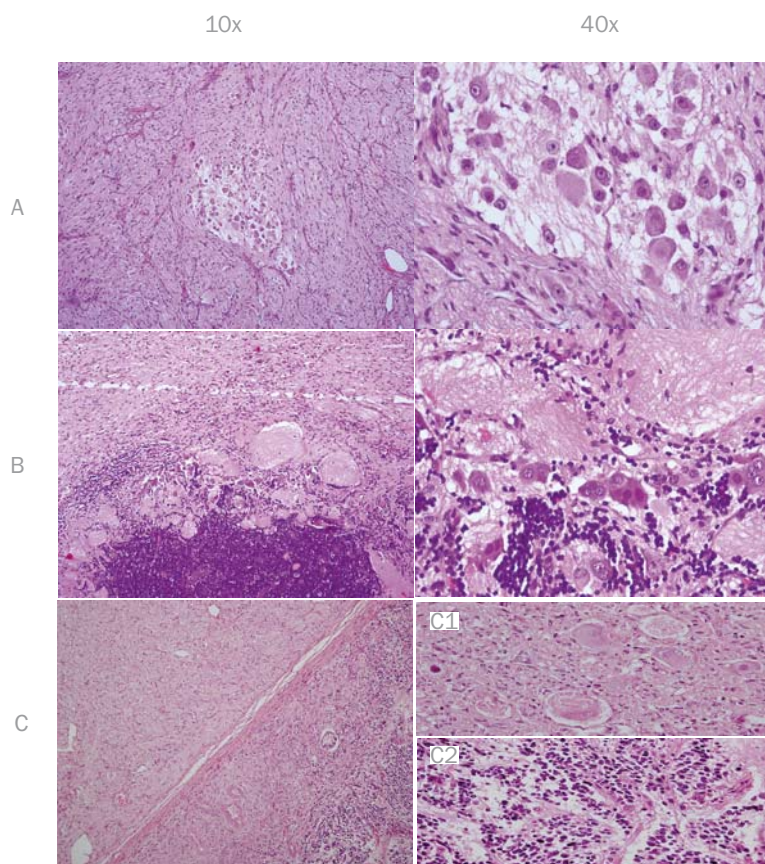


Figura 3: Fotografías de secciones tumorales teñidas con hematoxilina para ilustrar la morfología celular de los GN y GNB. A) GN, B) GNB intermedio y C) GNB nodular; C1: componente GN y C2: componente NB indiferenciado.

Clasificación Histológica Internacional del NB: Clasificación de Shimada

En 1984 el Dr. Shimada describió por primera vez un sistema de clasificación que distinguía entre los TN de evolución favorable y los de evolución desfavorable. Para ello consideraba la edad del paciente al diagnóstico así como tres características histológicas: el contenido de células de Schwann, el grado de diferenciación de las células neuroblásticas y el índice de replicación celular (índice mitótico-cariorréxico, MKI del inglés *Mitosis-Karyorrhexis Index*) (Shimada H et al. 1984).

La edad del paciente al diagnóstico distinguía entre tres franjas de edad: inferior a 18 meses, entre 18 meses y cinco años, y superior a cinco años. La proporción de células de Schwann diferenciaba entre tumores ricos o pobres en contenido estromal. Y el MKI, que se define como el número de células tumorales que se encuentran en mitosis y son cariorréxicas, es decir que presentan el núcleo fragmentado y la cromatina condensada; distinguía tres rangos: 1) MKI bajo, con <2% (<100/5000) células mitóticas y cariorréxicas; 2) MKI intermedio, entre 2-4% (100-200/5000) células mitóticas y cariorréxicas; y 3) MKI elevado, con >4% (>200/5000) células mitóticas y cariorréxicas (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación histológica de Shimada. Modificada de Shimada H et al. 1984.

Tipo	Histología favorable	Histología Desfavorable
Rico en estroma : cualquier edad	diferenciado, intermedio	nodular
Pobre en estroma		
<18 meses	MKI <100/5000	MKI >100/5000
18 meses a 5 años	MKI <100/5000 y en diferenciación	MKI >100/5000 y indiferenciado
>5 años	ninguno	todos

MKI: índice mitótico-cariorréxico

En 1999, se definió la Clasificación Histopatológica Internacional del NB: Clasificación de Shimada (INPC, del inglés *International Neuroblastoma Pathology Classification, the Shimada System*). Esta nueva clasificación fue propuesta por el Comité Internacional de Patología del NB. El sistema de clasificación INPC es una adaptación de la clasificación histológica de Shimada publicada en 1984. Las diferencias entre ambas clasificaciones son: 1) el subtipo definido como “indiferenciado” que se subdivide en “indiferenciado” y “pobrementemente diferenciado”, y 2) la terminología “rico en estroma, bien diferenciado” pasa a ser “ganglioneuroma en maduración” (Shimada H et al. 1999) (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación Histopatológica Internacional del Neuroblastoma, Clasificación de Shimada. Modificada de Shimada H et al. 1999.

Tipos / Subgrupo por edad		Histología / MKI	Grupo de riesgo
Neuroblastoma		pobre en estroma	
	<1,5 años	pobrementemente diferenciado o en diferenciación con MKI bajo o intermedio	Favorable
		Indiferenciado o con MKI alto	Desfavorable
	1,5 - 5 años	en diferenciación y con MKI bajo	Favorable
	indiferenciado o pobrementemente diferenciado o con MKI intermedio o alto	Desfavorable	
	>5 años	todos	Desfavorable
Ganglioneuroma		en maduración o bien diferenciado (estroma dominante)	Favorable
		maduro	Favorable
Ganglioneuroblastoma		intermedio (rico en estroma)	Favorable
		nodular	Desfavorable

MKI: índice mitótico-cariorréxico

Sistema Internacional de Estadificación del NB

El Sistema Internacional de Estadificación del NB (INSS, del inglés *International Neuroblastoma Staging System*), fue propuesto en 1993 por el Dr. Garrett M. Brodeur y sus colaboradores. Se trata de un sistema de clasificación basado en la edad del paciente en el momento del diagnóstico, la extensión de la enfermedad y la accesibilidad quirúrgica para extirpar la masa tumoral (Brodeur GM et al. 1993). Inicialmente, la estadificación se realizaba una vez efectuada la cirugía, pero gracias al avance en las técnicas de imagen, actualmente se puede clasificar el tumor antes de la cirugía.

El INSS define 5 estadios: tres de ellos (estadio 1 a 3) comprenden los tumores localizados anatómicamente y sin diseminación y se distinguen por su accesibilidad quirúrgica; y los dos estadios restantes (estadio 4 y 4S, S del inglés *Special*) se definen por la presencia de enfermedad diseminada (Tabla 3).

Tabla 3: Sistema Internacional de Estadaje del NB. Modificada de Maris JM et al 2007.

Estadio	Descripción
1	Tumor localizado con resección macroscópica completa. Ganglios linfáticos identificables ipsolaterales y contralaterales negativos microscópicamente.
2A	Tumor unilateral con resección incompleta. Ganglios linfáticos identificables ipsolaterales y contralaterales negativos microscópicamente.
2B	Tumor unilateral con resección completa o incompleta. Ganglios linfáticos identificables ipsolaterales positivos y contralaterales negativos microscópicamente.
3	Tumor no extirpable que infiltra a través de la línea media, con o sin afectación de ganglios linfáticos regionales; o tumor unilateral con afectación de ganglios linfáticos contralaterales.
4	Tumor primario que presenta diseminación de la enfermedad a distancia: en ganglios linfáticos, médula ósea, hueso, hígado o otros órganos (excepto los definidos en estadio 4S).
4S	Tumor primario en niños menores de 12 meses (definido como estadio 1, 2A o 2B) con diseminación restringida a piel, hígado y/o médula ósea (<10% infiltración).

Sistema de Clasificación Internacional de los NB en Grupos de Riesgo

En el año 2005 representantes de los grupos cooperativos más grandes: el *Children's Oncology Group (COG)*, el *German Pediatric Oncology and Hematology Group (GPOH)*, el *Japanese Advanced NB Study Group (JANB)*, el *Japanese Infantile Neuroblastoma Co-operative Study Group (JINCS)*, el *European Society of International Paediatric Oncology NB Group (ESIOp NB)* y el Grupo Cooperativo Chino experto en NB, se reunieron con el fin de establecer un sistema de clasificación de riesgo clínico para los NB que fuera homogéneo y permitiera la comparación de ensayos y estudios clínicos desarrollados en diferentes regiones. Finalmente, en 2009, propusieron un nuevo Sistema de Clasificación Internacional del NB en Grupos de Riesgo (INRG, del inglés *International Neuroblastoma Risk Group*) (Cohn S et al. 2009).

El nuevo sistema de clasificación del INRG clasifica los NB utilizando siete parámetros:

- 1) el estadiaje INRG (descrito a continuación)
- 2) la edad del paciente en el momento del diagnóstico (punto de corte 18 meses)
- 3) la categoría histológica del tumor (NB, GNB y GN)
- 4) el grado de diferenciación del tumor (indiferenciado, pobremente diferenciado y en diferenciación)
- 5) el estado del oncogén MYCN (amplificado o no amplificado)
- 6) el estado de la región cromosómica 11q (ausencia o existencia de aberraciones)
- 7) el índice de ADN (hiperploide si ≥ 1 o diploide/hipoploide si <1)

Como resultado de la combinación de estos parámetros, los TN se clasifican en cuatro categorías de riesgo clínico: muy bajo, bajo, intermedio y alto; y a su vez se subdividen en 16 grupos de pretratamiento (Tabla 4).

El estadiaje INRG (Monclair T et al. 2009), designa los tumores loco-regionales con ausencia o existencia de factores de riesgo determinados mediante técnicas de imagen como estadios L1 y L2 respectivamente, los tumores que presentan enfermedad diseminada como estadio M y los tumores con metástasis restringidas a piel, hígado y/o médula ósea o aquellos tumores con diseminación que se presentan en niños con edad inferior a 18 meses como estadio MS.

Tabla 4. Sistema de Estadaje Internacional de NB en Grupos de Riesgo. Modificada de Cohn S et al. 2009.

Estadio INRG	Edad (meses)	Categoría histológica	Grado de diferenciación del tumor	Estado de MYCN	Alteración 11q	Índice de ADN	Grupo de pretratamiento	Grupo de riesgo
L1 / L2		GN en maduración o GNBi					A	Muy bajo
L1		Cualquiera (excepto GN en maduración o GNBi)		NA			B	Muy bajo
				A			K	Alto
L2	<18	Cualquiera (excepto GN en maduración o GNBi)		NA	No		D	Bajo
					Si		G	Intermedio
			En diferenciación	NA	No		E	Bajo
					Si		H	Intermedio
	>=18	GNBn o NB	Pobremente diferenciado o indiferenciado	NA			H	Intermedio
				A			N	Alto
M	<18			NA		Hiperploide	F	Bajo
	<12			NA		Diploide	I	Intermedio
	12 a <18			NA		Diploide	J	Intermedio
	<18			A			O	Alto
	>=18						P	Alto
MS					No		C	Muy bajo
	<18			NA	Si		Q	Alto
				A			R	Alto

Estadio INRG: Estadio según el Sistema de Clasificación Internacional del NB en Grupos de Riesgo
 Categoría histológica: GN: ganglioneuroma; GNBi: ganglioneuroblastoma intermedio; NB: neuroblastoma
 Estado de MYCN: NA: no amplificado, A: amplificado

Sistema de clasificación del riesgo clínico en NB del Grupo de Oncología Pediátrica de los Estados Unidos

En 1995, el Grupo de Oncología Pediátrica de los Estados Unidos (COG, del inglés *Children's Oncology Group*), presentó un sistema de clasificación de riesgo clínico preliminar para los NB. Diez años después, en 2005, establecieron definitivamente un sistema que clasifica los TN en tres grupos de riesgo clínico: alto, intermedio y bajo (Maris JM 2005) (Tabla 5 y Anexo 1).

El COG evalúa como factores pronósticos:

- 1) la edad del paciente en el momento del diagnóstico (punto de corte 12 meses)
- 2) el estadiaje del tumor según el INSS
- 3) la histología tumoral según el INPC
- 4) el índice de ADN (hiperploide si ≥ 1 o diploide/hipoploide si <1)
- 5) el estado de amplificación del oncogén *MYCN* (amplificado o no amplificado)

Sistema de clasificación de riesgo clínico en NB del Ensayo Clínico NB2004, del Grupo de Oncología y Hematología Pediátrica Alemán

El Grupo de Oncología y Hematología Pediátrica Alemán (GPOH, del inglés *German Pediatric Oncology and Hematology Group*), estableció un sistema de clasificación en tres grupos de riesgo clínico: alto, intermedio y bajo, para los pacientes afectados de NB en el marco del protocolo clínico NB2004, con la finalidad de escoger mejor el tratamiento (Oberthuer A et al. 2009) (Tabla 5 y Anexo 2).

Este sistema de estratificación se basa en el análisis de cuatro parámetros:

- 1) el estadiaje de la enfermedad según los criterios del INSS
- 2) la edad del paciente al momento del diagnóstico (punto de corte edad de 12 meses para los estadios 4 y de 24 meses para los estadios 3)
- 3) el estado del oncogén *MYCN* (amplificado o no amplificado)
- 4) el estado de la región cromosómica 1p (normal o delecionada)

Sistema de clasificación del riesgo clínico en NB del Grupo Japonés de Estudios Avanzados en NB

El sistema de clasificación del riesgo clínico en NB del Grupo Japonés de Estudios Avanzados en NB (JANB, del inglés *Japanese Advanced NB Study Group*) utiliza tres parámetros para clasificar los NB en tres grupos de riesgo: alto, intermedio y bajo (Kaneko M et al. 1999) (Tabla 5 y Anexo 3):

- 1) el estadio del tumor según el sistema de estadiaje japonés (descrito a continuación)
- 2) la edad del paciente al diagnóstico (punto de corte 12 meses)
- 3) el estado del oncogén *MYCN* (amplificado o no amplificado)

El sistema de estadiaje japonés se basa en el INSS, pero subdivide el estadio 4 en dos: estadio 4A (aquellos estadios 4 que presentan metástasis a orbitas, hueso, nódulos linfáticos y/o órganos distantes) y estadio 4B (aquellos estadios 4 que presentan metástasis a médula ósea, piel o hígado) (Nagahara N et al. 1990; Nakagawara A et al. 1991).

Sistema de clasificación del riesgo clínico en NB del Grupo de Estudio de NB de la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica Europea

En el año 1994 se fundó el Grupo de Estudio de NB Europeo dentro de la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica Europea (ESIOP NB, del inglés *European Society of International Paediatric Oncology NB Group*), pero no fue hasta el año 2005 que propusieron un sistema de clasificación de riesgo clínico para los NB basado en tres variables:

- 1) la edad del paciente al diagnóstico (punto de corte 12 meses)
- 2) el estadio del tumor según los criterios de ESIOP (descritos a continuación)
- 3) el estado del oncogén *MYCN* (amplificado o no amplificado)

Estas tres variables permiten agrupar los NB en tres grupos de riesgo: alto, intermedio y bajo (Bernardi B y Cohn S 2005) (Tabla 5 y Anexo 4).

El sistema de estadiaje propio de la ESIOP combina el estadiaje del INSS, la accesibilidad quirúrgica y la presencia de enfermedad diseminada a hueso. Clasificando así los estadios 2 y 3 del INSS en función de si son o no abordables quirúrgicamente, y el estadio 4 inferior a 12 meses según si se detecta o no por imagen (gammagrafía, radiografía o TAC) metástasis ósea (Cecchetto G et al. 2005).

Tabla 5. Comparación de los sistemas de clasificación propuestos por los diferentes grupos internacionales de estudio del NB.

Sistema de estadijaje					
Riesgo clínico	COG	GPOH	JAMB	ESIOp	
Bajo	Estadio INSS 1 Estadio INSS 2, <1 año o >1 año pero con histología favorable Estadio INSS 4S y hiperploide	Estadio INSS 1, 2 o 4S, MYCN NA Estadio INSS 3, MYCN NA y <2 años	Estadio INSS 1, 2 o 4S, MYCN NA Estadio INSS 3, MYCN NA y <1 año	Estadio INSS 1, 2 o 3 (extirpable) o 4S, MYCN NA Estadio INSS 4, <1 año y sin metástasis ósea	
Intermedio	Estadio INSS 3, MYCN NA y <1 año o >1 año con histología favorable Estadio INSS 4 y MYCN NA Estadio INSS 4S, MYCN NA con histología desfavorable o diploide	Estadio INSS INSS 2, MYCN NA y con alteración 1p Estadio INSS 3, MYCN NA y >2 años Estadio INSS 4, MYCN NA y <1 año	Estadio INSS 3, MYCN NA y >1 año Estadio INSS 4, MYCN NA y <1 año	Estadio INSS 2 o 3 (no extirpable), MYCN NA Estadio INSS 4, <1 año con metástasis ósea	
Alto	Cualquier Estadio INSS MYCN A Estadio INSS 3, >1 año, y con histología desfavorable Estadio INSS 4, y >1 año	Cualquier Estadio INSS MYCN A Estadio INSS 4, y >1 año	Estadio INSS 4, MYCN NA y >1 año Cualquier estadio INSS MYCN A	Cualquier estadio INSS MYCN A	

Estadio INSS: Estadio según el Sistema Internacional de Estadificación del NB

MYCN NA: no amplificado, MYCN A: amplificado

2. Clasificación molecular de los neuroblastomas

Los NB representan un espectro de tumores con una evolución clínica muy variable, mostrando en ocasiones una proliferación agresiva, metastásica, resistente al tratamiento y con índices de supervivencia por debajo del 50%, y en otras, un crecimiento loco-regional con pronóstico excelente. La variedad de comportamiento clínico del NB determina un enfoque terapéutico que puede variar entre un abordaje terapéutico intensivo multimodal que incluye cirugía, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia, o una actitud expectante. Por lo que la clasificación precisa de los diferentes subtipos de NB es importante en el momento de determinar la terapia más apropiada (ver detalles en apartado 1.4 y 1.7). Actualmente, existen diferentes sistemas de clasificación de riesgo clínico en NB basados en la combinación de distintos parámetros de pronóstico clínicos, morfológicos y biológicos (ver apartado 1.7). No obstante, todavía existen casos donde estos sistemas de clasificación han mostrado una utilidad clínica limitada. Siendo la clasificación precisa de los NB todavía un reto.

Las diferencias en la evolución clínica y el pronóstico de los NB son consecuencia de sus características y alteraciones genético-moleculares. Éstas tienen impacto sobre los perfiles de expresión génica (De Preter K *et al.* 2010). En los últimos años, los análisis de expresión de alto rendimiento mediante *microarrays* de ADN 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 (Quackenbush J 2006; Tinker AV *et al.* 2006; Michiels S *et al.* 2007). Por ello, los *microarrays* de ADN constituyen una herramienta útil para la identificación de perfiles de expresión diferencial que permitan distinguir subgrupos biológicos de tumores con evolución clínica distinta. Estos perfiles son susceptibles de poder representar un marcador molecular de pronóstico (Gerard WL 2005).

2.1 Análisis de expresión génica mediante *microarrays* de ADN

Tecnología de *microarrays* de ADN

La tecnología de *microarrays* de ADN permite analizar de forma simultánea miles de genes para cada muestra, en decenas de muestras (López M *et al.* 2002; Guo QM 2003).

Un *microarray* de ADN consiste en un soporte sólido (de vidrio o silicón) sobre el cual se inmovilizan millones de moléculas de ADN, denominadas sondas, formando así una matriz ordenada de secuencias en dos dimensiones (López M *et al.* 2002; Dufva M 2009). Para el estudio del genoma y el transcriptoma, las sondas pueden ser: 1) productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*), 2) oligonucleótidos, o 3) cromosomas artificiales de plásmidos o bacterias (López M *et al.* 2002; Dufva M 2009). Los ácidos nucleicos de las muestras a analizar se marcan por diversos métodos (enzimáticos, fluorescentes, radioactivos, etc.) y se incuban/depositan sobre el panel de sondas. Durante este proceso llamado hibridación, las muestras marcadas se unirán por homología de secuencia a las sondas con secuencia complementaria inmovilizadas en el soporte. La unión de ambas secuencias generará una señal que será captada por sistemas de detección, como por ejemplo un escáner, permitiendo la identificación y cuantificación del ADN presente en la muestra (Figura 4). La detección, el análisis y la interpretación de la señal se realiza gracias a diversos algoritmos y programas informáticos (López M *et al.* 2002; Dufva M 2009). Estos permitirán extraer los datos numéricos de la intensidad de señal, descartar señales de baja calidad y eliminar los datos erróneos derivados de la variabilidad técnica; así como normalizar los valores de intensidad y cuantificarlos. Finalmente, los datos obtenidos con significancia estadística y biológica, deben ser validados por una técnica independiente (Allison DB *et al.* 2006).

Microarrays de ADN para el análisis de la expresión génica

Para los estudios de expresión génica mediante la tecnología de *microarrays* de ADN se utiliza ADN de cadena complementaria (ADNc). El ADNc que se utiliza como sonda es el producto del ARN mensajero (ARNm) de genes conocidos, mientras que la muestra es ADNc producto de los genes expresados en dicha muestra (Ballman KV 2008; Dufva M 2009). Se detectará señal cuando el ADNc del gen este representado en la muestra, indicando que el gen esta expresado en ella. Los niveles de expresión génica se calculan a partir de las intensidades de señal producidas una vez hibridadas sondas y muestras (Ballman KV 2008).

Los *microarrays* de ADNc permiten evaluar los niveles de expresión génica a gran escala, es decir que incluyen como sondas todos (o la mayoría) de los genes conocidos, o evaluar la expresión génica a menor escala y de forma dirigida, incluyendo como sondas solo un conjunto de genes concreto (genes asociados a una vía de señalización, a una enfermedad...etc).

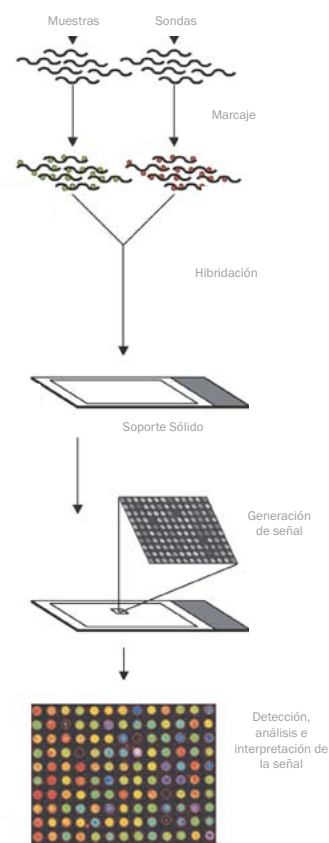


Figura 4. Esquema de la tecnología de *microarray* de ADN. Modificado de Staal FJ *et al.* 2003.

En ambos casos pueden utilizarse *microarrays* comerciales prediseñados o bien *microarrays* diseñados y adaptados a las necesidades del proyecto (López M et al. 2002; Ballman KV 2008).

En las últimas décadas, los *microarrays* para el estudio de la expresión génica más utilizados han sido los *microarrays* comerciales fabricados por *Affymetrix*. A finales de 1980, *Affymetrix* desarrollo una tecnología propia denominada *GeneChip®* para la producción a gran escala de *microarrays* basada en el uso de la fotolitografía para la síntesis *in situ* de sondas de 20 a 25 nucleótidos, en 1994 empezó a comercializarlos. Una de las primeras plataformas que comercializo *Affymetrix* para el análisis de la expresión génica global fue *Affymetrix GeneChip® Human Genome U95*. Esta permitía analizar la expresión de más de 60000 genes humanos (*Affymetrix Data Sheet, GeneChip® Human Genome U95Set, 2003*) con una elevada sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. Posteriormente, otras empresas como *Agilent, Clontech* o *Illumina* entre otras, han comercializado plataformas de *microarrays* para el estudio de los niveles de expresión génica, de elevada calidad y resolución (López M et al. 2002).

2.2 Identificación de perfiles de expresión génica para la predicción de pronóstico y las aplicaciones en la práctica clínica

El uso de la tecnología de *microarrays* para estudiar los niveles de expresión génica en cáncer, ha permitido identificar perfiles de expresión génica distintivos entre subgrupos biológicos o subgrupos de tumores con distinto pronóstico y evolución clínica. Estos perfiles de expresión génica son susceptibles de poder utilizarse como marcadores de pronóstico (Simon R et al. 2003; Tiwari M 2011).

En NB distintos grupos han realizado estudios de expresión génica mediante *microarrays* con el propósito de identificar perfiles transcripcionales útiles para predecir el pronóstico clínico de los pacientes. No obstante los perfiles publicados hayan demostrado una elevada capacidad para discriminar entre subgrupos de pacientes con pronósticos distintos, su implementación en la práctica clínica se ve limitada por el elevado número de genes a analizar (305 genes, Ohira M et al. 2003; 123 genes, Hiyama E et al. 2004; 496 genes, Takita J et al. 2004; 200 genes, Ohira M et al. 2005; 39 genes, Schramm A et al. 2005; 144 genes, Oberthuer A et al. 2006 y 2010; 59 genes, Vermeulen J et al. 2009; 42 genes, De Preter K et al. 2010). Para traducir estos perfiles de expresión génica en pruebas aplicables y evaluables en la práctica clínica de forma rutinaria debe reducirse el número de genes y generarse patrones de expresión génica que puedan evaluarse mediante técnicas convencionales y reproducibles (Chen HY et al. 2007; Korkola JE et al. 2007).

3. Mecanismos de modulación de la expresión génica: mecanismos epigenéticos

La epigenética abarca una serie de alteraciones somáticas heredables que afectan la expresión génica pero que no están causadas directamente por la alteración de la secuencia nucleotídica del ADN (Esteller M 2008). Las modificaciones covalentes de las histonas, la metilación de los residuos de citosina (C) en los dinucleótidos citosina-guanina (CG) (ver apartado 4) y la remodelación de la cromatina (ver apartado 5) representan los principales mecanismos epigenéticos que regulan y mantienen los patrones de expresión génica del genoma (Berger SL et al. 2009; Espada J y Esteller M 2010; Rodríguez-Paredes M y Esteller M 2011).

La condensación del ADN genómico para formar la cromatina es fundamental para mantener una regulación estable de la expresión génica. El nucleosoma es la estructura que constituye la unidad básica de la cromatina. Los nucleosomas están formados por un núcleo proteico constituido por un octámero de histonas (dos unidades de H2A, H2B, H3 y H4), envueltos por 147 pares de bases (pb) de ADN (Strahl BD y Allis D 2000; Ryan DP y Owen-Hughes T 2011). Una quinta histona denominada H1, se encuentra localizada fuera del nucleosoma en contacto con el ADN. H1 es crucial para el empaquetamiento del ADN nucleosómico (Lusser A y Kadonaga T 2003). Los nucleosomas están empaquetados entre sí formando una fibra de cromatina que puede ser más o menos compacta (Figura 5).

El posicionamiento de los nucleosomas cambia continuamente en relación a las necesidades de la célula, generando dominios de cromatina con distinta arquitectura, actividad transcripcional y replicación del ADN, denominados eucromatina (cromatina transcripcionalmente activa) y heterocromatina (cromatina transcripcionalmente inactiva) (Figura 6) (Delacuve GP et al. 2009).

Las histonas no son proteínas destinadas únicamente a la función de compactación del ADN, son estructuras moleculares que participan en la regulación de la expresión génica. Las colas N-terminales de las histonas están sometidas a modificaciones post-transcripcionales como son la acetilación, fosforilación y metilación, entre otras. La acetilación y la fosforilación de las histonas están relacionadas con un aumento de la transcripción génica debido a una pérdida de la afinidad de las histonas para el ADN. Por otra parte la metilación de las histonas puede activar o reprimir la transcripción génica dependiendo de qué residuo y de qué histona sea metilada (Khorasanizadeh S 2004; Kouzarides T 2007). Combinaciones de las distintas modificaciones específicas generan el código epigenético de las histonas que afecta la transcripción génica y la reparación del ADN (Strahl BD y Allis CD 2000; de la Cruz X et al. 2005; Esteller M 2008; Cavagnari BM 2012).

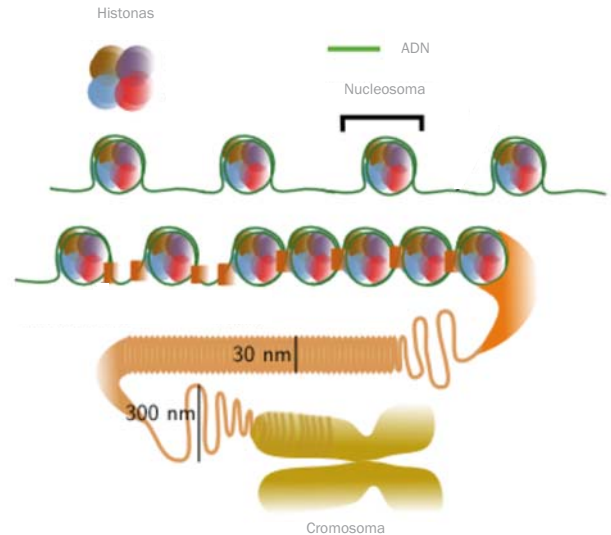


Figura 5: Esquema del empaquetamiento del ADN. Modificada del Atlas de histología vegetal y animal, on-line de la Universidad de Vigo (<http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html>).

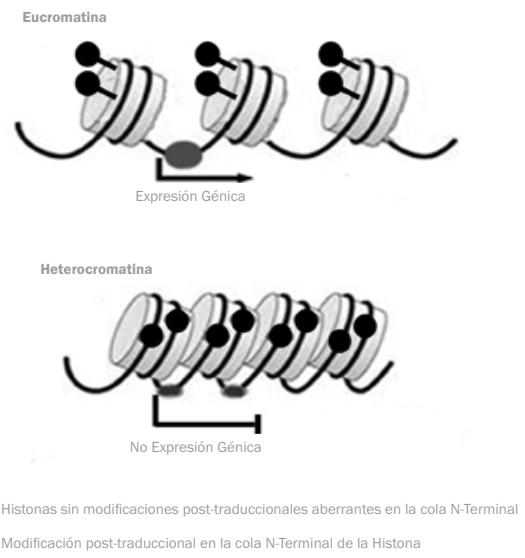


Figura 6: Esquema de la modificación de las histonas y la alteración de la estructura de la cromatina. Modificada de Maswelli RW y Marfil CF 2011.

4. Metilación del ADN

Las modificaciones de las histonas ocurren conjuntamente con otra modificación epigenética: la metilación del ADN, uno de los principales mecanismos de supresión de la expresión génica (Jones PA y Baylin SB 2002).

La metilación del ADN se refiere a la inserción de un grupo metilo (CH₃) en la posición 5' del anillo de pirimidina de la citosina generando la 5-metilcitosina (m5C). La reacción de metilación es mediada por una familia de enzimas llamadas ADN metil-transferasas (DNMT, del inglés *Mammalian DNA methyltransferase*) quienes catalizan la transferencia de grupos metilo a la citosina a partir del sustrato S-adenosil-metionina (SAM) (Figura 7) (Turek-Plewa J y Jahodzinski PP 2005; Kristensen LS *et al.* 2009; Espada J y Esteller M 2010). La familia de enzimas DNMT, incluye la DNMT1, que actúa sobre las cadenas de ADN parcialmente metiladas siendo la responsable de copiar y mantener el patrón de metilación durante la replicación del ADN; la DNMT2, la función de la cual es todavía desconocida aunque presenta capacidad para unirse a secuencias de ADN independientemente del estado de metilación de las mismas; y la DNMT3, que puede actuar sobre cadenas de ADN semi-metiladas o no metiladas y cuya función es establecer “*de novo*” el patrón de metilación del ADN en células embrionarias y células no diferenciadas (Espada J y Esteller M 2008; Mulero-Navarro S y Esteller M 2008).

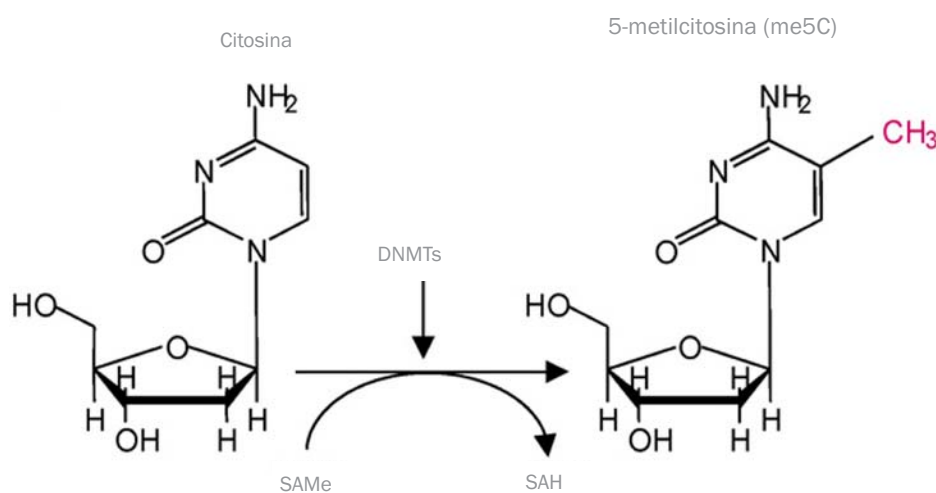


Figura 7: Reacción de metilación. DNMTs: enzimas ADN metil-transferasas, SAMe: S-adenosil-metionina y SAH: 5-adenosil homocisteína. Modificada de Espada J y Esteller M 2010.

La metilación del ADN tiene lugar en la citosina (C) de los dinucleótidos CG. La mayoría de dinucleótidos CGs no se distribuyen al azar sino que se agrupan en regiones de 0,5 a 5Kb denominadas islas CpG (iCpG) caracterizadas por tener un contenido mínimo de G:C del 55% (Jones PA y Baylin SB 2002; Kristensen LS *et al.* 2009). La localización de estas iCpG es altamente conservada a lo largo del genoma y generalmente se encuentran concentradas en regiones promotoras próximas a puntos de inicio de la transcripción (TSS, del inglés *Transcription Start Site*). Recientemente, se ha descrito la presencia de iCpG en regiones intragénicas o intergénicas en relación con la regulación de promotores alternativos de la transcripción génica (Maunakea A *et al.* 2010; Deaton AM y Bird A 2012). Entre el 40-70% de los genes conocidos contienen iCpG que en condiciones normales no se encuentran metiladas (Jones PA y Baylin SB 2002; MacCabe MT *et al.* 2009; Kristensen LS *et al.* 2009).

La transcripción génica es modulada por la metilación del ADN mediante dos mecanismos, uno directo y otro indirecto. La modulación directa se produce por una interferencia física que no permite la unión de los factores de transcripción al TSS, mientras que la modulación indirecta se produce cuando las proteínas específicas de unión a los dinucleótidos CG metilados bloquean la interacción de los factores de transcripción con el ADN (Turek-Plewa J y Jagodzinski PP 2005; MacCabe MT *et al.* 2009).

La metilación del ADN juega un papel importante en el desarrollo embrionario, en la diferenciación de los tejidos, en la inactivación del cromosoma X y en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica (Richardson B y Yung R 1999; Esteller M 2008; Kristensen LS *et al.* 2009).

4.1 Alteración del patrón de metilación del ADN en cáncer

El cáncer está causado por alteraciones genéticas y epigenéticas, ya que es la combinación de ambas que determina el desarrollo y la progresión tumoral (Esteller M 2007; Baylin SB y Jones PA 2011). La primera modificación epigenética descrita en cáncer fue la alteración del patrón de metilación del ADN, que contribuye a desestabilizar la estructura del material genético y regula la expresión génica. En la actualidad se ha demostrado que la alteración del patrón de metilación del ADN no tiene lugar de forma aislada, sino que el resto de mecanismos epigenéticos también se alteran en el contexto neoplásico (Dunn BK 2003; Feinberg PA y Tycko B 2004).

La alteración de la metilación del ADN en células neoplásicas se define por un estado de hipermetilación (hiperM) o ganancia de metilación puntual y específica en regiones promotoras de los genes, y por una hipometilación (hipoM) global, en referencia a la pérdida global de metilación a lo largo del genoma (Figura 8) (Dunn BK 2003; Feinberg AP y Tycko B 2004; Esteller M 2007; Mulero-Navarro S y Esteller M 2008; Baylin SB y Jones PA 2011).

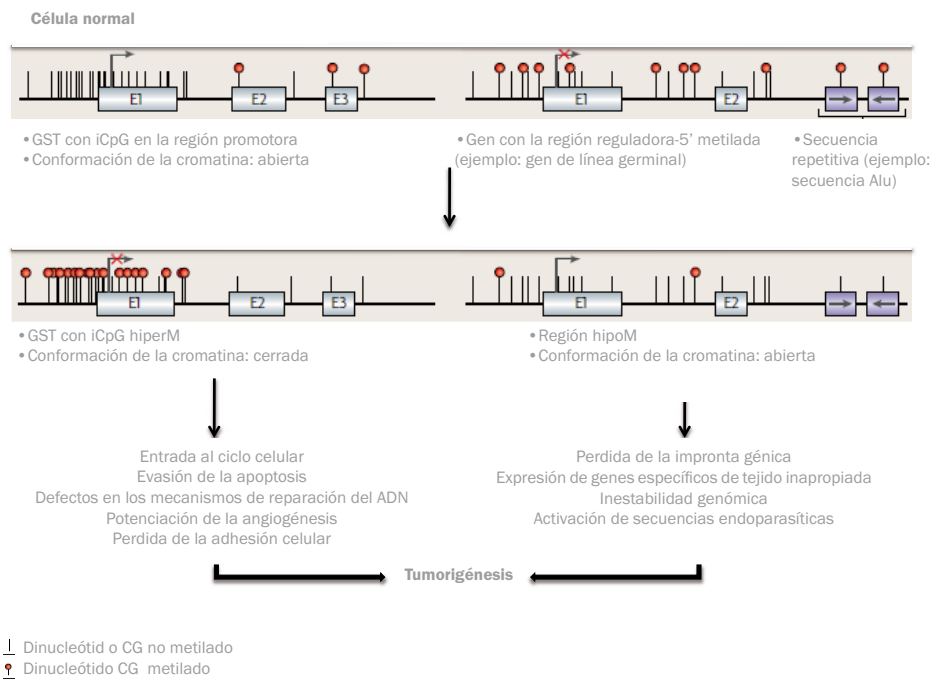


Figura 8: Patrón de metilación del ADN en células cancerígenas. Modificada de Esteller M 2007.

El patrón de metilación del ADN más estudiado en cáncer se da en las regiones promotoras de los genes, regiones responsables de la regulación de la transcripción. Recientemente se han publicado cambios en el estado de metilación de dinucleótidos CG localizados en regiones intra- o intergénicas (Doi A *et al.* 2009; Irizarry RA *et al.* 2009; Hansen KD *et al.* 2011; Deaton AM y Bird A 2012). A pesar de estos nuevos datos, aún se desconocen las consecuencias funcionales y la implicación de estos fenómenos en el desarrollo neoplásico.

Hasta el momento, en NB se ha descrito la metilación de regiones promotoras de numerosos genes (Alaminos M *et al.* 2004; Michalowski MB *et al.* 2008; Kamimatsuse A *et al.* 2009; Carén H *et al.* 2011; Grau E *et al.* 2011; Buckley PG *et al.* 2011), pero no se ha caracterizado el patrón global de metilación del ADN de estos tumores.

Hipermetilación

La hiperM de dinucleótidos CG localizados en iCpG de regiones promotoras de los genes, su asociación con la represión transcripcional y la pérdida de función de los genes afectados, es la alteración epigenética más estudiada en cáncer ya que se trata de uno de los eventos iniciadores en algunas neoplasias (Esteller M 2008; Baylin SB y Jones PA 2011). La primera evidencia se publicó en 1989 por el Dr. Thaddeus P. Dryja y el Dr. Bernhard Hosthemke, quienes junto con sus colaboradores describieron la hiperM del gen del retinoblastoma.

Entre el 5-10% de las regiones promotoras de genes que no están metiladas en células normales ganan metilación en las células neoplásicas, confirmando que este mecanismo epigenético es el responsable del silenciamiento génico en cáncer (Feinberg AP y Tycko B 2004; Esteller M 2008; Baylin SB y Jones PA 2011). Los genes afectados por la hiperM en su región promotora en cáncer son, por lo general, GST o genes relacionados con el ciclo celular, la reparación del ADN, el metabolismo de los carcinógenos, la interacción célula-célula, la apoptosis o la angiogénesis (Esteller M 2008; Mulero-Navarro S y Esteller M 2008). Se desconoce el mecanismo selectivo de la ganancia específica de metilación que confiere potencial neoplásico a las células tumorales.

Hipometilación

En 1983, el Dr. Andrew P. Feinberg y el Dr. Bert Vogelstein publicaron por primera vez una anomalía epigenética en tumores: la pérdida global de la metilación del ADN en dinucleótidos CG (Feinberg AP y Vogelstein B 1983). Se ha demostrado que a medida que la lesión maligna progresa también lo hace el grado de hipoM, sugiriendo que esta alteración contribuye a aumentar la capacidad proliferativa e invasiva de la lesión (Esteller M 2008; Pogribny IP y Beland FA 2009).

La hipoM global contribuye al desarrollo neoplásico mediante: 1) la generación de inestabilidad cromosómica, 2) la reactivación de regiones intragenómicas repetitivas de ADN, 3) la pérdida de la impronta génica y 4) la reactivación de proto-oncogenes. La generación de inestabilidad cromosómica puede derivar en diferentes recombinaciones mitóticas que generan deleciones y translocaciones, provocando a su vez reordenamientos entre cromosomas. Así mismo, la pérdida de metilación en regiones intragenómicas repetitivas del ADN, como las secuencias LINE (del inglés *Long Interspersed Nuclear Elements*) o las secuencias Alu, induce a la transcripción de estos elementos o a su translocación en otras regiones cromosómicas incrementando así la alteración estructural del genoma. Por otro lado, la pérdida de metilación de genes marcados por la impronta génica, por ejemplo el gen *Insulin-like growth factor 2 (IGF2)* en cáncer colorectal; o de proto-oncogenes, como *B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl2)* en linfomas no-Hodgkins o *v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog (HRAS)* en cáncer de colon y de pulmón, implica un aumento de su expresión contribuyendo a desregular la actividad normal de la célula (Dunn BK 2003; Esteller M 2008).

El mecanismo por el cual se produce la hipoM es todavía poco conocido, algunas evidencias sugieren que se debe a la alteración de la actividad de la enzima DNMT1 o de proteínas de la familia de las SNF2, así como de la acción descontrolada de las enzimas ADN-demetilinas (Feinberg AP y Tycko B 2004; Pogribny IP y Beland FA 2009; Rodríguez-Paredes M y Esteller M 2011).

La identificación de los mecanismos por los cuales la hipoM global afecta al desarrollo neoplásico, conjuntamente con las dificultades técnicas para su estudio han conducido a que la mayoría de estudios de las alteraciones del patrón de metilación del ADN se hayan centrado en estudiar la ganancia de metilación de las regiones promotoras de los genes y no tanto el efecto de la pérdida específica de metilación.

4.2 Técnicas para el análisis del patrón de metilación del ADN

La metilación del ADN puede estudiarse desde dos aproximaciones, cuantificando los niveles globales de metilación del ADN o estudiando los patrones específicos de metilación del ADN de un genoma (Esteller M 2007).

La cuantificación de los niveles de metilación del ADN de un genoma permite identificar y cuantificar la presencia o ausencia de metilación pero no determinar su distribución. Para ello las técnicas más usadas son la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) y la electroforesis capilar de alta resolución (HPCE, del inglés *High Performance Capillary Electrophoresis*), ambas se basan en la diferencia de movilidad de las citosinas y las 5-metilcitosinas. Mientras que el estudio del patrón de metilación pretende identificar la localización y distribución de la metilación a lo largo del genoma así como cuantificarla en algunos casos. Para ello pueden aplicarse tres metodologías: 1) la digestión del ADN con enzimas de restricción, 2) el enriquecimiento de las secuencias de ADN metiladas por afinidad y 3) la conversión del ADN metilado con bisulfito de sodio (Esteller M 2007; Zilberman D y Henikoff S 2007; Laird PW 2010).

La digestión enzimática utiliza enzimas de restricción sensibles a la 5-metilcitosina. Su acción queda inhibida cuando existe una 5-metilcitosina en la secuencia, permitiendo identificar donde se sitúan estas modificaciones gracias a los patrones de corte (Figura 9A). Sin embargo, es una técnica que genera falsos positivos ya que por motivos ajenos a la metilación del ADN la digestión puede ser incompleta. Por otro lado, el enriquecimiento de secuencias de ADN metiladas por afinidad emplea anticuerpos específicos para detectar 5-metilcitosinas o proteínas específicas de unión a los dinucleótidos CG metilados en secuencias de ADN desnaturalizadas (Figura 9B). Ésta metodología permite una detección rápida de fragmentos metilados pero no permite obtener información sobre los niveles individuales de metilación. En cambio, al tratar moléculas de ADN desnaturalizado con bisulfito de sodio, se produce una reacción química que deamina las citosinas no metiladas, y estas se traducen en timinas en lugar de guaninas. Así, una modificación epigenética deriva en una modificación genética fácilmente detectable (Figura 9C) (Zilberman D y Henikoff S 2007; Laird PW 2010).

La combinación de estas tres metodologías con otras técnicas analíticas basadas en la PCR, la hibridación y/o la secuenciación ha dado lugar a numerosas aproximaciones para el estudio de patrones de metilación del ADN.

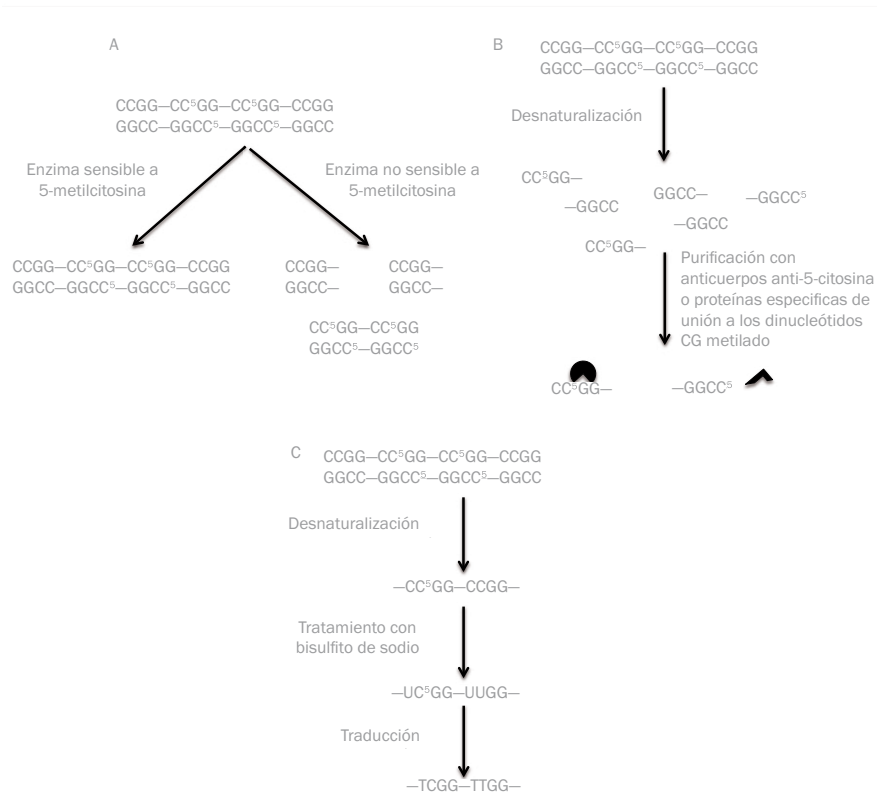


Figura 9. Esquema de la metodología para el estudio del patrón de metilación del ADN: A) Digestión del ADN con enzimas de restricción, B) Enriquecimiento de las secuencias de ADN metiladas por afinidad, C) Conversión del ADN metilado con bisulfito de sodio. Modificado de Zilberman D y Henikoff S 2007.

A continuación se describen dos de las aproximaciones metodológicas basadas en el tratamiento del ADN con bisulfito de sodio; la aplicación de la tecnología de *microarrays* de ADN para un estudio global del patrón de metilación y la aplicación combinada de la PCR y la secuenciación, para el estudio de secuencias cortas y específicas con dinucleótidos CG.

Microarrays de ADN para el estudio global del patrón de metilación del ADN

La detección de 5-metilcitosinas mediante la tecnología de *microarrays* de ADN permite un análisis global del genoma sensitivo y cuantitativo. Esta técnica se basa en los principios de hibridación de los *microarrays* de ADN descritos en el apartado 2.1.

En estos *microarrays* de ADN, las sondas representan secuencias con dinucleótidos CG. Una misma secuencia está representada por dos sondas: una complementaria a la secuencia metilada y otra complementaria a la secuencia no metilada, cada una de ellas está marcada con un fluorocromo distinto. Esto permite determinar el nivel de metilación del ADN para cada muestra, previamente tratadas con bisulfito de sodio, según el ratio de señales obtenidas entre las dos sondas. Ya que si la muestra de estudio esta metilada hibridara con más afinidad con la sonda complementaria a la secuencia metilada (Zilberman D y Henikoff S 2007; Laird WB 2010; Samarakoon PS 2010).

Actualmente la mayoría de análisis de metilación global del ADN se realizan mediante *microarrays* comerciales, puesto que permite estudiar cientos de regiones de dinucleótidos CG preseleccionados, en numerosas muestras de forma simultánea, con elevada sensibilidad y reproducibilidad (Bibikova M et al. 2006; Zilberman D y Henikoff S 2007; Laird PW 2010; Samarakoon PS 2010; Deduwaerder S et al. 2011). Uno de los *microarrays* más utilizados para los estudios globales del patrón de metilación del ADN es el *Infinium HumanMethylation 27BeadChip*, comercializado por la empresa *Illumina*. El *microarray Infinium HumanMethylation 27BeadChip* permite analizar 27578 dinucleótidos CG localizados mayoritariamente en regiones próximas a regiones promotoras (1000pb por arriba o 500pb por debajo de los TSS) de 14475 genes conocidos, entre ellos genes descritos en cáncer así como genes marcados por la impronta génica (Bibikova M et al. 2009). La capacidad de cuantificar con precisión los niveles de metilación, su elevada reproducibilidad, conjuntamente con la ventaja que permite analizar cualquier región que contenga dinucleótidos CG (sin necesidad que sean regiones enriquecidas o sensibles a la restricción) a conllevado a un extenso uso de esta plataforma (Illumina Application Note 2008; Bibikova M et al. 2009).

Pirosecuenciación

La pirosecuenciación se basa en la secuenciación en tiempo real de la síntesis del ADN. La aplicación de la pirosecuenciación para el estudio de la metilación del ADN permite estudiar regiones de dinucleótidos CG específicos de forma cuantitativa. La pirosecuenciación utiliza cuatro enzimas, ADN polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa;

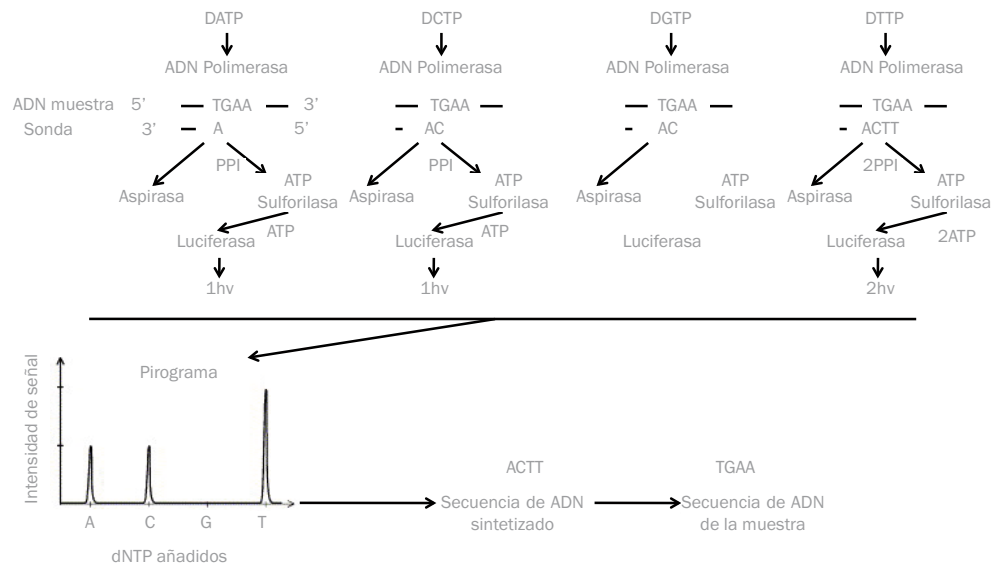


Figura 10. Esquema de la técnica de pirosecuenciación. ATP: adenosina trifosfato, PPI: pirofosfato, hv: señal lumínica, dNTP:deoxi-ribonucleótido fosfato. Modificado de Ahmadian A *et al.* 2006.

para generar una cascada bioluminiscente que puede ser detectada y cuantificada durante el proceso de secuenciación (Colella S *et al.* 2003; Ahmadian A *et al.* 2006; Tost J y Gut IG 2007).

Las muestras, tratadas con bisulfito de sodio, son amplificadas mediante PCR utilizando sondas específicas para la región que contiene los dinucleótidos CG de interés. Seguidamente se procede a la secuenciación de los productos de la PCR. La secuenciación se realiza en presencia de adenosina-5'-fosfosulfato (APS), luciferina, y las enzimas ADN polimerasa, adenosina trifosfato sulfurilasa (ATP, del inglés *Adenosine TriPhosphate*), luciferasa y apirasa. A medida que se añade un deoxi-nucleótido fosfato (dNTP, del inglés *Deoxyribonucleotide triphosphate*) si este es complementario al del producto de PCR la enzima ADN polimerasa cataliza su incorporación a la cadena de ADN de nueva creación y libera pirofosfato en una cantidad equimolar a la cantidad de nucleótidos incorporados. La APS presente actúa como sustrato permitiendo que la enzima ATP sulfurilasa convierta cuantitativamente el pirofosfato en ATP. El ATP generado activa la conversión de la luciferina a oxiluciferina mediante la enzima luciferasa. Esta cascada de reacciones genera una señal de luz proporcional a la cantidad de ATP producido que puede detectarse y cuantificarse. La aspirasa presente en la reacción degrada de forma continua las moléculas de ATP y los dNTPs no incorporados; permitiendo reanudar la reacción cada vez que se añade un dNTP nuevo (Figura 10). Finalmente se obtiene la secuencia completa analizada y se cuantifica el número de nucleótidos añadidos en cada posición, obteniendo un valor final de la metilación de la región estudiada (Colella S *et al.* 2003; Ahmadian A *et al.* 2006; Tost J y Gut IG 2007).

La pirosecuenciación permite una cuantificación precisa de varios dinucleótidos CG en una misma región, pero solo pueden secuenciarse regiones de 25-30pb en cada reacción limitando el número de dinucleótidos CG a evaluar (Ahmadian A *et al.* 2006).

5. Proteínas remodeladoras de la cromatina

La remodelación de la cromatina mediante proteínas, como se ha descrito anteriormente (ver apartado 3), es uno de los mecanismos epigenéticos que contribuye a regular los patrones de expresión génica. Las proteínas que ejecutan esta acción se denominan proteínas remodeladoras de la cromatina dependientes de ATP, puesto que actúan gracias a la energía derivada de la hidrólisis del ATP (Tsukiyama T 2002; De la Cruz X *et al.* 2005; Ryan DP y Owen-Hughes T 2011). Estas proteínas se caracterizan por contener una unidad ATPasa en su estructura y remodelan la cromatina disociando y generando espacios entre nucleosomas, cambiando o reponiendo octámeros de histonas así como eliminando total o parcialmente alguna de las histonas que conforman el nucleosoma (Flaus A y Owen-Hughes T 2011).

5.1 Proteínas de la superfamilia SNF2

La superfamilia de proteínas SNF2, agrupa un conjunto de proteínas caracterizadas por su actividad ATPasa que forman los complejos proteicos capaces de remodelar la cromatina (Flaus A y Owen-Hughes T 2011; Ryan DP y Owen-Hughes T 2011). Las cuatro subfamilias que se engloban dentro de la superfamilia SNF2 se estructuran según los dominios adicionales que presentan fuera del dominio ATPasa (Lusser A y Kadonaga T 2003). Las familias que conforman la superfamilia SNF2 son: 1) la familia SWI/SNF (del inglés *mating tipe SWItching/Sucrose Non Fermenting*), 2) la familia ISWI (del inglés *Imitation SWItch*), 3) la familia INO80 (del inglés Inositol Auxotroph mutant 80) y 4) la familia CHD (del inglés *Chromodomain Helicase DNA binding*) (Marfella CG y Imbalzano AN 2007; Hopfner KP *et al.* 2012).

Familia SWI/SNF

La característica que define esta familia es la presencia de un bromodominio en su estructura (Figura 11). Este dominio reconoce los residuos de lisina acetilados localizados en las colas N-terminales de las histonas (De la Cruz X *et al.* 2005; Marfella CG y Imbalzano AN 2007). Se trata de proteínas que forman complejos grandes de numerosas subunidades (hasta 12) (Lusser A y Kadonaga T 2003; Khorasanizadeh S 2004). Su función principal es la de disociar los nucleosomas (Khorasanizadeh S 2004; Hopfner KP *et al.* 2012).

Familia ISWI

Esta familia proteica comprende complejos pequeños, formados por un máximo de 4 subunidades (Lusser A y Kadonaga T 2003), la característica principal es que poseen un dominio SANT (del inglés *Switching-defective protein 3, Adaptor 2, Nuclear receptor co-repressor, Transcription factor III B*) (Figura 11) (Marfella CG y Imbalzano AN 2007). Este dominio cataliza la unión de estas proteínas con las colas N-terminales de las histonas y no permite la unión directa al ADN (De la Cruz X *et al.* 2005). La acción principal como remodeladores de los nucleosomas es la generación de espacios entre ellos y el mantenimiento de estos, básico para garantizar una estabilidad genómica (De la Cruz X *et al.* 2005; Ryan DP y Owen-Hughes T 2011).

Familia INO80

Las proteínas de la familia INO80 forman grandes complejos, de hasta 12 subunidades diferentes (Lusser A y Kadonaga T 2003). Esta subfamilia SNF2 posee además de actividad ATPasa actividad helicasa, dominio distintivo respecto las otras subfamilias (Figura 11) (Marfella CG y Imbalzano AN 2007; Ryan DP y Owen-Hughes T 2011). Su función en la remodelación del nucleosoma es similar a la familia ISWI, ya que también actúa como generador de espacios entre nucleosomas aunque no lo hace a través de la unión a histonas sino mediante la unión directa al ADN (Ryan DP y Owen-Hughes T 2011). Recientemente se ha relacionado su actividad helicasa con la función de respuesta de daño al ADN (Hopfner KP *et al.* 2012).

Familia CHD

Esta familia de proteínas remodeladoras de la cromatina se caracteriza por poseer dos cromodominios localizados en tándem en la región N-terminal, un dominio ATPasa en la región central y un dominio de unión al ADN en la región C-terminal (Figura 11) (Hall JA y Georgel PT 2007). Estas proteínas ejercen su función remodeladora mediante la unión a factores de transcripción específicos, a marcas de histonas concretas, a ADN metilado y/o a la polimerasa Poli-ADP-ribosa (Murawska M y Brehm A 2011). La presencia de dominios adicionales permite subdividir la familia CHD en tres subfamilias, todas ellas son proteínas de gran tamaño, con elevada homología entre ellas y altamente conservadas evolutivamente (Hall JA y Georgel PT 2007; Marfella CG y Imbalzano AN 2007). La subfamilia I, incluye las proteínas CHD1 y CHD2, no contiene ningún dominio adicional aunque se ha identificado que el dominio de unión al ADN tiene preferencia para las regiones ricas en adenosina y timina (Hall JA y Georgel PT 2007; Murawska M y Brehm A 2011). La subfamilia II, compuesta por CHD3 y CHD4, no contiene un dominio claro de unión al ADN pero presenta dos dominios PDH (del inglés *Plant Homeo Domain*) en su región N-terminal. Estos están involucrados en la remodelación de la cromatina gracias a su unión a las histonas metiladas. Y la subfamilia III, que conforma el grupo más heterogéneo, incluye las proteínas CHD5 a CHD9, Kismet-L, TO4D-14 y KIAA1416 (Hall JA y Georgel PT 2007). Éste grupo posee dos dominios adicionales. Un dominio SANT, que permite la unión a histonas y tiene afinidad para cualquier tipo de cadena de ADN, y/o un dominio BRK (del inglés *Brahma and Kismet domains*), dominio altamente conservado específico de células eucariotas del cual se desconoce su función (Marfella CG y Imbalzano AN 2007; Murawska M y Brehm A 2011).

Las propiedades bioquímicas de cada subfamilia CHD son diversas, algunas de ellas existen como monómeros (por ejemplo CHD1 o CHD2) y otras forman parte de complejos multiproteicos, por ejemplo, CHD3 y CHD4 forman parte del complejo NURD (del inglés *NUcleosome Remodeling and histone Deacetylase*), que regula la represión de la transcripción mediante la deacetilación de las histonas y la consecuente remodelación del nucleosoma (Murawska M y Brehm A 2011).

Defectos en algunas de estas proteínas se han asociado con distintas patologías, como la dermatomiotosis, el síndrome CHARGE (síndrome complejo que incluye varios trastornos y defectos de los cuales derivan sus siglas; C: Coloboma de ojos, H: defectos en el corazón (H de *Heart* en inglés), A: Atresia de las coanas, R: Retardo del crecimiento y desarrollo, G: anomalías Genitourinarias, y E: anomalías de los oídos (E de *Ears* en inglés)) y el NB, entre otras (Hall JA y Georgel PT 2007; Marfella CG y Imbalzano AN 2007).

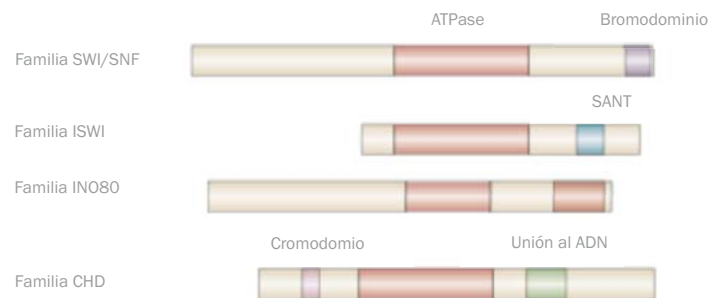


Figura 11. Estructura de las familias de proteínas que conforman la superfamilia proteica SNF2. Modificado de Tsukiyama T 2002.

5.2 Chromodomain Helicase DNA binding protein 5

El gen *Chromodomain Helicase DNA binding protein 5* (*CHD5*), se describió por primera vez en el año 2002 en el contexto de un estudio que tenía como objetivo identificar nuevos genes relacionados con los complejos proteicos SWI/SNF (Schuster EF y Stöger R 2002). Un año más tarde, el Dr. Garrett M. Brodeur y sus colaboradores describieron por primera vez su estructura genómica así como sus perfiles de expresión génica (Thompson PM et al. 2003).

CHD5 se localiza en la región cromosómica 1p36.3. Está flanqueado en el extremo 5' por el gen *Ribosomal Protein 22* (*RPL22*) y en el extremo 3' por el gen *Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2* (*KCNB2*) (Figura 12A) (Thompson PM et al. 2003; Okawa ER et al. 2008). El gen *CHD5* se compone de 42 exones y mide 78218pb. Se transcribe en una molécula de ADNc que se extiende 9646pb. Da lugar a una proteína nuclear de 223KDa y 1954 residuos (Bagchi A y Mills AA 2008). La proteína *CHD5*, miembro de la subfamilia de proteínas CHD, se estructura en dos dominios PHD (localizados entre los exones 8-9 y los exones 9-10), dos cromodominios (en el exón 10 y entre los exones 11-12), un dominio ATPasa (entre los exones 14-19) y un dominio helicasa (entre los exones 21-23) (Figura 12B) (Thompson PM et al. 2003).

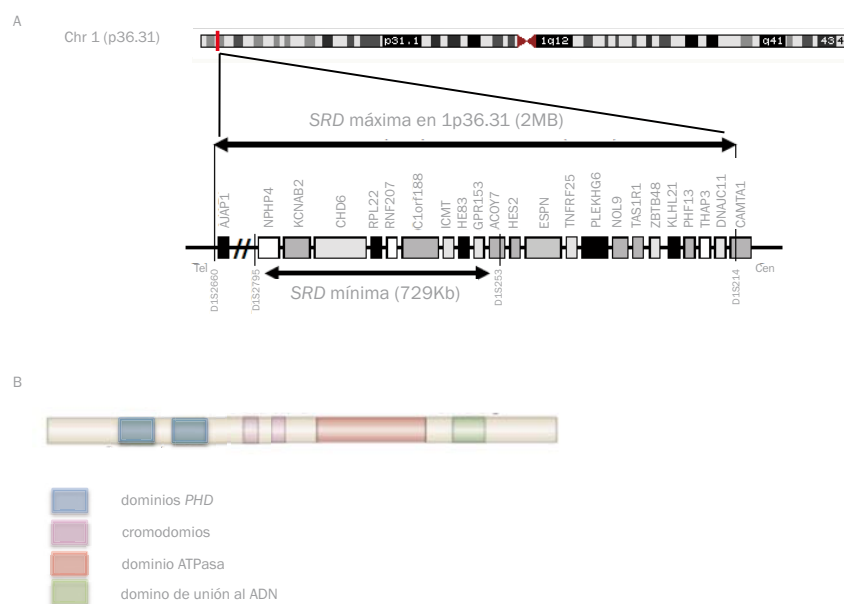


Figura 12. A) Localización del gen *CHD5* en el contexto de la región SDR del cromosoma 1p36.31 en NB. Modificado de Okawa ER et al. 2008. B) Estructura y dominios que conforman la proteína *CHD5*. Modificado de Tsukiyama T 2002 y Thompson PM et al. 2003.

CHD5 en tejido normal

El patrón de expresión génica de *CHD5* está restringido al tejido neural. En el año 2003, el Dr. Garrett M. Brodeur y sus colaboradores analizaron los niveles de expresión de ARNm en un panel de 18 tejidos normales. Sólo se detectó expresión en cerebro, cerebro fetal, cerebelo, médula espinal y glándula suprarrenal; siendo la más elevada en cerebro. La exclusividad del patrón de expresión restringida a tejidos neurales permitió hipotetizar que *CHD5* podría tener un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso así como para la ejecución de funciones específicas de estos tejidos (Thompson PM *et al.* 2003).

CHD5 y cáncer

La región cromosómica 1p36 es una región delecionada frecuentemente en diversas neoplasias (White PS *et al.* 2005; Bagchi A *et al.* 2007). La frecuencia y la especificidad de las deleciones en esta región han llevado a la búsqueda de uno o más GST localizados en esta región. En el año 2007, el Dr. Anindya Bagchi describió *CHD5* como GST localizado en dicha región demostrando en un modelo de animal transgénico como niveles bajos de *CHD5* predisponen a procesos de malignización como consecuencia de la inactivación de las vías celulares dependientes de *p16Ink4a*, *p19Arf* y *p53*. Según sus resultados, *CHD5* podría modular *p53* a través de la regulación transcripcional de *p19Arf*. Este descubrimiento hizo que diversos grupos empezaran a investigar los mecanismos que regulaban la expresión de este gen en las diferentes neoplasias.

En NB, la región 1p36.3 forma parte de la región más pequeña de deleción (SDR, del inglés *Smallest Region of consistent Deletion*) identificada en NB, justo donde localiza *CHD5* (Figura 12A) (White PS *et al.* 2005; Okawa ER *et al.* 2008). El patrón de expresión génica está restringido a tejidos neurales, entre ellos a glándula suprarrenal, lugar de origen de los TN. Conjuntamente con la baja expresión identificada en líneas celulares y en tumores primarios de NB (Thompson PM *et al.* 2003), así como la correlación de los niveles de expresión más elevados con tumores de características de bajo riesgo sugieren que la represión de la expresión de *CHD5* contribuye al desarrollo de NB con fenotipo agresivo (Thompson PM *et al.* 2003; Fujita T *et al.* 2008; Okawa ER *et al.* 2008).

Hipótesis y Objetivos

1. Hipótesis

La evolución y el pronóstico clínico de los neuroblastomas (NB) es muy heterogéneo, incluye desde una proliferación agresiva y metastásica a una maduración o una regresión espontánea. Dicha heterogeneidad es el reflejo de las características genéticas y biológicas propias del tumor, que tienen su impacto en los perfiles de expresión génica.

Nuestro grupo ha identificado perfiles transcripcionales de grupos de genes con la capacidad de discriminar nítidamente entre subgrupos de NB con pronósticos clínicos radicalmente distintos. Estos patrones de expresión génica asociados de forma significativa con el comportamiento clínico de estos tumores, pueden resultar útiles para la identificación de marcadores moleculares de predicción de pronóstico que contribuyan a una clasificación molecular más precisa de los NB.

Las modificaciones epigenéticas representan uno de los principales mecanismos de modulación de la expresión génica. Alteraciones en los mecanismos de regulación epigenética, como son la alteración del patrón de metilación del ADN, podrían estar implicadas en las variaciones de expresión génica identificadas entre subgrupos de NB con distinta evolución clínica.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General:

Establecer marcadores moleculares de pronóstico basados en genes identificados previamente como diferencialmente expresados, con capacidad para discriminar de forma precisa entre subgrupos de NB con comportamiento clínico radicalmente distinto. Así como estudiar el patrón de metilación del ADN de los NB como posible mecanismo responsable de los perfiles génicos hallados diferencialmente expresados.

2.2 Objetivos específicos:

1. Avanzar hacia una clasificación molecular de los NB:

1.1. Desarrollar un modelo estadístico de predicción de pronóstico en pacientes afectados de NB basado en perfiles de expresión génica:

1.1.1. Validar mediante la reacción de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) las variaciones de expresión de los genes identificados previamente, mediante *microarrays*, como diferencialmente expresados.

1.1.2. Seleccionar mediante algoritmos estadísticos los genes diferencialmente expresados con mayor potencial pronóstico.

1.1.3. Crear un modelo estadístico de predicción de pronóstico basado en los niveles de expresión génica de los genes seleccionados.

1.2. Validar el modelo estadístico de predicción de pronóstico desarrollado en nuestro laboratorio:

1.2.1. Validar el modelo desarrollado en una cohorte de NB independientes obtenida de diferentes instituciones nacionales e internacionales.

1.2.2. Realizar estudios estadísticos para determinar el valor predictivo del modelo de predicción de pronóstico.

1.2.3. Validar la robustez del modelo estadístico de predicción de pronóstico y el procedimiento por el cual se ha obtenido.

1.2.4. Realizar estudios estadísticos para evaluar el potencial predictivo del modelo estadístico respecto a marcadores de pronóstico ya establecidos en NB.

1.2.5. Realizar estudios estadísticos para evaluar la capacidad de predicción del modelo respecto a los sistemas de clasificación de riesgo clínico actualmente aceptados para NB.

1.2.6. Evaluar la capacidad del modelo estadístico de predicción de pronóstico para clasificar subgrupos clínicos biológicamente relevantes de NB.

2. Estudiar y evaluar la posibilidad de utilizar los niveles de expresión proteica de alguno de los genes identificados con expresión diferencial como marcador inmunohistoquímico de pronóstico en NB:

2.1. Caracterizar inmunofenotípicamente genes hallados diferencialmente expresados en tejidos normales y en tumores neuroblásticos.

2.2. Estudiar y evaluar la posibilidad de utilizar el patrón de expresión proteica de genes diferencialmente expresados como marcador inmunohistoquímico de pronóstico en NB.

2.3. Realizar análisis estadísticos para determinar el potencial de predicción del posible marcador inmunohistoquímico en NB.

2.4. Validar el posible marcador inmunohistoquímico de pronóstico en cohortes de NB obtenidos de diferentes instituciones hospitalarias nacionales e internacionales.

3. Estudio del patrón de metilación del ADN de NB como posible mecanismo responsable de los perfiles de expresión química diferenciales:

3.1. Analizar el patrón de metilación del ADN de NB primarios mediante la tecnología de *microarrays*.

3.1.1. Identificar un patrón de metilación del ADN específico de NB.

3.1.2. Identificar un patrón de metilación del ADN de subgrupos de NB clínica y biológicamente relevantes

3.1.3. Caracterización biológica de los genes diferencialmente metilados: localización cromosómica, densidad de dinucleótidos CG en las regiones promotoras e identificación de genes diana de los complejos represivos de la familia Polycomb (PRC, del inglés *Polycomb Repressive Complex*).

3.1.4. Identificar un patrón de metilación del ADN asociado a los perfiles de expresión génica de NB

3.2. Validar los perfiles de metilación del ADN identificados mediante pirosecuenciación.

Resultados

Anexos

Abreviaciones

Bibliografía

Conclusiones

Discusión

Resultados

Hipótesis y Objetivos

Introducción

1. Modelo estadístico de predicción de pronóstico para pacientes afectados de neuroblastoma basado en el perfil de expresión génica de tres genes.

Idoia Garcia*, Gemma Mayol*, José Ríos*, Gema Domenech, Nai-Kong V. Cheung, André Oberthuer, Matthias Fischer, John M. Maris, Garrett M. Brodeur, Barbara Hero, Eva Rodríguez, Mariona Suñol, Patricia Galvan, Carmen de Torres, Jaume Mora y Cinzia Lavarino.

*Autores que han contribuido por igual en el estudio.

Publicado en la revista *Clinical Cancer Research* 2012; 18:2012-2023.

FI: 7.338, Q1.

Resumen

El neuroblastoma (NB) agrupa un espectro muy heterogéneo de tumores que evolucionan de forma radicalmente distinta. La variedad de comportamiento clínico del NB determina un enfoque terapéutico que puede variar entre un abordaje terapéutico intensivo multimodal o una actitud expectante. Por lo tanto, la clasificación precisa de los diferentes subtipos de NB es importante para determinar el tratamiento más apropiado. Actualmente los sistemas de clasificación de riesgo clínico en NB se basan en distintos parámetros clínicos, biológicos y morfológicos. No obstante, todavía existen casos donde estos sistemas de clasificación han mostrado una utilidad clínica limitada. En NB, se han llevado a cabo varios estudios dirigidos al análisis de expresión mediante *microarrays* con el fin de identificar perfiles de expresión génica útiles para predecir el pronóstico de los pacientes. No obstante, las listas de genes descritas hasta la fecha son demasiado extensas para poder implementarlas en la práctica clínica de forma rutinaria. Para traducir estos perfiles en pruebas aplicables, es imprescindible reducir el número de genes y generar perfiles que puedan ser analizados mediante técnicas como la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

Con este objetivo, hemos desarrollado un modelo estadístico de predicción de pronóstico para NB basado en el patrón de expresión de genes hallados previamente diferencialmente expresados. El modelo ha sido desarrollado utilizando datos de expresión génica obtenidos mediante qRT-PCR a partir de muestras de tejido tumoral de 96 NB primarios al diagnóstico. Mediante modelos de regresión de Cox y Análisis de Componentes Principales se identificaron tres genes, *Chromodomain, helicase DNA-binding protein 5 (CHD5)*, *Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoforma 1B (PAFAH1B1)* y *Nonmetastatic cells 1, protein expressed in (NME1)*, asociados de forma estadísticamente significativa con las variables clínicas supervivencia global (OS) y supervivencia libre de evento (EFS). A partir de estos tres genes hemos desarrollado un modelo estadístico con el objetivo de obtener una única variable que permitiera una medición global del perfil de expresión en cada NB:

$$Y_{96} = (\alpha_1) \times (CHD5) + (\alpha_2) \times (PAFAH1B1) + (\alpha_3) \times (NME1)$$

Y_{96} : variable de medición del perfil de expresión del modelo de predicción

α_n : coeficiente de regresión de cada gen

(Gen): datos de expresión z-transformados del gen para cada muestra analizada

El modelo de predicción de pronóstico desarrollado ha sido validado mediante qRT-PCR, utilizando una cohorte independiente de 120 muestras (Set 1) de NB obtenidas del Departamento de Oncología del Hospital Pediátrico de Colonia (Alemania) y utilizando datos de expresión de dos bases de datos (Set 2 y Set 3) públicas de *microarrays* que comprenden un total de 352 pacientes. Los resultados obtenidos mostraron la capacidad del modelo estadístico propuesto para clasificar los pacientes en dos subgrupos con evolución clínica significativamente diferente (Set 1: 5 años de OS: 0.93 ± 0.03 vs 0.53 ± 0.06 , 5 años de EFS: 0.85 ± 0.04 vs 0.042 ± 0.06 , ambas $P < 0.001$; Set 2: OS: 0.97 ± 0.02 vs 0.61 ± 0.1 , $P = 0.005$, EFS: 0.91 ± 0.8 vs 0.56 ± 0.1 , ambas $P = 0.005$; Set 3: OS: 0.99 ± 0.01 vs 0.56 ± 0.06 , EFS: 0.96 ± 0.02 vs 0.43 ± 0.05 , ambas $P < 0.001$). Los análisis con modelos de regresión de Cox multivariados demostraron que el modelo de predicción de pronóstico era un marcador independiente para OS y EFS ($P < 0.001$, en ambos casos). Asimismo el modelo propuesto mostró una capacidad de predicción más precisa que los sistemas de clasificación utilizados actualmente en ensayos clínicos internacionales (*German Society for Pediatric Hematology/Oncology [GPOH] NB2004*; *Children's Oncology Group [COG] USA*; *Japanese Advanced Neuroblastoma Study Group [JANB]*).

El valor de este modelo viene dado por el número reducido de genes que lo componen, la viabilidad a nivel técnico (qRT-PCR), la aplicabilidad a biopsias de tejido tumoral pequeñas, la rapidez, fácil interpretación y reproducibilidad de los resultados, y el bajo coste económico.

Proponemos por primera vez en NB, un modelo estadístico de predicción de pronóstico técnicamente sencillo basado en la PCR que podría ayudar a refinar los actuales sistemas de clasificación de riesgo clínico.

A Three-Gene Expression Signature Model for Risk Stratification of Patients with Neuroblastoma

Idoia Garcia¹, Gemma Mayol¹, José Ríos³, Gema Domenech³, Nai-Kong V. Cheung⁴, André Oberthuer⁵, Matthias Fischer⁵, John M. Maris⁶, Garrett M. Brodeur⁶, Barbara Hero⁵, Eva Rodríguez¹, Mariona Suñol², Patricia Galvan¹, Carmen de Torres¹, Jaume Mora¹, and Cinzia Lavarino¹

Abstract

Purpose: Neuroblastoma is an embryonal tumor with contrasting clinical courses. Despite elaborate stratification strategies, precise clinical risk assessment still remains a challenge. The purpose of this study was to develop a PCR-based predictor model to improve clinical risk assessment of patients with neuroblastoma.

Experimental Design: The model was developed using real-time PCR gene expression data from 96 samples and tested on separate expression data sets obtained from real-time PCR and microarray studies comprising 362 patients.

Results: On the basis of our prior study of differentially expressed genes in favorable and unfavorable neuroblastoma subgroups, we identified three genes, *CHD5*, *PFAFH1B1*, and *NME1*, strongly associated with patient outcome. The expression pattern of these genes was used to develop a PCR-based single-score predictor model. The model discriminated patients into two groups with significantly different clinical outcome [set 1: 5-year overall survival (OS): 0.93 ± 0.03 vs. 0.53 ± 0.06 , 5-year event-free survival (EFS): 0.85 ± 0.04 vs. 0.042 ± 0.06 , both $P < 0.001$; set 2 OS: 0.97 ± 0.02 vs. 0.61 ± 0.1 , $P = 0.005$, EFS: 0.91 ± 0.8 vs. 0.56 ± 0.1 , $P = 0.005$; and set 3 OS: 0.99 ± 0.01 vs. 0.56 ± 0.06 , EFS: 0.96 ± 0.02 vs. 0.43 ± 0.05 , both $P < 0.001$]. Multivariate analysis showed that the model was an independent marker for survival ($P < 0.001$, for all). In comparison with accepted risk stratification systems, the model robustly classified patients in the total cohort and in different clinically relevant risk subgroups.

Conclusion: We propose for the first time in neuroblastoma, a technically simple PCR-based predictor model that could help refine current risk stratification systems. *Clin Cancer Res*; 18(7); 2012–23. ©2012 AACR.

Introduction

Neuroblastoma, the most common solid extracranial pediatric tumor, is heterogeneous in terms of its biologic, genetic, and morphologic characteristics. Such tumors

exhibit diverse clinical behaviors whereby patients with similar clinicopathologic features can have radically different outcomes. Since treatment strategies vary from surgery alone to intensive multimodal regimens, precise risk assessment is critical for therapeutic decisions. Currently, several clinical, biologic, and morphologic parameters, such as age at diagnosis, tumor stage, genomic amplification of *MYCN* oncogene, copy number alterations of the chromosomal regions 1p, 11q, and 17q, ploidy, and histologic features, are considered as markers of neuroblastoma outcome (1–4). However, despite elaborate risk stratification strategies, there remain cases where these markers have shown limited clinical use.

Microarray gene expression studies have contributed to identify sets of genes of prognostic importance in numerous neoplasias, including neuroblastoma (5–13). Nevertheless, the use of microarrays in clinical practice is limited by the large sets of genes identified and the need for complex statistical analyses required to extract informative patterns from raw microarray data. Furthermore, there has been little overlap in the prognostic gene sets identified by different groups. To translate these profiles

Authors' Affiliations: ¹Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, Fundació Sant Joan de Déu; ²Department of Pathology, Hospital Sant Joan de Déu; ³Laboratory of Biostatistics & Epidemiology, Universitat Autònoma of Barcelona; Clinical Pharmacology Service, IDI-BAPS, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ⁴Department of Pediatrics, Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre, New York; ⁵Department of Pediatric Oncology, Children's Hospital of Cologne, Cologne, Germany; and ⁶Division of Oncology, Children's Hospital of Philadelphia, Pennsylvania, Philadelphia

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

I. Garcia, G. Mayol, and J. Ríos contributed equally to this work.

Corresponding Author: Cinzia Lavarino, Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, Edificio Docente 4th Floor, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona 08950, Spain. Phone: 34-932804000; Fax: 34-936006119; E-mail: clavarino@fsjd.org

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2483

©2012 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Neuroblastoma risk stratification is perhaps the most advanced of all pediatric solid tumors. International classification systems are based on various clinicopathologic and genetic parameters. Nevertheless, there remain cases where these elaborated stratification strategies have shown limited clinical use. In this study, a three-gene PCR-based single-score model was developed and tested using quantitative real-time PCR and microarray expression data from four sets including 458 patients with primary neuroblastoma. The scoring method reliably stratified patients with significantly different outcome in all the test sets and in different neuroblastoma risk subgroups, showing to be robust and highly reproducible. Furthermore, multivariate analysis showed that the model is an independent prognostic factor for survival. The proposed model is a technically simple classifier that requires minimal amount of mRNA, easy to interpret, reproducible, and cost-effective. These results provide evidence of a practical prognostic classifier that could help refine pretreatment risk assessment in patients with neuroblastoma.

into clinically applicable tests, it is essential to reduce the number of genes and create profiles that can be analyzed with a conventional assay such as quantitative real-time PCR (qRT-PCR).

In our previous study, we identified differentially expressed genes capable of discriminating between subgroups of neuroblastoma with radically different clinical course; namely, near-triploid (favorable prognosis) and near-diploid/tetraploid tumors (unfavorable prognosis). A substantial portion of these genes mapped to chromosomes 1 and 17, chromosomal regions found to be recurrently altered in neuroblastoma (14). Tumor cell ploidy has recently been included in the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system as a significant neuroblastoma biomarker together with *MYCN* status and 11q23 allelic status (3). Gene expression profiles associated with different neuroblastoma ploidy status may contribute to the identification of genes that are predictive of outcome. In this study, we investigated whether the identified gene expression profiling data allowed for the development of an outcome predictor model that could both accurately predict neuroblastoma outcome and be technically simple and applicable for routine clinical use. To this end, we examined the prognostic significance of 11 high-ranked, differentially expressed genes located on the chromosomes 1 and 17, chosen on the basis of our previous study (14). The results of a qRT-PCR-based analysis enabled the development of a single-score predictor model based on the expression pattern of 3 genes, *CHD5*, *PAFAH1B1*, and *NME1*, strongly associated with patient outcome.

Methods

Patients and samples

Tumor specimens from 96 patients with neuroblastoma were obtained at the time of diagnosis from different institutions [Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC), NY ($n = 42$), Hospital Sant Joan de Déu (HSJD), Barcelona, Spain ($n = 32$); Hospital Niño Jesús, Madrid, Spain ($n = 11$); Hospital La Paz, Madrid, Spain ($n = 7$); and Hospital La Fe, Valencia, Spain ($n = 4$)] and represented the training set of this study (Table 1 and Supplementary Table S1).

The first 36 unselected cases of the training cohort (36 of 96 neuroblastoma) were used to develop the gene expression-based model; the remaining 60 primary neuroblastoma tumors were used as preliminary testing cohort. The complete training cohort ($n = 96$) was subsequently used to refine the obtained model (Table 1 and Supplementary Table S1).

A separate set of 120 primary neuroblastoma tumors (hereafter referred as set 1) of patients diagnosed and treated at the Department of Pediatric Oncology, University Children's Hospital of Cologne, Cologne, Germany, was used as an independent, blinded set of RNA samples to validate the model by qRT-PCR.

Tumors were assessed by a pathologist, only tumors with more than 70% viable tumor cell content were included in the study. Risk assessment was defined by the International Staging System (INSS; ref. 1). Neuroblastoma stages I–IV were treated without use of cytotoxic therapy, when possible. Patients with stage IV neuroblastoma were treated with the combination of intensive chemotherapy (including high-dose therapy and autologous stem cell rescue), radiotherapy, and surgery. Written informed consent was obtained from each subject or from his or her guardian before collection of samples. This study was approved by the Institutional Review Boards.

Gene expression data

Two published gene expression data sets from different platforms comprising 352 patients in total were used as validation sets. Expression data were downloaded from the National Centre of Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (GSE3960; ref. 15) and from the European Bioinformatics Institute ArrayExpress database (E-TABM-38; ref. 9). Updated clinical data were obtained from the authors. The validation sets will be hereafter referred to as set 2 [$n = 101$ (ref. 15)] and set 3 [$n = 251$ (ref. 9)]. Sets 2 and 3 were used to assess the prediction performance of the model across different neuroblastoma expression data sets. Set 3 includes expression data of 110 patients comprised in set 1. This set of overlapping samples ($n = 110$) was used to estimate the prediction performance of the model in neuroblastoma tumors analyzed by different expression methods (qRT-PCR and microarray analyses). Set 3 was used for further analyses aimed to test the classification performance of the model as compared with current risk stratification systems. Set 3 was selected for

Table 1. Clinical and biologic characteristics of the training and validation cohorts

Characteristics	Validation			
	Training set (N = 96)	Set 1 (N = 120)	Set 2 (N = 101)	Set 3 (N = 251)
Age, mo				
Median	18.94	26.9	16.3	15.03
Range	0–216	0–299	0–156	0–276
INSS, n (%)				
Stage I–III	53 (56)	43 (36)	51 (50)	153 (61)
Stage IV	34 (35)	52 (43)	50 (50)	67 (27)
Stage IVS	9 (9)	25 (21)	—	31 (12)
MYCN status, n (%)				
Amplified	20 (21)	24 (20)	20 (20)	30 (12)
Nonamplified	76 (79)	96 (80)	81 (80)	220 (88)
Undetermined	—	—	—	1
1p status, n (%)				
LOH	11 (25)	31 (26)	28 (28)	52 (21)
No LOH	33 (75)	88 (73)	72 (72)	194 (79)
Undetermined	52	1	1	5
Follow-up, mo				
Median	48.22	89.21	11.73	64.46

these analyses as it comprises a full representation of the neuroblastoma tumor spectra and a median follow-up time of more than 5 years (Table 1 and Supplementary Table S5).

The analyses were done blinded of clinical and biologic data and sample identification.

RNA isolation and qRT-PCR

Total RNA was isolated from the 96 snap-frozen samples using Tri Reagent (Sigma), following manufacturers' protocols. The cDNA was synthesized from 1 µg total RNA as previously described (14). Gene expression was quantified with TaqMan Gene Expression Assays (Supplementary Table S2) products on an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System, using the $\Delta\Delta C_T$ relative quantification method. All experiments included no-template controls and were carried out in duplicate and repeated twice independently. Transcript levels were measured relative to 3 normal tissue samples (adrenal gland, lymph node, and bone marrow) and normalized to TATA-box-binding protein (*TBP*), hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*), and succinate dehydrogenase complex, subunit A (*SDHA*) expression values as previously described by Vandesompele and colleagues (16).

To control for possible variations among PCR runs conducted on different days, the expression of the reference genes was assessed in all tumor samples and control specimens at commencement, halfway through, and on completion of all the analyses. The assays were highly reproducible, with coefficient of variation (CV) less than 0.05 (*TBP* = 0.035, *SDHA* = 0.049, and *HPRT1* = 0.040 in tumor samples and *TBP* = 0.029, *SDHA* = 0.045, and *HPRT1* = 0.022 for control specimens).

Statistical analysis

Gene expression values were normalized with a z-score transformation. From the 96 neuroblastoma cases of the training set, the first 36 unselected cases were used for the selection of genes strongly associated, as independent factors, with overall (OS) and event-free (EFS) using Cox regression models. Relapse, progression, and death from disease were considered as events. Genes significantly associated with OS and EFS were further tested using principal components analysis (PCA; multivariable unsupervised method) with the VARIMAX rotation method and tested using Cox regression models. This procedure was conducted by means of a stepwise backward selection approach. Briefly, at each step of the backward selection procedure, one gene was removed from the set of genes. To select which gene was discarded (not independent predictor or the least statistically significant), all the possible combinations of genes were tested by removing and then reintroducing one by one each gene following an iterative procedure. Each gene set combination was thus analyzed using PCA and tested with Cox regression models to assess the performance and the association with OS and EFS. This backward selection procedure concluded when the combination with the minimum set of genes statistically significantly associated with OS and EFS is found. After testing all the combinations, genes that were not independent predictors and the least statistically significant genes were discarded.

The outcome predictor model was developed using a linear combination of the z-score transformed expression value of each of the selected genes, weighted by the regression coefficients (α) of components with Eigenvalue > 1. The model was tested using the remaining 60

neuroblastoma cases of the training set. The entire training cohort ($n = 96$) was used to refine the model. To validate the final model, we applied it to different expression data sets obtained by qRT-PCR (set 1) and microarray gene expression studies (sets 2 and 3). The performance of the model was examined with multivariable Cox regression models using a stepwise variable selection procedure. Survival curves were described using the Kaplan–Meier method and compared by means of the log-rank test. The area under the curve (AUC) of the receiver operating characteristic (ROC) test was used for quantitative assessment of the final model for the testing set (set 3). Predictive values (positive and negative), sensitivity, specificity, and the accuracy were calculated and expressed along with known prognostic factors (age, INSS, *MYCN* status, chromosome 11q and 1p alterations, and histologic features). Data were analyzed with SPSS program (version 15.0; SPSS, Inc.). All statistical tests were 2-sided. P values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

Selection of genes for the outcome predictor score model

In our previous study, we found specific transcriptional profiles associated with neuroblastoma with different ploidy (14). A statistically significant number of genes found to

be differentially expressed mapped to chromosomes 1 ($P = 0.01$) and 17 ($P < 0.0001$), chromosomes with aberrations reported to be consistently associated with outcome in neuroblastoma (2). For this study, we selected 11 high-ranked, differentially expressed genes located on the chromosomes 1 and 17, some of these known to play a role in neuroblastoma pathogenesis. The expression levels of the 11 genes were quantified using qRT-PCR in 36 neuroblastoma tumors (Supplementary Table S1). To assess the association with OS and EFS, qRT-PCR expression levels were normalized by z -score transformation and analyzed using univariable Cox regression models (Supplementary Table S3). High expression of 6 genes was found to be significantly associated ($P < 0.05$) as independent factors with outcome: 5 (*RERE*, *PTPRF*, *GNB1*, *CHD5*, and *PFAFH1B1*) were associated with longer OS and EFS ($HR < 1$ for all) and one gene, *NME1*, was associated with worse clinical outcome ($HR > 1$). These 6 genes were considered potential prognostic markers and were further studied. We conducted PCA and univariable Cox regression analyses applying a stepwise backward selection approach. This selection procedure identified a predominant gene expression pattern. Three genes, *CHD5* (chromodomain, helicase DNA-binding protein 5), *PFAFH1B1* (platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1B), and *NME1/nm23-H1* (nonmetastatic cells 1, protein expressed in), had a principal component with Eigenvalue > 1 describing more than

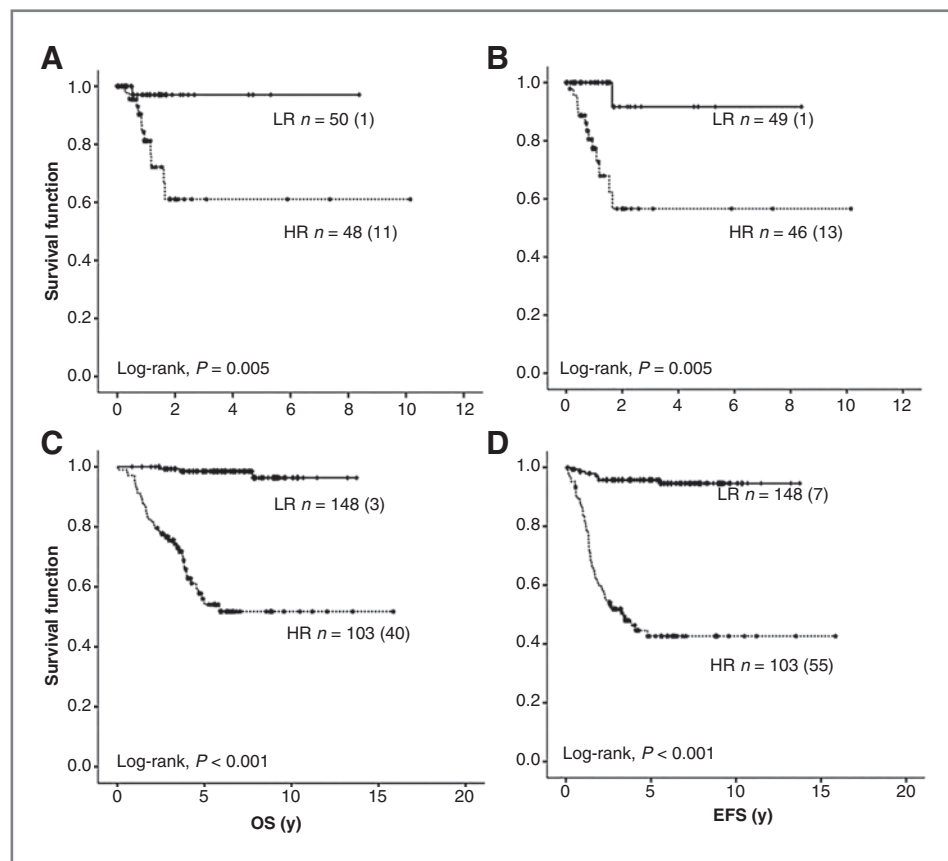


Figure 1. Kaplan–Meier analyses with log-rank estimates for OS and EFS of set 2 (A and B) and set 3 (C and D) classified according to the prediction (Y_{96}) model. HR, high-risk; LR, low-risk.

Table 2. Estimation of the performance of the (Y₉₆) model for OS and EFS of set 3 (n = 251) in comparison with clinical and biologic parameters

	OS						EFS							
	Alive	DOD	Sensitivity %	Specificity %	PPV %	PNV %	Accuracy %	No event	Event	Sensitivity %	Specificity %	PPV %	PNV %	Accuracy %
MYCN														
No amplification	195	25	41.9	93.8	60.0	88.6	84.9	177	43	30.6	93.7	63.3	80.5	78.1
Amplification	12	18						11	19					
INSS stage														
I-III, IVs	173	11	74.4	83.2	47.8	94.0	81.7	162	22	64.5	85.7	59.7	88.0	80.5
IV	35	32						27	40					
Age, mo														
<18	160	8	81.4	76.9	42.2	95.2	77.7	149	19	69.4	78.8	51.8	88.7	76.5
>18	48	35						40	43					
1p														
No	181	18	58.1	87.0	48.1	91.0	82.1	165	34	45.2	87.3	53.8	82.9	76.9
Del/imb	27	25						24	28					
Model_Y ₉₆														
Low-risk	145	3	93.0	69.7	38.8	98.0	73.7	141	7	88.7	74.6	53.4	95.3	78.1
High-risk	63	40						48	55					

NOTE: The performance of the (Y₉₆) model measured as the AUC for the ROC test was 0.87 (95% CI, 0.83–0.92) for OS and 0.89 (95% CI, 0.84–0.93) for EFS. Abbreviations: Del/imb, deletion/imbalance; DOD, dead of disease; PNV, predictive negative value; PPV, predictive positive value.

60% of the expression variability and were found to be strongly associated with OS and EFS ($P = 0.001$, for both). These 3 genes were selected for the model as the strongest prognostic markers. We thus developed a gene expression-based outcome predictor score model using z -transformed qRT-PCR data of each of the 3 genes weighted by the regression coefficients from the PCA (Supplementary Table S4), as described in the equation:

$$(Y_{36}) = (\alpha_1) \times (CHD5) + (\alpha_2) \times (PAFAH1B1) + (\alpha_3) \times (NME1)$$

where, (Y_{36}) is the outcome prediction score, equation developed using 36 neuroblastomas; α_n is the weighted value of each gene to the definition of (Y) ; $\alpha_1 = 0.418$; $\alpha_2 = 0.430$; $\alpha_3 = -0.374$; and $(Gene)$ is the z -transformed gene expression data of the sample analyzed.

The negative weighting value of $NME1$ indicates that the contribution of this gene is inversely correlated with the (Y_{36}) score; thus, high expression levels of $NME1$ correlate with low (Y_{36}) values. Patients were ranked according to their (Y_{36}) score. Low (Y_{36}) values were associated with shorter OS and EFS; conversely, an increase of the (Y_{36}) score was associated with longer survival. Gene expression transformation to a z -distribution (mean, 0; SD, 1) allowed

the cutoff point to divide neuroblastoma tumors with high or low scores to be set at the value $(Y_{36}) = 0$. Kaplan–Meier estimates showed how the model could clearly separate the patients into groups with divergent clinical course (Supplementary Fig. S1A and S1B).

The first approximation of the model was tested using an independent set of 60 primary neuroblastoma tumors (Supplementary Table S1). For each tumor, qRT-PCR expression levels of the 3 genes were z -transformed and inserted into the equation (Y_{36}) . Patients were ranked and divided into 2 groups, $Y_{36} < 0$ or > 0 . The outcome predictor score could separate patients with significant differences in OS [HR, 9.3; 95% confidence interval (CI), 1.1–79.7; $P = 0.013$] and EFS (HR, 3.1; 95% CI, 1.2–8.03; $P = 0.014$; Supplementary Fig. S1C and S1D).

To improve the performance of the predictor model, we proceeded to reestimate the component coefficient scores of the 3 genes using the entire training cohort of 96 cases (Supplementary Table S1). The component coefficient score values obtained were comparable with those of the (Y_{36}) equation (Supplementary Table S4). Kaplan–Meier analyses with log-rank estimates of the 96 training samples analyzed with the (Y_{96}) model confirmed the strong

Table 3. Multivariable Cox regression model for OS and EFS considering the (Y_{96}) model and clinical and biologically relevant parameters for risk stratification of set 3 patients

	Survival		Event	
	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
<i>Univariate model</i>				
Model (Y_{96})	28.09 (8.65–91.19)	<0.001	15.59 (7.07–34.34)	<0.001
Age	11.68 (5.40–25.27)	<0.001	5.44 (3.16–9.36)	<0.001
Model (Y_{96})	15.85 (4.75–52.91)	<0.001	11.07 (4.89–25.07)	<0.001
Age	5.41 (2.46–11.95)	<0.001	2.61 (1.49–4.59)	0.001
INSS stage	10.14 (5.1–20.16)	<0.001	6.27 (3.72–10.57)	<0.001
Model (Y_{96})	15.13 (4.41–51.97)	<0.001	10.32 (4.46–23.86)	<0.001
INSS stage	3.65 (1.78–7.5)	<0.001	2.48 (1.42–4.31)	0.001
<i>MYCN</i>	8.7 (4.7–16.1)	<0.001	4.7 (2.73–8.1)	<0.001
Model (Y_{96})	20.2 (6.02–67.73)	<0.001	13.53 (6–30.5)	<0.001
<i>MYCN</i>	2.74 (1.46–5.12)	0.002	1.59 (0.91–2.77)	0.105
1p LOH	7.48 (4.06–13.77)	<0.001	4.25 (2.57–7.03)	<0.001
Model (Y_{96})	18.92 (5.63–63.52)	<0.001	12.83 (5.67–29.01)	<0.001
1p LOH	2.93 (1.56–5.47)	0.001	1.76 (1.05–2.95)	0.033
<i>Multivariate model</i>				
Model (Y_{96})	9.9 (2.8–35.3)	<0.001	836 (3.6–30.4)	<0.001
<i>MYCN</i>	3.2 (1.7–6.0)	<0.001	1.7 (0.99–3.0)	0.053
INSS stage	4.2 (2.0–8.4)	<0.001	2.6 (1.5–4.5)	0.001

NOTE: The analysis was conducted sequentially, adding one variable at each step, to assess how the presence of each variable influences the performance of the (Y_{96}) model. The (Y_{96}) model was statistically significantly associated with OS and EFS in univariate and multivariate analyses.

Abbreviation: NE, "non evaluable" P value due to "no cases" in a combination of the 2 factors.

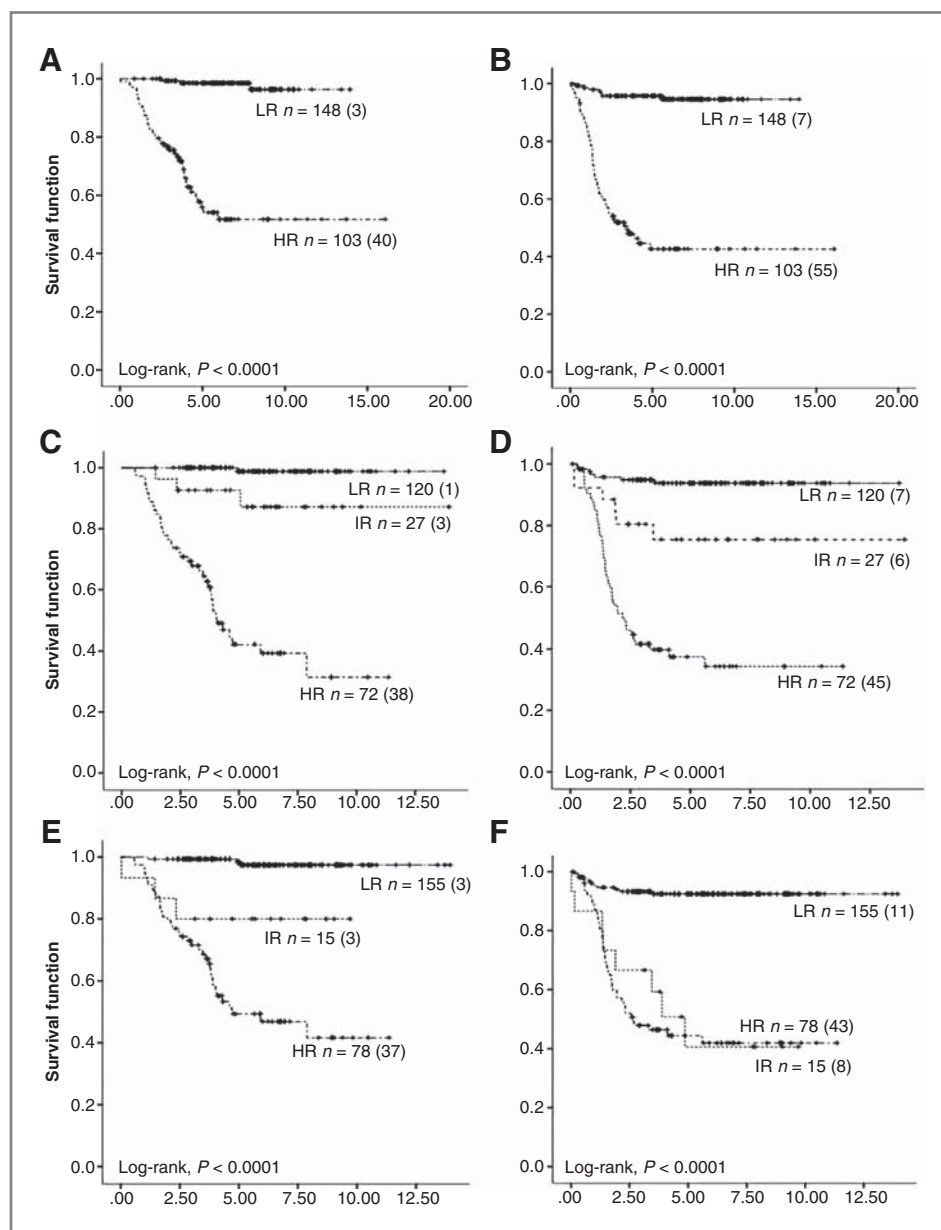


Figure 2. Kaplan-Meier analyses and log-rank estimates for OS and EFS of the validation cohort set 3 classified according to the (Y_{96}) model (A and B), INRG (C and D), GPOH NB2004 (E and F).

association of the (Y_{96}) model with OS and EFS ($P < 0.001$, for both; Supplementary Fig. S1E and S1F). The (Y_{96}) model was tested on an independent, blinded set of 120 neuroblastoma tumors (set 1) by qRT-PCR. Patients were separated into 2 groups with significantly diverse clinical outcome (5-year OS: 0.93 ± 0.03 vs. 0.53 ± 0.06 , 5-year EFS: 0.85 ± 0.04 vs. 0.047 ± 0.06 , both $P < 0.001$; OS: HR, 7.5; 95% CI, 2.9–19.5; and EFS: HR, 4.7; 95% CI, 2.3–9.5; Supplementary Fig. S1G and S1H).

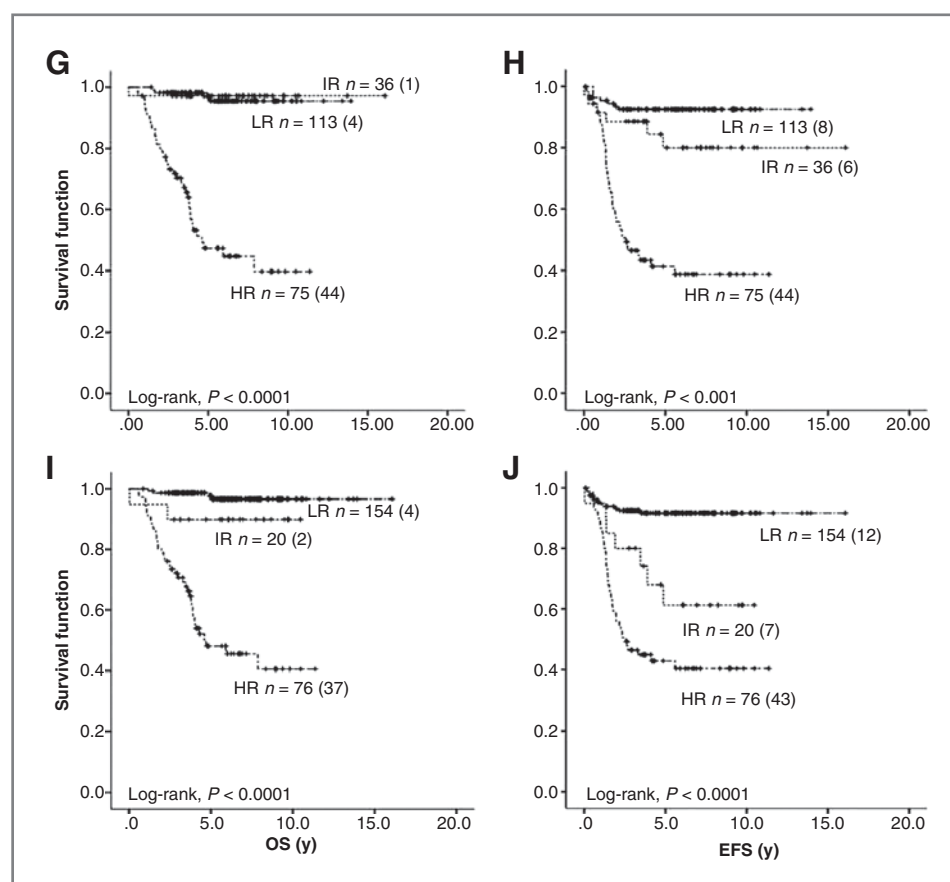
Validation of outcome predictor model using independent microarray data

To assess whether the (Y_{96}) model was able to predict prognosis across different neuroblastoma data sets, we

applied it to 2 published gene expression databases from different microarray platforms: set 2 ($n = 101$; ref. 15) and set 3 ($n = 251$; ref. 9).

For each patient, microarray expression data of the 3 genes were z -transformed and inserted into the equation (Y_{96}). Kaplan-Meier estimation with log-rank test and univariable Cox regression models showed that for both data sets, the (Y_{96}) score could clearly separate patients into 2 groups with different OS and EFS [set 2: 5-year OS: 0.97 ± 0.02 vs. 0.61 ± 0.1 ; HR, 10.5; 95% CI, 1.3–80.7; 5-year EFS: 0.91 ± 0.8 vs. 0.56 ± 0.1 ; HR, 13.3; 95% CI, 1.7–101.6, both $P = 0.005$; set 3 5-year OS: 0.99 ± 0.01 vs. 0.56 ± 0.06 ; HR, 28.1; 95% CI, 8.7–91.2; 5-year EFS: 0.96 ± 0.02 vs. 0.43 ± 0.05 ; HR, 15.6; 95% CI, 7.1–34.3,

Figure 2. (Continued) COG (G and H), and JANB (I and J). HR, high-risk; IR, intermediate-risk; LR, low-risk.



both $P < 0.001$; (Fig. 1)]. For set 2, only one [stage III *MYCN* nonamplified (NA) neuroblastoma] of the 50 patients (2%) assigned to the low-risk group by the (Y_{96}) score, had a fatal disease progression, and was thus misclassified. For set 3, 7 of the 148 patients (4.7%) assigned to the low-risk group by the (Y_{96}) model had an event. Of them, 3 (2%; stage IV, >18 months, *MYCN* NA) died of disease progression.

The estimation of the performance of the (Y_{96}) model for prediction of outcome showed an AUC for the ROC test of 0.87 (95% CI, 0.83–0.92) for OS and 0.89 (95% CI, 0.84–0.93) for EFS. Prediction accuracies for the (Y_{96}) model and established neuroblastoma prognostic parameters (age, INSS, *MYCN* amplification, and chromosome 1p status) are shown in Table 2. Furthermore, in a multivariable Cox regression analysis evaluating the prognostic parameters, the model remained significantly associated with OS and EFS ($P < 0.001$ for all), showing thus to be independent of other prognostic markers (Table 3).

To further assess the model across different data sets, the prediction performance of samples analyzed by different expression methods (qRT-PCR and microarray analyses), included in sets 1 and 3 ($n = 110$), was compared. Equivalent results were obtained (data not shown), showing that the classification capacity of the model is independent of the type and origin of the expression data used.

Classification performance of the (Y_{96}) model with respect to current risk stratification systems

To evaluate the prediction performance of the (Y_{96}) model, risk stratification systems of international neuroblastoma trials were applied to set 3; this set of data has a full representation of the neuroblastoma tumor spectra and a median follow-up time of more than 5 years (Table 1). According to the criteria of the INRG and of clinical trials from Germany [German Society for Pediatric Hematology/Oncology (GPOH) NB2004], the United States [Children's Oncology Group (COG)], and Japan [Japanese Advanced Neuroblastoma Study Group (JANB)], 219, 248, 224, and 250 patients could be classified, respectively (Supplementary Table S5). All classification systems separated patients into groups with significant differences in OS and EFS (Fig. 2, Table 4). In comparison, the classification prediction of the (Y_{96}) model differed in a subset of patients (Fig. 2, Table 4 and Supplementary Table S5). Specifically, 5 of the patients favorably classified had a fatal outcome (INRG, $n = 1$ of 120; NB2004, $n = 3$ of 155; COG, $n = 4$ of 113; and JANB, $n = 4$ of 154; 4 cases matched), notably, these patients were classified in the high-risk group by the (Y_{96}) model. Similarly, the 4 patients with a fatal outcome assigned to the intermediate-risk group (INRG, $n = 3$ of 27; NB2004, $n = 3$ of 15; COG, $n = 1$ of 36; and JANB, $n = 2$ of 20; 3 case matched) were classified as high-risk patients by

Table 4. Summary of the Kaplan–Meier estimates shown in Fig. 2

Risk classification system	Low-risk			High-risk			Intermediate-risk		
	No. of patients	Survival probability	SE	No. of patients	Survival probability	SE	No. of patients	Survival probability	SE
Y₉₆ model (n = 251)									
EFS (3 y)	148	0.96	0.02	103	0.52	0.05			
OS (3 y)		0.99	0.01		0.77	0.04			
EFS (5 y)		0.96	0.02		0.43	0.05			
OS (5 y)		0.99	0.01		0.56	0.06			
INRG (n = 219)									
EFS (3 y)	120	0.95	0.02	72	0.41	0.06	27	0.8	0.08
OS (3 y)		1.00	0.01		0.69	0.05		0.93	0.05
EFS (5 y)		0.94	0.02		0.37	0.06		0.75	0.09
OS (5 y)		0.99	0.01		0.42	0.07		0.93	0.05
NB2004 (n = 248)									
EFS (3 y)	155	0.93	0.02	78	0.48	0.06	15	0.67	0.12
OS (3 y)		0.99	0.01		0.73	0.05		0.8	0.1
EFS (5 y)		0.92	0.02		0.44	0.06		0.67	0.12
OS (5 y)		0.98	0.01		0.49	0.06		0.8	0.02
COG (n = 224)									
EFS (3 y)	113	0.93	0.03	75	0.47	0.06	36	0.89	0.05
OS (3 y)		0.98	0.01		0.72	0.05		0.97	0.03
EFS (5 y)		0.93	0.03		0.41	0.06		0.8	0.08
OS (5 y)		0.97	0.02		0.47	0.06		0.97	0.03
JANB (n = 250)									
EFS (3 y)	154	0.93	0.02	76	0.47	0.06	20	0.8	0.09
OS (3 y)		0.99	0.01		0.72	0.05		0.9	0.07
EFS (5 y)		0.92	0.02		0.43	0.06		0.61	0.12
OS (5 y)		0.98	0.01		0.48	0.06		0.9	0.07

the (Y₉₆) model. Conversely, 3 cases assigned to the low-risk group according to the (Y₉₆) model and unfavorably classified by the risk stratification systems, died of disease.

(Y₉₆) model classification of patient subgroups defined by current prognostic markers

Performance of the (Y₉₆) model was assessed within patient subgroups of set 3 defined by currently used prognostic markers and compared with international neuroblastoma risk stratification systems. The (Y₉₆) model correctly classified patients with fatal outcome in the subgroup of patients younger than 18 months (5-year OS: 1.0 vs. 0.80 ± 0.65, $P < 0.0001$; 5-year EFS: 0.98 ± 0.01 vs. 0.58 ± 0.83, $P < 0.0001$) and significantly separated patients with different OS and EFS within the cohort of age above 18 months (5-year OS: 0.93 ± 0.05 vs. 0.32 ± 0.06, $P < 0.0001$; 5-year EFS: 0.87 ± 0.06 vs. 0.34 ± 0.07, $P < 0.0001$; Supplementary Figs. S2 and S3). Furthermore, the model accurately classified all patients with localized neuroblastoma: stage I to III MYCN not amplified (5-year OS: 1.0 vs. 0.78 ± 0.1, $P < 0.0001$; 5-year EFS: 0.98 ± 0.13 vs. 0.64 ± 0.10, $P < 0.0001$), stage I to III age above 18 months (5-year OS: 1.0 vs. 0.44 ± 0.14, $P < 0.001$; 5-year EFS: 0.95 ± 0.44 vs. 0.43 ± 0.11, $P <$

0.001), as well as patients older than 18 months with stage I to III MYCN not amplified disease (5-year OS: 1.0 vs. 0.56 ± 0.19, $P < 0.001$; 5-year EFS: 0.95 ± 0.41 vs. 0.33 ± 0.18, $P < 0.0001$), showing a higher classification accuracy than the risk stratification systems (Supplementary Figs. S4–S6). A significant classification capacity was observed for patients stage IV (5-year OS: 0.85 ± 0.1 vs. 0.41 ± 0.07, $P = 0.02$; 5-year EFS: 0.76 ± 0.1 vs. 0.27 ± 0.06, $P = 0.01$; Supplementary Fig. S7). Within stage IV neuroblastoma, the performance of the model was less robust for stage IV with MYCN nonamplified disease (5-year OS: 0.85 ± 0.1 vs. 0.52 ± 0.09, $P = 0.095$; 5-year EFS: 0.77 ± 0.11 vs. 0.33 ± 0.09, $P = 0.04$) or stage IV above 18 months MYCN nonamplified tumors (5-year OS: 0.77 ± 0.13 vs. 0.33 ± 0.1, $P = 0.096$; 5-year EFS: 0.66 ± 0.15 vs. 0.25 ± 0.1, $P = 0.125$; Supplementary Figs. S8 and S9). However, the model showed the capacity to classify correctly all MYCN amplified neuroblastoma (stage I–IV) as high-risk tumors (Supplementary Fig. S10).

Validation of the robustness of the three-gene signature and the statistical procedure

To show that the 3 selected genes are highly prognostic independent of the test set used to build the predictive

model, we developed for each validation set independently, an equation using exclusively microarray data. *CHD5*, *PFAFH1B1*, and *NME1* microarray expression data were *z*-transformed and processed following the same statistical methodology mentioned above. The principal component coefficient scores obtained for each equation, ($Y_{\text{set}2}$) and ($Y_{\text{set}3}$), were similar to those of the (Y_{96}) model (Supplementary Table S4). Set 2 and 3 data were analyzed applying these equations. For both data sets, Kaplan–Meier estimates and univariable Cox regression models showed equivalent results to those obtained with the (Y_{96}) model (Supplementary Fig. S11 and Table S5). These results show the robustness of the gene expression signature and of the statistical methodology used to develop the model.

Discussion

In this study, we developed a PCR-based predictor model using the expression pattern of just 3 genes strongly associated with outcome of patients with neuroblastoma. *CHD5*, *PFAFH1B1*, and *NME1* were identified through the analysis of the prognostic significance of 11 genes found differentially expressed in our previous study (14). The results of a qRT-PCR-based evaluation of the expression pattern of the selected genes in a training set of 96 primary neuroblastoma tumors enabled the development of a single-score predictor model. Its validity was assessed using different expression data sets obtained from qRT-PCR and microarray gene expression studies comprising a total of 362 patients (9, 15). Our scoring method reliably stratified patients into neuroblastoma groups with markedly divergent clinical course. Multivariable Cox models showed that the developed scoring model was an independent predictor marker for survival. Moreover, the prediction performance of the 3-gene model was found to be as robust as the international neuroblastoma risk stratification systems based on a combination of clinical and biologic parameters. Our classifier also significantly discriminated between patients in most subgroups defined by currently used prognostic markers. Interestingly, a significantly higher prediction performance than current risk stratification systems was observed in clinically relevant subgroups such as children with localized disease *MYCN* nonamplified. This is a relevant finding, as outcome prediction in this biologically broad subgroup of localized nonamplified neuroblastoma tumors still remains a challenge, as suggested by the low- and intermediate-risk patients experiencing adverse disease. The (Y_{96}) model could, thus, help to better stratify these patients into subgroups with different clinical course and treatment regimens.

The genes that comprise the model have been previously reported to be involved in neuroblastoma biology. *CHD5* is a tumor suppressor gene located on chromosome 1p36.31, region recurrently lost in high-risk neuroblastoma (17–21). Expression of this ATP-dependent chromatin remodeling helicase has been found to be restricted to neuronal-derived tissues and absent in

neuroblastoma cell lines and neuroblastoma primary tumors with high-risk features, undifferentiated neuroblasts, *MYCN* amplification, advanced stage, and 1p monosomy (18, 21). Association between *CHD5* expression and favorable prognosis in neuroblastoma has been reported previously in microarray gene expression studies (8, 11, 14, 22). *PFAFH1B1*, located on chromosome 17p13.3, encodes an acetylhydrolase involved in cerebral cortex development, neuronal migration, and axonal growth (23). Mutations of *PFAFH1B1* have been related to the Miller–Dieker lissencephaly syndrome (23, 24). We identified *PFAFH1B1* expression in low-risk neuroblastoma tumors, whereas in high-risk tumors, expression is significantly diminished. *PFAFH1B1* has been reported previously associated with favorable prognosis in neuroblastoma (7). In our study, high expression of both *CHD5* and *PFAFH1B1* correlated with prolonged survival. In contrast, *NME1* displayed high expression levels in high-risk neuroblastoma tumors, as reported previously (25, 26). *NME1*, located on a region frequently gained in clinically aggressive neuroblastoma 17q21.3 (27, 28), has been reported in several microarray analyses to be associated with high-risk neuroblastoma (6, 12, 13). The product of the *NME1* gene is a nucleoside diphosphate kinase involved in cell proliferation, normal development, and cell differentiation (29).

Prognostic models, similar to ours, and gene signatures based on small sets of genes, have been reported previously to predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma (6 genes; ref. 30), clear cell renal carcinoma (3 genes; ref. 31), soft tissue sarcoma (3 genes; ref. 32), and non-small cell lung cancer (5 genes; ref. 33). In neuroblastoma, although diverse studies have proposed robust microarray multigene-based classification systems, to date, these gene signatures are still extensive and difficult to implement to clinical routine; that is, 429 genes (10), 144 genes (7, 9), 59 genes (8), 55 genes (5), 42 genes (6), 39 genes (11), or 19 genes (12). We have reduced the classifier complexity to 3 genes strongly associated with patient outcome and created a prognostic model that can be applied in routine laboratories using conventional qRT-PCR assay. Our preliminary results provide evidence of a prognostic model that can accurately define neuroblastoma clinical risk groups and could thus assist therapeutic decisions in patients with neuroblastoma.

In conclusion, we propose a robust and technically simple PCR-based one-score predictor model that requires only minimal amount of mRNA, easy to interpret, reproducible, and cost-effective for most laboratories. These features make the model a potentially practical classifier for neuroblastoma risk stratification that could help refine current risk stratification systems. The potential of this prototype model remains to be fully validated using qRT-PCR in a large, prospective, and independent cohort of patients with neuroblastoma samples.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interests were disclosed.

Authors' Contributions

Conception and design: I. Garcia, G. Mayol, J. Rios, G. Domenech, N.-K. V. Cheung, C. de Torres, J. Mora, C. Lavarino.

Development of methodology: I. Garcia, G. Mayol, J. Rios, G. Domenech, M. Suñol, C. de Torres, J. Mora, C. Lavarino.

Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): I. Garcia, G. Domenech, N.-K. V. Cheung, A. Oberthuer, M. Fischer, J.M. Maris, B. Hero, M. Suñol, C. de Torres, J. Mora, C. Lavarino.

Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): I. Garcia, G. Mayol, J. Rios, G. Domenech, A. Oberthuer, C. de Torres, J.M. Maris, J. Mora, C. Lavarino.

Writing, review, and/or revision of the manuscript: I. Garcia, G. Mayol, J. Rios, G. Domenech, N.-K. V. Cheung, A. Oberthuer, M. Fischer, G.M. Brodeur, M. Suñol, C. de Torres, J. Mora, C. Lavarino.

Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): I. Garcia, J. Rios, G. Domenech, M. Fischer, P. Galvan, J. Mora, C. Lavarino.

Study supervision: I. Garcia, J. Rios, G. Domenech, J. Mora, C. Lavarino
Laboratory analyses: I. Garcia, G. Mayol, C. de Torres, P. Galvan, C. Lavarino.

Tissue banking and provision of the samples: E. Rodriguez, P. Galvan, N.-K. V. Cheung, M. Suñol.

Pathology review: M. Suñol.

All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The Authors thank Drs. J. Alonso and P. Garcia-Miguel (Hospital La Paz, Madrid, Spain), Drs. R. Noguera, V. Castel, and S. Navarro (Hospital La Fe, Valencia, Spain), and Drs. A. Pérez-Martínez and I. de Prada Vicente (Hospital Niño Jesús, Madrid, Spain) for annotated neuroblastoma specimens. They also thank Yvonne Kahlert (Department of Pediatric Oncology, Children's Hospital of Cologne, Cologne, Germany) for technical support.

In Memoriam

The authors dedicate this article to the memory of Dr. William L. Gerald, MD, PhD.

Grant Support

This work has been supported by: the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III, FIS PI070286); the Spanish Society against Cancer (AECC, 2007); the Catalan government (AGAUR, Generalitat de Catalunya, 2005SGR00605), NIH grant CA039771, and the Margarita del Pozo Fund donation.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received September 27, 2011; revised February 7, 2012; accepted February 7, 2012; published OnlineFirst February 10, 2012.

References

- Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993; 11:1466-77.
- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet* 2007;369:2106-20.
- Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawa A, et al. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer* 2009;100:1471-82.
- Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System). *Cancer* 1999;86:364-72.
- Asgharzadeh S, Pique-Regi R, Sposto R, Wang H, Yang Y, Shimada H, et al. Prognostic significance of gene expression profiles of metastatic neuroblastomas lacking MYCN gene amplification. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1193-203.
- De Preter K, Vermeulen J, Brors B, Delattre O, Eggert A, Fischer M, et al. Accurate outcome prediction in neuroblastoma across independent data sets using a multigene signature. *Clin Cancer Res* 2010;16:1532-41.
- Oberthuer A, Hero B, Berthold F, Juraeva D, Faldum A, Kahlert Y, et al. Prognostic impact of gene expression-based classification for neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2010;28:3506-15.
- Vermeulen J, De Preter K, Naranjo A, Verduyck L, Van Roy N, Hellemans J, et al. Predicting outcomes for children with neuroblastoma using a multigene-expression signature: a retrospective SIO-PEN/COG/GPOH study. *Lancet Oncol* 2009;10:663-71.
- Oberthuer A, Berthold F, Warnat P, Hera B, Kahlert Y, Spitz R, et al. Customized oligonucleotide microarray gene expression-based classification of neuroblastoma patients outperforms current clinical risk stratification. *J Clin Oncol* 2006;24:5070-8.
- Fischer M, Oberthuer A, Brors B, Kahlert Y, Skowron M, Voth H, et al. Differential expression of neuronal gene defines subtypes of disseminated neuroblastoma with favorable and unfavorable outcome. *Clin Cancer Res* 2006;12:5118-28.
- Schramm A, Schulte JH, Klein-Hitpass L, Havers W, Sieverts H, Berwanger B, et al. Prediction of clinical outcome and biological characterization of neuroblastoma by expression profiling. *Oncogene* 2005;24:7902-12.
- Wei JS, Greer BT, Westermann F, Steinberg SM, Son CG, Chen QR, et al. Prediction of clinical outcome using gene expression profiling and artificial neural networks for patients with neuroblastoma. *Cancer Res* 2004;64:6883-91.
- Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, et al. Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate risk neuroblastomas. *Cancer Cell* 2005;7:337-50.
- Lavarino C, Garcia I, Mackintosh C, Cheung NK, Domenech G, Rios J, et al. Differential expression of genes mapping to recurrently abnormal chromosomal regions characterize neuroblastic tumours with distinct ploidy status. *BMC Med Genomics* 2008;13:36.
- Wang Q, Diskin S, Rappaport E, Attiyeh E, Mosse Y, Shue D, et al. Integrative genomics identifies distinct molecular classes of neuroblastoma and shows that multiple genes are targeted by regional alterations in DNA copy number. *Cancer Res* 2006;66:6050-62.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:Research0034.
- Thompson PM, Gotoh T, Kok M, White PS, Brodeur GM. CHD5, a new member of the chromodomain gene family, is preferentially expressed in the nervous system. *Oncogene* 2003;22:1002-11.
- Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Igarashi J, Fujita T, Silverman KA, et al. Expression and sequence analysis of candidates for the 1p36.31 tumor suppressor gene deleted in neuroblastomas. *Oncogene* 2007; 27:803-10.
- Bagchi A, Papazoglu C, Wu Y, Capurso D, Brodt M, Francis D, et al. CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. *Cell* 2007;128: 459-75.
- Fujita T, Igarashi J, Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Kolla V, et al. CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:940-9.
- Garcia I, Mayol G, Rodríguez E, Suñol M, Gershon TR, Rios J, et al. Expression of the neuron-specific protein CHD5 is an independent marker of outcome in neuroblastoma. *Mol Cancer* 2010; 9:277.
- Lavarino C, Cheung NK, Garcia I, Domenech G, de Torres C, Alaminos M, et al. Specific gene expression profiles and chromosomal abnormalities are associated with infant disseminated neuroblastoma. *BMC Cancer* 2009;9:44.
- Gambello MJ, Darling DL, Yingling J, Tanaka T, Gleeson JG, Wynshaw-Boris A. Multiple dose-dependent effects of Lis1 on cerebral cortical development. *J Neurosci* 2003;23:1719-29.
- Cardoso C, Leventer RJ, Dowling JJ, Ward HL, Chung J, Petras KS, et al. Clinical and molecular basis of classical lissencephaly: mutations in the LIS1 gene (PAFAH1B1). *Hum Mutat* 2002;19:4-15.

25. Hailat N, Keim DR, Melhem RF, Zhu XX, Eckerskorn C, Brodeur GM, et al. High levels of p19/nm23 protein in neuroblastoma are associated with advanced stage disease and with N-myc gene amplification. *J Clin Invest* 1991;88:341–5.
26. Leone A, Seeger RC, Hong CM, Hu YY, Arboleda MJ, Brodeur GM, et al. Evidence for nm23 overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas. *Oncogene* 1993; 8:855–65.
27. Bown N, Cotterill S, Lastwska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantza D, et al. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 1999;340:1954–61.
28. Plantaz D, Mohapatra G, Matthay KK, Pellarin M, Seeger RC, Feuerstein BG. Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 1997;150:81–9.
29. Lombardi D, Lacombe ML, Paggi MG. Nm23: unraveling its biological function in cell development. *J Cell Physiol* 2000;182:144–9.
30. Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, Wechsler MA, Tibshirani R, Botstein D, et al. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med* 2004;350: 1828–37.
31. Yao M, Huang Y, Shioi K, Hattori K, Murakami T, Sano F, et al. A three-gene expression signature model to predict clinical outcome of clear cell renal carcinoma. *Int J Cancer* 2008;123:1126–32.
32. Hoffman AC, Danenberg KD, Taubert H, Danenberg PV, Wuerl P. A three-gene signature for outcome in soft tissue sarcoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:5191–8.
33. Chen HY, Yu SL, Chen CH, Chang GC, Chen CY, Yuan A, et al. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2007;356:11–20.

Supplementary Appendix to:

A three-gene expression signature model for risk stratification of patients with neuroblastoma.

García I*, Mayol G*, Ríos J*, Domenech G, Cheung NK, Oberthuer A, Fischer M, Maris JM, Brodeur GM, Hero B, Rodríguez E, Suñol M, Galvan P, de Torres C, Mora J and Lavarino C.

Methods:

1. **Supplementary Table 1.** Characteristics of the primary NB tumors used to develop and validate the prognostic model by qRT-PCR.
2. **Supplementary Table 2.** TaqMan Gene Expression Assays for gene expression analysis by quantitative real-time PCR.

Results:

1. **Supplementary Table 3.** Univariable Cox regression models of the expression of 11 genes with OS and EFS as a dependent variable.
2. **Supplementary Table 4.** Comparison of principal component coefficient scores of the developed models.
3. **Supplementary Table 5.** Validation Set 3: Classification of patients according to the risk classification system of the INRG and of clinical trials of Germany (GPOH NB 2004), United States (COG) and Japan (JANB).
4. **Supplementary Figure 1.** Kaplan-Meier and log-rank estimates defined by the (Y_{36}) model in 36, 60, 96 and Set 1 primary NB tumors.
5. **Supplementary Figure 2 to 10.** Kaplan-Meier estimates and log-rank test of NB subgroups derived from Set 3.
6. **Supplementary Figure 11.** Kaplan-Meier and long-rank estimates according to the three-gene microarray prediction models (Y_{Set2} and Y_{Set3}).

Las tablas **Supplementary Table 1** y **Supplementary Table 2** no se encuentran impresas a continuación, se encuentran en formato digital en el CD que acompaña esta tesis.

Supplementary Table 2. TaqMan Gene Expression Assays for gene expression analysis by quantitative real-time PCR.

Gene symbol	Gene Name	TaqMan Assay ID
Model Gene		
<i>CHD5</i>	Chromodomain DNA binding helicase, protein 5	Hs00395930_m1
<i>PAFAH1B1</i>	Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1B, alpha subunit	Hs00181182_m1
<i>NME1</i>	Non-metastatic cell 1, protein (NM23A) expressed in	Hs00264824_m1
Reference Gene		
<i>TBP</i>	TATA box-binding protein	Hs00427620_m1
<i>HPRT1</i>	Hypoxantine guanine phosphoribosyltransferase 1	Hs01003267_m1
<i>SDHA</i>	succinate dehydrogenase complex, subunit A	Hs00417200_m1

Supplementary Table 3. Univariable Cox regression models of the expression of 11 genes with OS and EFS as a dependent variable.

Gene	Localization	Overall survival		Event free survival	
		Hazard Ratio		Hazard Ratio	
		95%CI	P-value	95%CI	P-value
NME1	17q21.3	2.09 (1.26; 3.49)	0.005	1.60 (1.06; 2.42)	0.026
FLOT2	17q11.2	0.77 (0.38; 1.59)	0.483	1.04 (0.62; 1.75)	0.873
POLR2A	17p13.1	0.54 (0.20; 1.46)	0.225	0.53 (0.23; 1.23)	0.142
RERE	1p36.23	0.52 (0.27; 0.99)	0.046	0.55 (0.33; 0.91)	0.019
RUTBC1	17p13.3	0.49 (0.21; 1.17)	0.108	0.65 (0.36; 1.20)	0.171
PTPRF	1p34	0.40 (0.16; 0.96)	0.039	0.34 (0.16; 0.73)	0.006
VAMP2	17p13.1	0.37 (0.10; 1.42)	0.149	0.57 (0.25; 1.28)	0.171
ARHGEF11	1q21	0.37 (0.14; 1.01)	0.053	0.65 (0.32; 1.31)	0.229
GNB1	1p36.33	0.32 (0.12; 0.89)	0.029	0.46 (0.23; 0.91)	0.026
CHD5	1p36.31	0.17 (0.03; 0.85)	0.031	0.38 (0.15; 0.97)	0.043
PAFAH1B1	17p13.3	0.20 (0.07; 0.60)	0.004	0.23 (0.10; 0.52)	0.000

Supplementary Table 4. Comparison of principal component coefficient scores of the developed models.

Model	Component coefficient scores		
	α_1	α_2	α_3
Y_{36}	0.418	0.430	-0.374
Y_{96}	0.480	0.462	-0.347
Y_{Set2}	0.502	0.454	-0.266
Y_{Set3}	0.445	0.457	-0.430

Supplementary Figure 1. Kaplan-Meier analyses with log-rank estimates for OS and EFS according to the (Y_{36}) model in the training set of 36 NB cases (Panel A and B) and in the independent set of 60 (Panel C and D). OS and EFS of the complete training set of 96 primary tumors (Panel E and F) and of the validation Set 1 (Panel G and H) classified according to the (Y_{96}) model.

Supplementary Figure 2. Kaplan-Meier analyses with log-rank estimates for OS and EFS are shown as defined by the (Y_{96}) model (Panel A and B), INRG (Panel C and D), GPOH NB2004 (Panel E and F), COG (Panel G and H) and JANB (Panel I and J) risk stratification systems for NB patients <18 months from Set 3 cohort.

Supplementary Figure 3. Kaplan-Meier analyses with log-rank estimates for OS and EFS are shown as defined by the (Y_{96}) model (Panel A and B), INRG (Panel C and D), GPOH NB2004 (Panel E and F), COG (Panel G and H) and JANB (Panel I and J) risk stratification systems for NB patients age > 18 months from Set 3 cohort.

Supplementary Figure 4. Kaplan-Meier analyses with log-rank estimates for OS and EFS are shown as defined by the (Y_{96}) model (Panel A and B), INRG (Panel C and D), GPOH NB2004 (Panel E and F), COG (Panel G and H) and JANB (Panel I and J) risk stratification systems for all NB patients stage 1 to 3 *MYCN* non-amplified from Set 3.

Supplementary Figure 5. Kaplan-Meier analyses with log-rank estimates for OS and EFS are shown as defined by the (Y_{96}) model (Panel A and B), INRG (Panel C and D), GPOH NB2004 (Panel E and F), COG (Panel G and H) and JANB (Panel I and J) risk stratification systems for patients age > 18 months with stage 1 to 3 NB from Set 3 cohort.

Supplementary Figure 6. Kaplan-Meier analyses with log-rank estimates for OS and EFS are shown as defined by the (Y_{96}) model (Panel A and B), INRG (Panel C and D), GPOH NB2004 (Panel E and F), COG (Panel G and H) and JANB (Panel I and J) risk stratification systems for patients age >18m, stage 1 to 3 *MYCN* non-amplified from Set 3.

Supplementary Figure 7. Kaplan-Meier analyses with log-rank estimates for OS and EFS are shown as defined by the (Y_{96}) model (Panel A and B), INRG (Panel C and D), GPOH NB2004 (Panel E and F), COG (Panel G and H) and JANB (Panel I and J) risk stratification systems for patients stage 4 from Set 3 cohort. Panels C and D show only 1 graph since all patients with available data for risk stratification according to the INRG criteria, were classified as HR tumors.

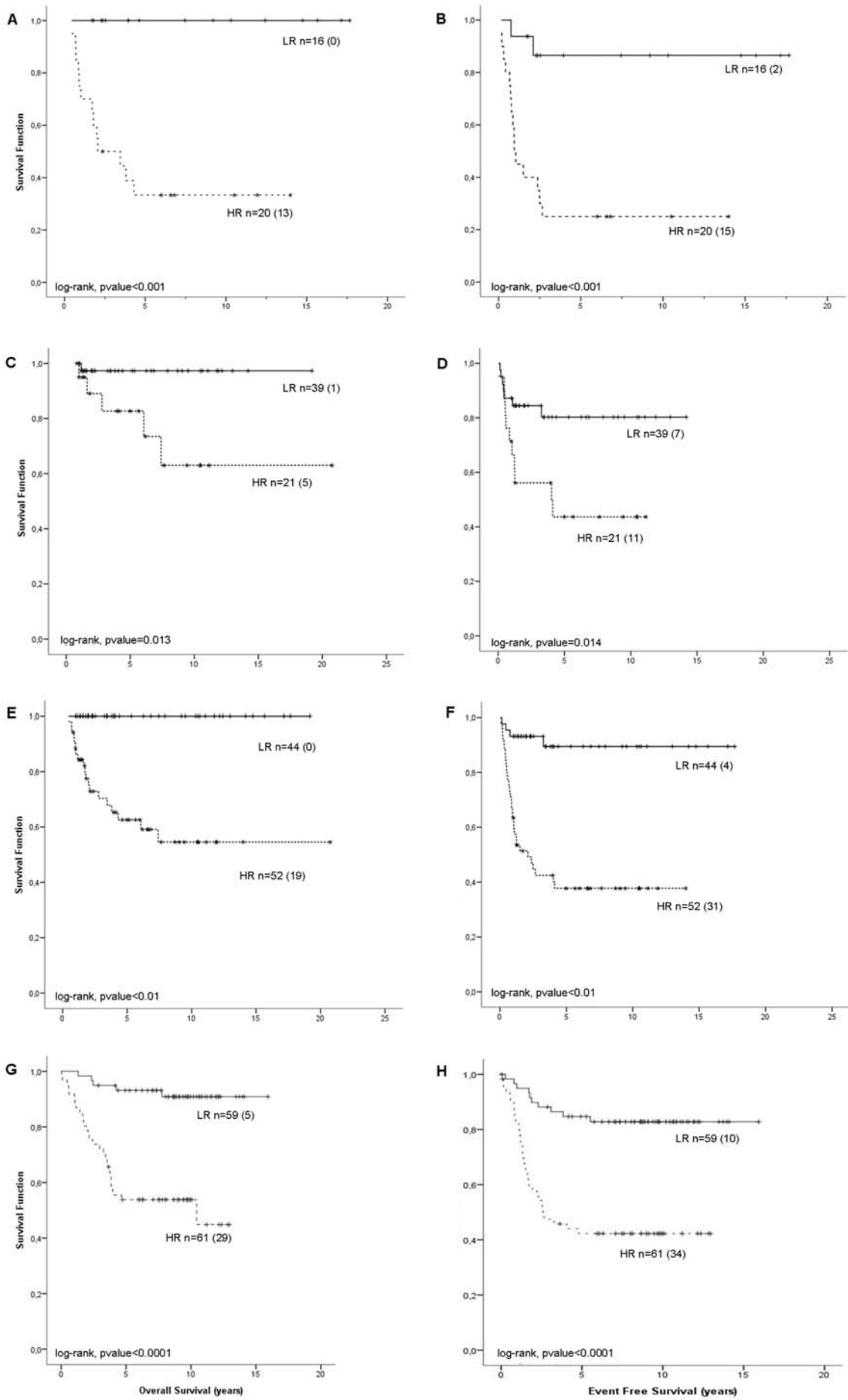
Supplementary Figure 8. Kaplan-Meier and log-rank estimates of OS and EFS are shown as defined by the (Y_{96}) model (Panel A and B), INRG (Panel C and D), GPOH NB2004 (Panel E and F), COG (Panel G and H) and JANB (Panel I and J) risk stratification systems for patients stage 4 *MYCN* non-amplified from Set 3 cohort. Panels C and D show only 1 graph since all patients with available data for risk stratification according to the INRG criteria, were classified as HR tumors.

Supplementary Figure 9. Kaplan-Meier and log-rank estimates of OS and EFS as defined by the (Y_{96}) model (Panel A and B) in patients >18m stage 4 *MYCN* non-amplified from Set 3 cohort. According to the INRG, GPOH NB2004, COG and JANB criteria all patients were classified as high-risk (data not shown).

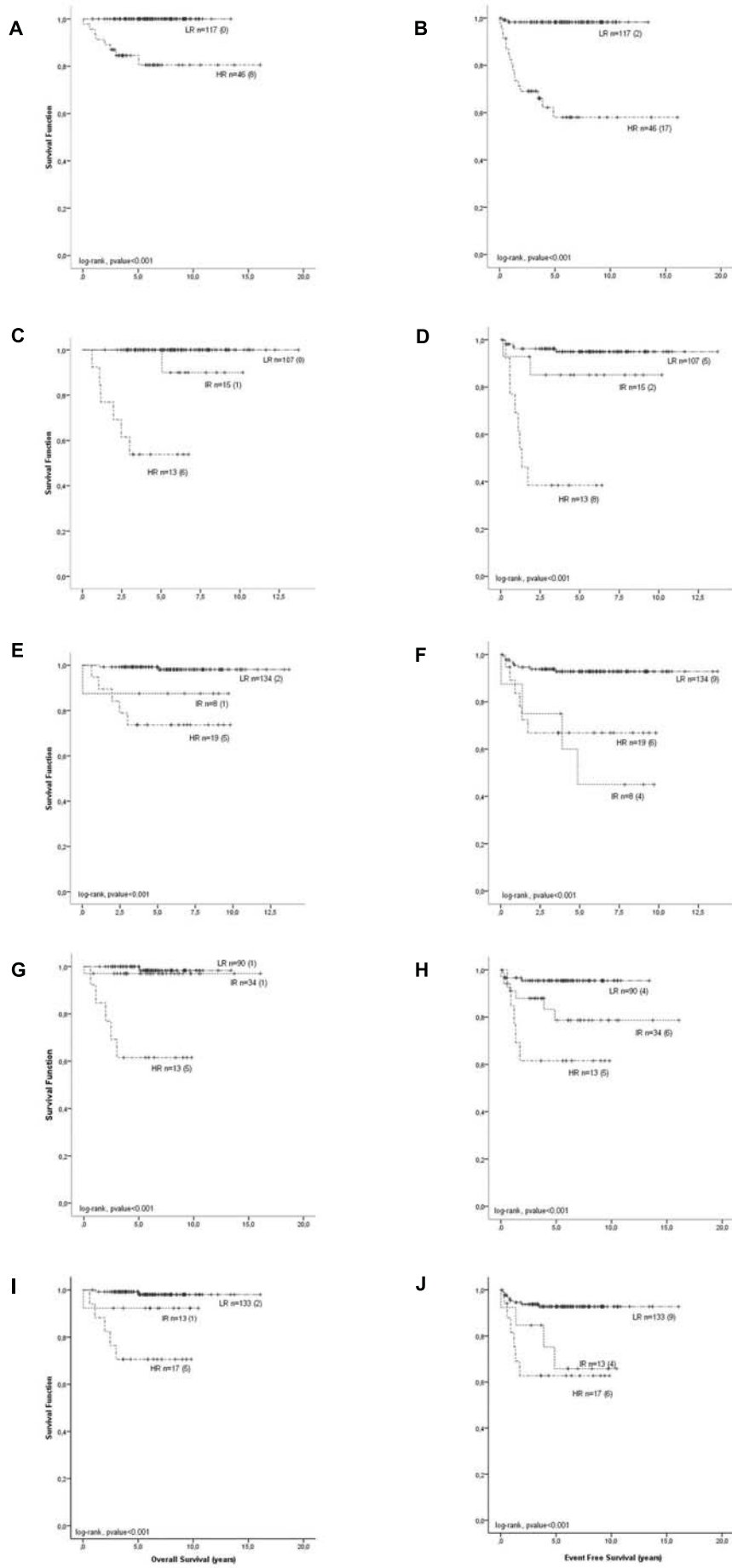
Supplementary Figure 10. Kaplan-Meier analysis with log-rank estimates of OS and EFS for all *MYCN* amplified NB (stage 1 to 4). According to the INRG, GPOH NB2004, COG and JANB criteria all patients were classified as high-risk (data not shown).

Supplementary Figure 11. Kaplan-Meier and long-rank estimates of OS and EFS are shown as defined by the prediction of the models based on the three-gene microarray expression, Y_{Set2} (Panel A and B) and Y_{Set3} (Panel C and D).

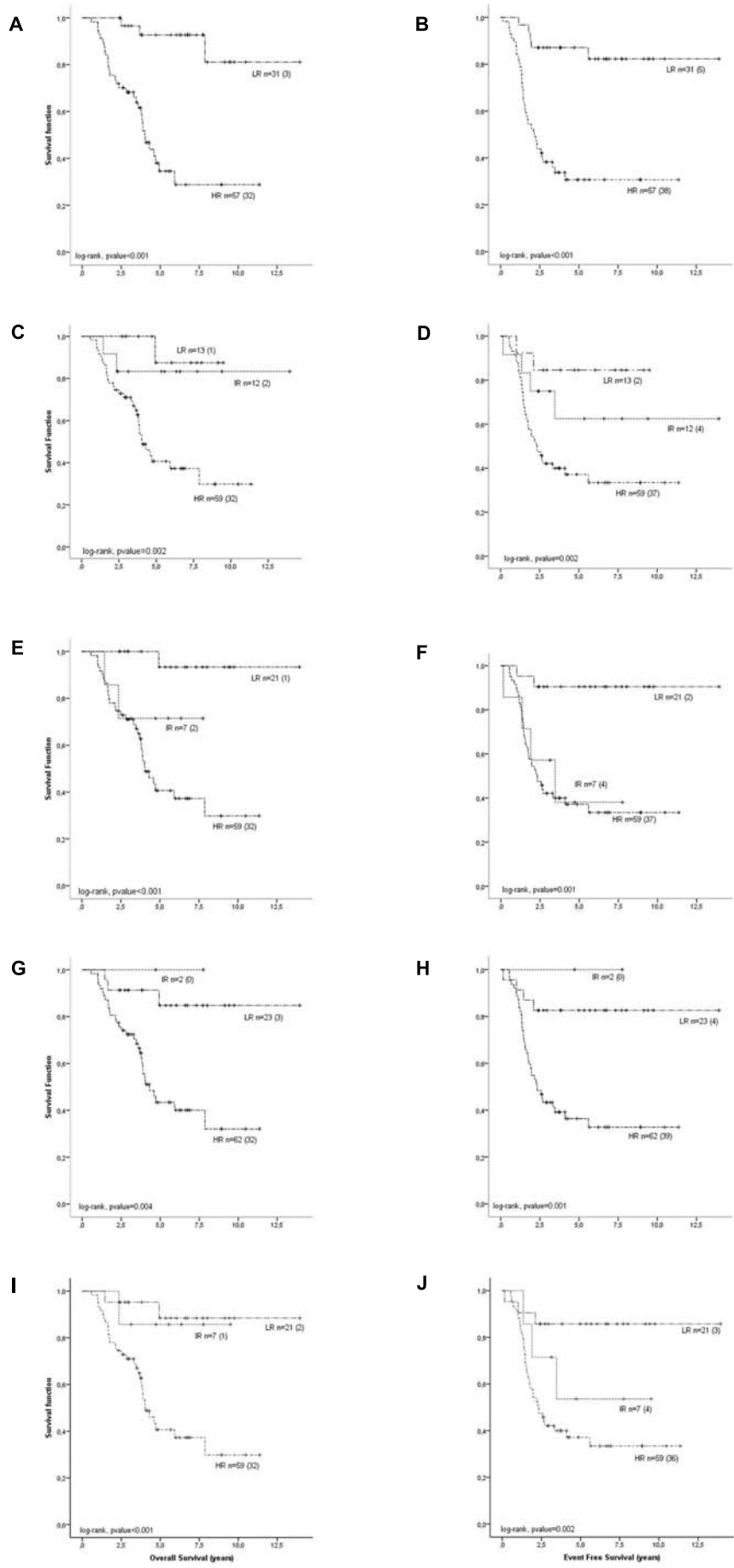
SUPPLEMENTARY FIGURE 1



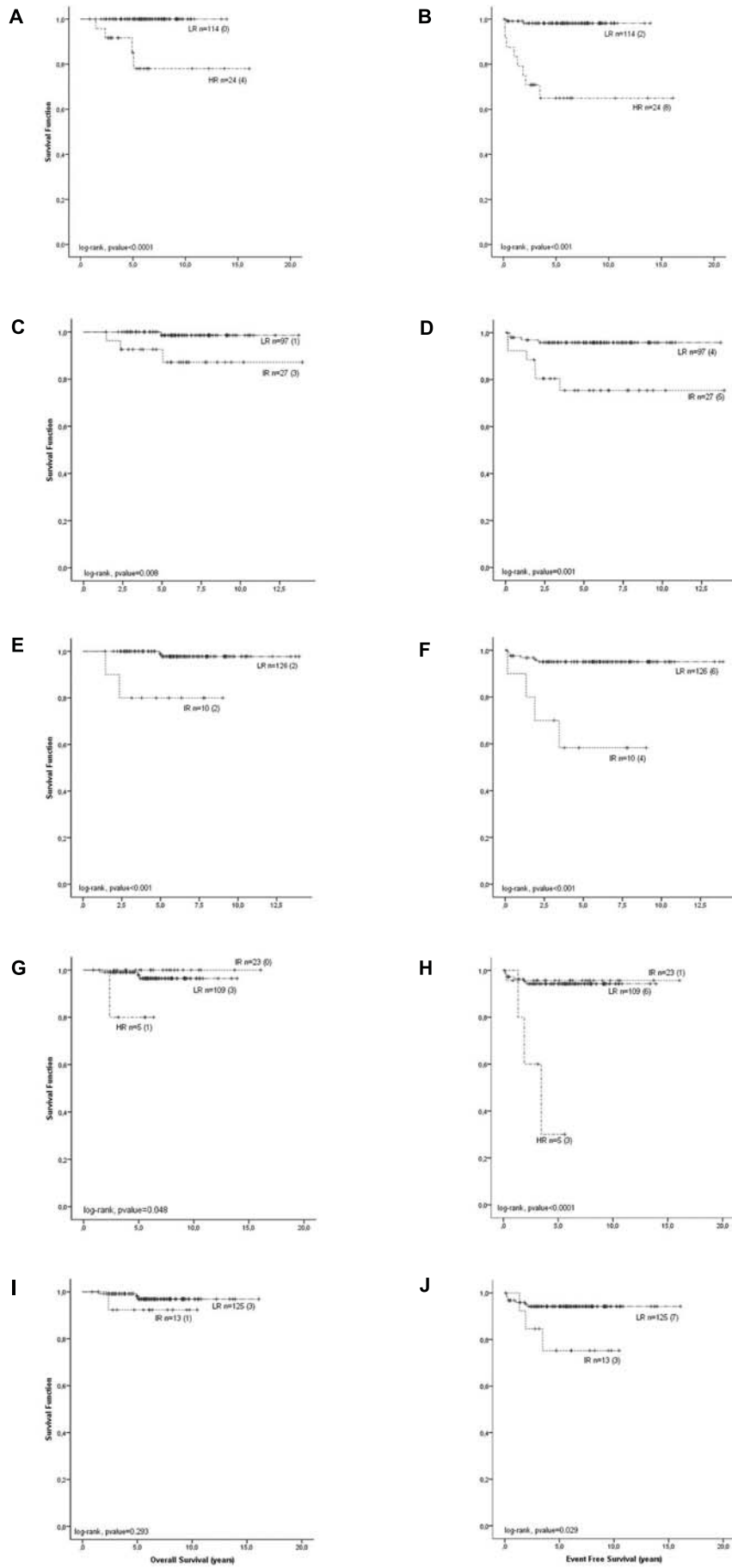
SUPPLEMENTARY FIGURE 2



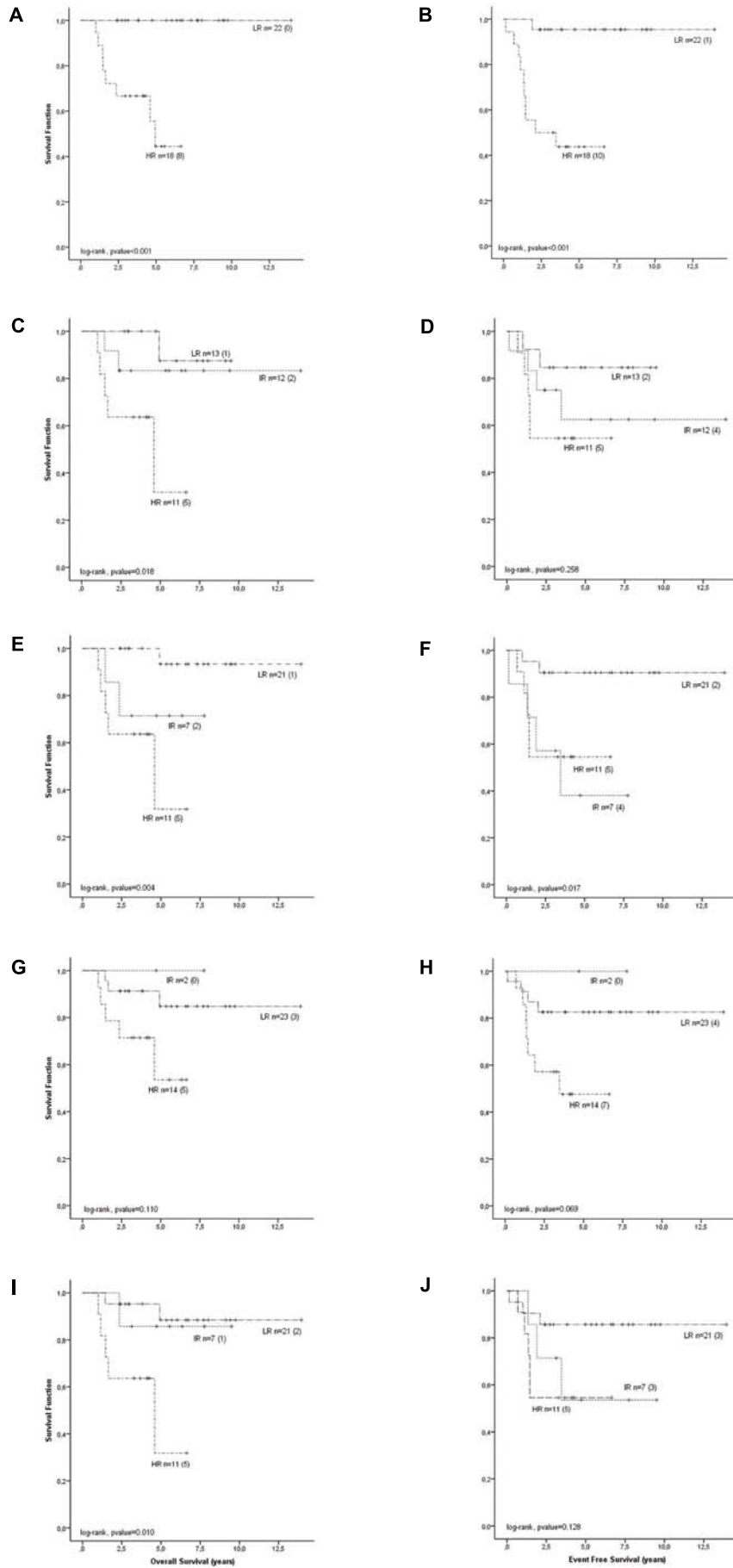
SUPPLEMENTARY FIGURE 3



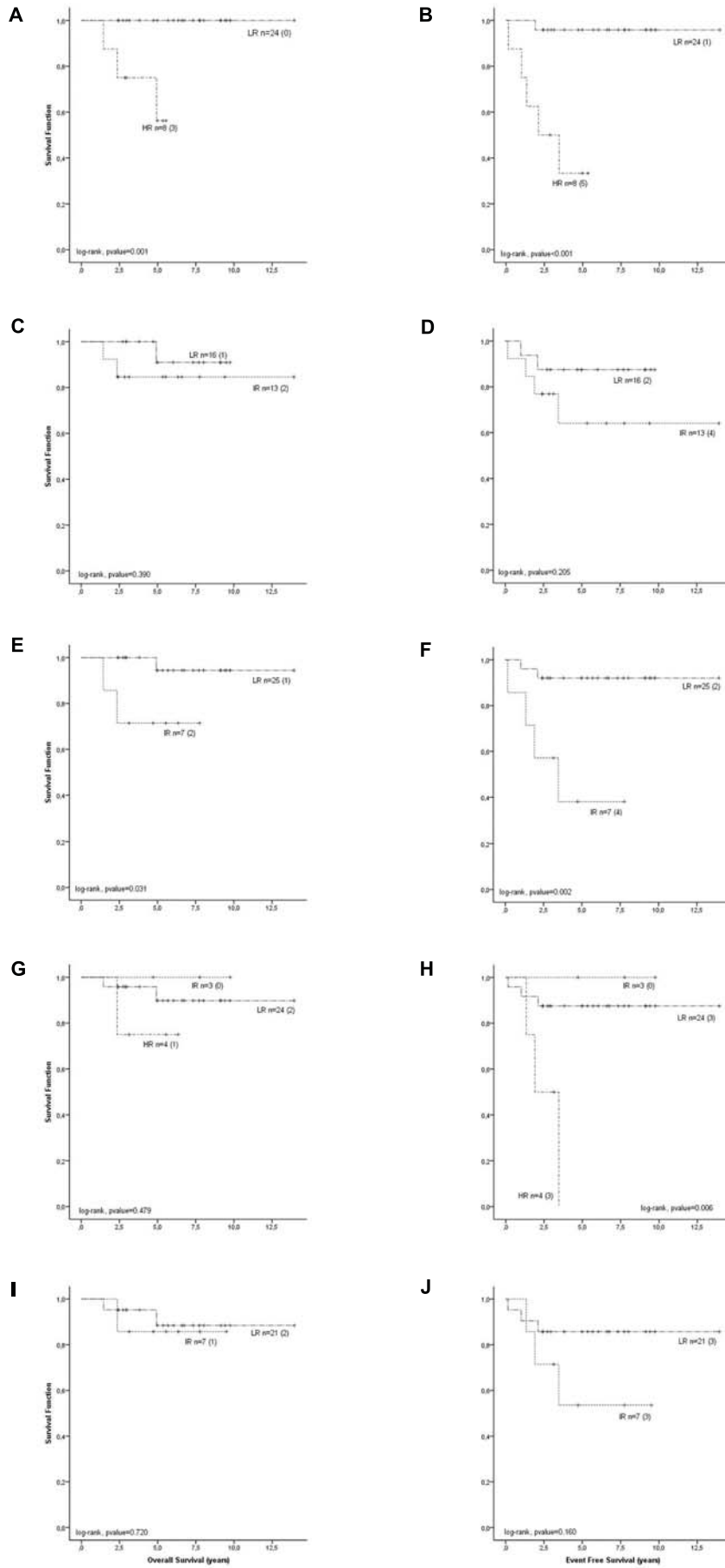
SUPPLEMENTARY FIGURE 4



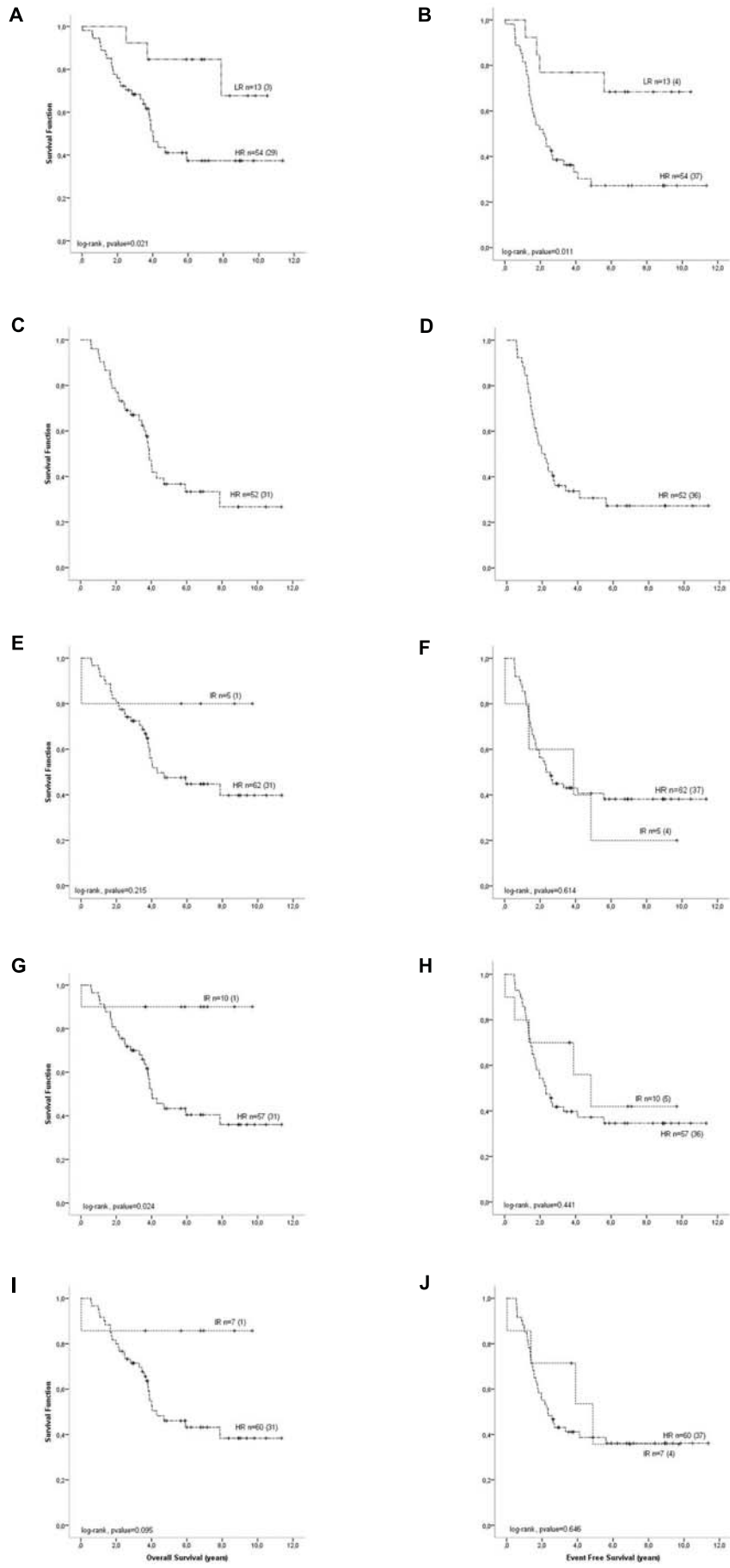
SUPPLEMENTARY FIGURE 5



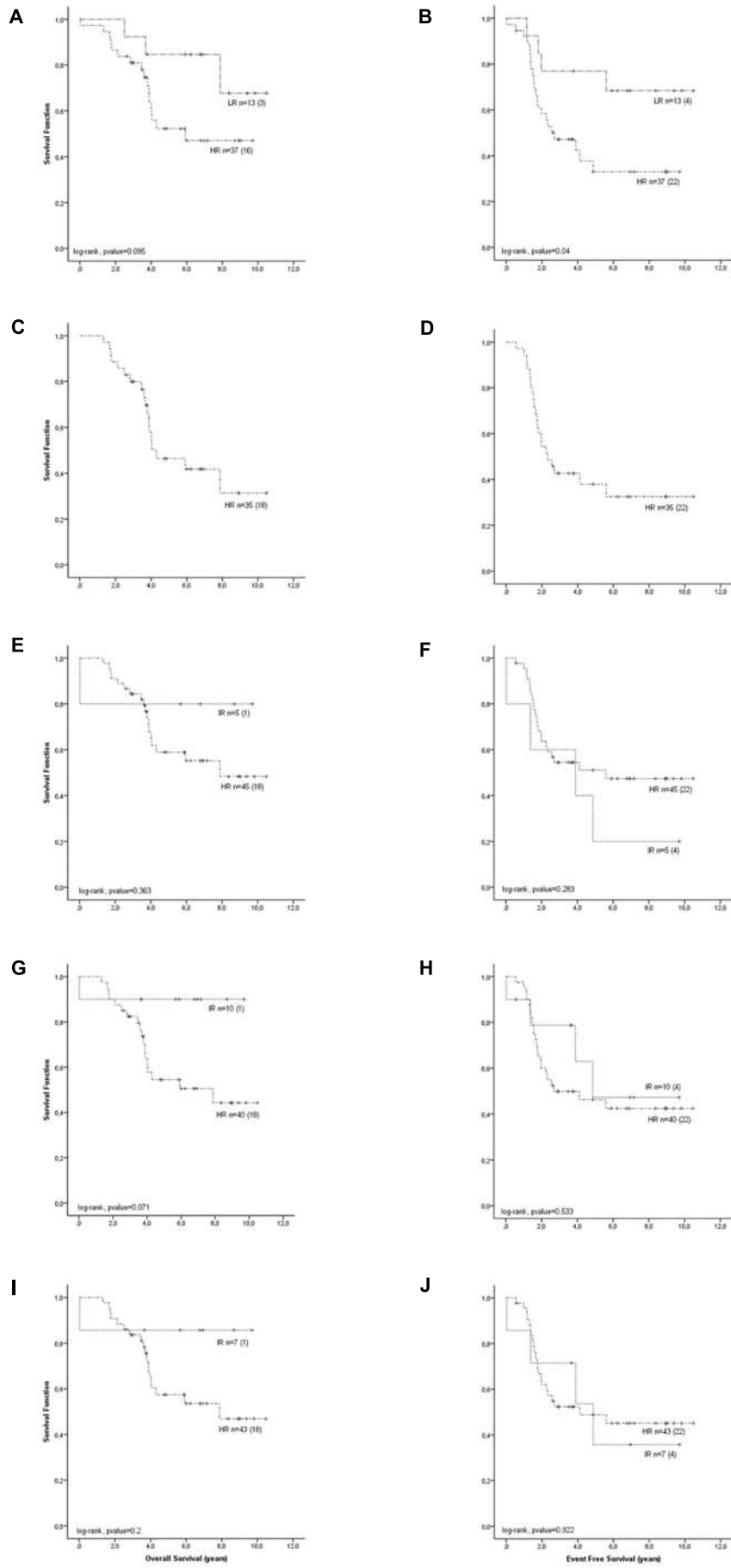
SUPPLEMENTARY FIGURE 6



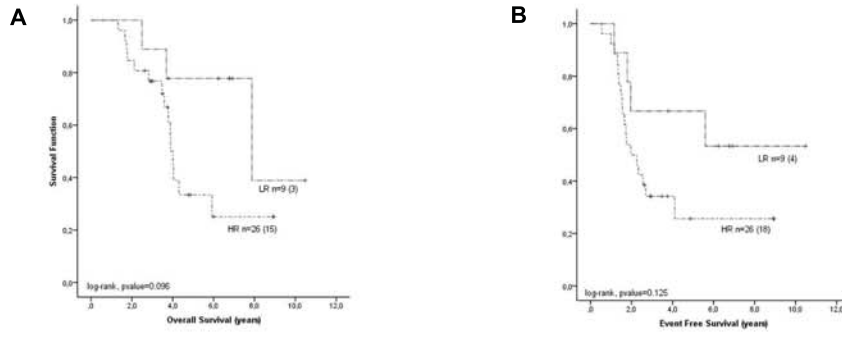
SUPPLEMENTARY FIGURE 7



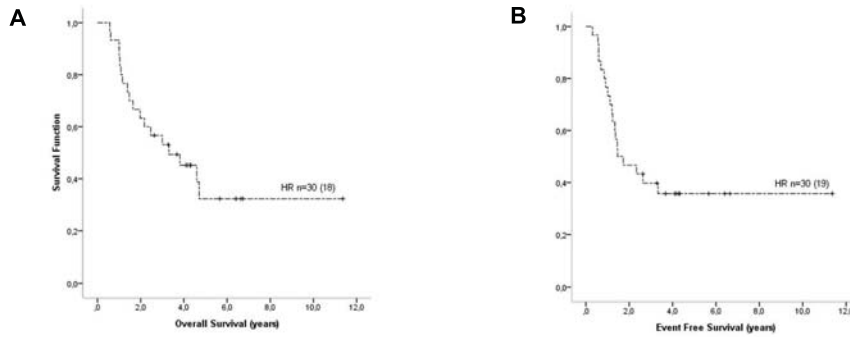
SUPPLEMENTARY FIGURE 8



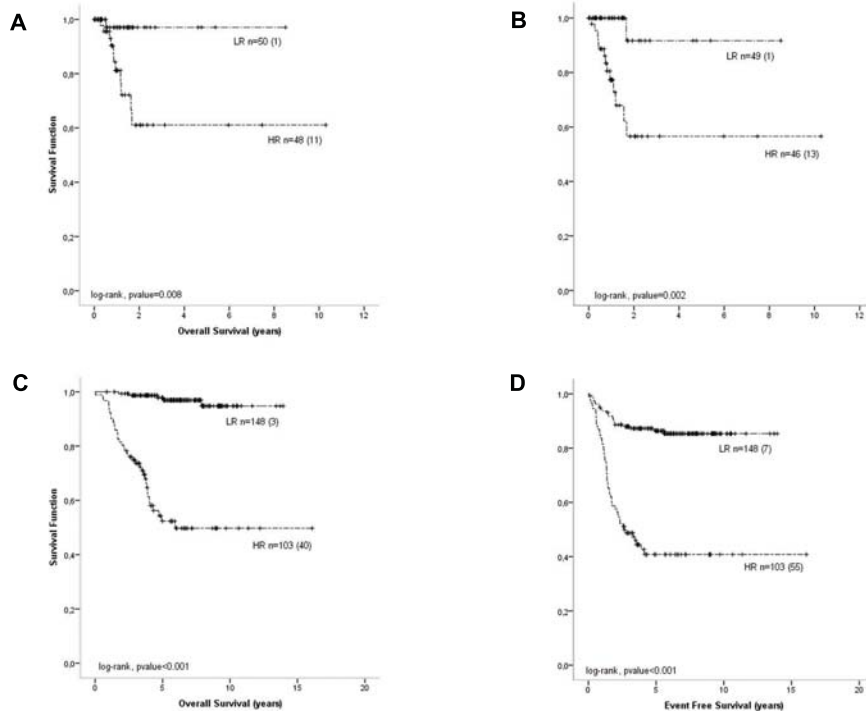
SUPPLEMENTARY FIGURE 9



SUPPLEMENTARY FIGURE 10



SUPPLEMENTARY FIGURE 11



2. La expresión de la proteína específica de neurona CHD5 es un marcador de pronóstico independiente en neuroblastoma.

Idoia Garcia, **Gemma Mayol**, Eva Rodríguez, Mariona Suñol, Timothy R Gershon, José Ríos, Nai-Kong V Cheung, Mark W Kieran, Rani E George, Antonio R Perez-Atayde, Carla Casala, Patricia Galván, Carmen de Torres, Jaume Mora y Cinzia Lavarino.

Publicado en la revista *Molecular Cancer* 2010; 9:277.
FI: 4.160, Q1.

Resumen

La pérdida del segmento distal del brazo corto del cromosoma 1, es una de las alteraciones cromosómicas más recurrentes en neuroblastomas (NB) de alto riesgo clínico, siendo la delección de la región 1p36 la pérdida más común. El gen *Chromodomain, helicase DNA binding protein 5 (CHD5)*, es un gen supresor de tumores localizado en la región cromosómica 1p36.31. La expresión génica de esta cromohelicasa dependiente de ATP, ha sido hallada recientemente en tejido neural, en glándula suprarrenal normal y en NB de bajo riesgo pero ausente en líneas celulares y NB de alto riesgo. En cambio, hasta el momento, el patrón de expresión proteica de CHD5 no ha sido investigado.

Los tumores neuroblásticos (TN) y el tejido neural están constituidos mayoritariamente por dos componentes celulares, células neuroblásticas y células estromales de tipo Schwann. Actualmente se desconoce el patrón de expresión de CHD5 en estas dos poblaciones celulares. En el presente estudio hemos realizando una caracterización inmunofenotípica de CHD5 tanto en tejido neural normal como en TN primarios (n=90) y NB post-tratamiento (n=12). Asimismo se ha investigado la potencial utilidad de la expresión de esta proteína como marcador inmunohistoquímico de pronóstico y como biomarcador de respuesta al tratamiento en NB.

En tejido normal, hemos identificado expresión nuclear de CHD5 en células de estirpe neuronal y ausencia de expresión en células gliales. En los TN, la expresión aparece circunscrita a células neuroblásticas en diferenciación y células ganglionares. Los neuroblastos indiferenciados y las células estromales de tipo Schwann son negativos. El patrón de inmunoreactividad de CHD5 ha mostrado una asociación estadísticamente significativa con las variables clínicas asociadas con pronóstico favorable en NB (edad al diagnóstico <12 meses, estadiaje clínico de bajo riesgo e histología favorable; $P < 0.001$ en todos los análisis) y, de la misma forma, con las variables clínicas supervivencia global (OS) y supervivencia libre de evento (EFS) ($P < 0.001$, en ambos casos). Análisis multivariantes demostraron que CHD5 es un factor pronóstico independiente de otros parámetros clínicos y biológicos relevantes en NB (estadiaje INSS, edad al diagnóstico, estado de amplificación de *MYCN* y estado de la región 1p). Estos resultados han sido validados utilizando una cohorte independiente de 32 NB primarios procedentes del Hospital de Niños y del Instituto del Cáncer Dana-Farber, de Boston. Los resultados (OS $P = 0.001$ y EFS $P = 0.001$) confirmaron la consistencia del patrón de expresión de esta proteína como marcador de pronóstico en NB.

Los NB indiferenciados pueden presentar maduración neuroblástica en respuesta a la quimioterapia. La expresión de CHD5, circunscrita a células de NB en diferenciación y a células ganglionares, y ausente en neuroblastos indiferenciados, sugiere una posible participación de CHD5 en los procesos de diferenciación neuroblástica. Todo ello nos ha llevado a investigar la expresión génica y proteica de CHD5 en muestras pareadas de NB pre y post-quimioterapia (n=12). Las muestras analizadas, NB clínicamente agresivos, mostraban al diagnóstico (pre-tratamiento) niveles de expresión muy bajos de CHD5. El análisis de la expresión en las muestras de NB post-tratamiento reveló que los tumores con evidencia de diferenciación neuroblástica (50%) presentaban reactivación de CHD5, tanto a nivel de expresión génica como de proteína. Cabe destacar que la reactivación de CHD5 post-tratamiento de inducción se asocia con una respuesta objetiva del tumor a la terapia citotóxica y con mayor OS del paciente.

En pacientes con NB la respuesta al tratamiento se evalúa mediante análisis bioquímicos, técnicas de imagen y examen histológico. Las limitaciones de sensibilidad y especificidad de estos procedimientos, plantean frecuentemente problemas en la interpretación de los resultados. Actualmente no se han descrito para NB biomarcadores de respuesta al tratamiento. La existencia de biomarcadores de predicción de respuesta terapéutica permitiría efectuar cambios en el tratamiento en el caso de tumores resistentes.

Nuestros resultados sugieren que el patrón de expresión de CHD5 podría representar un marcador inmunohistoquímico independiente de pronóstico para el NB así como un marcador subrogado del tratamiento, clínicamente útil para una identificación rápida (análisis inmunohistoquímico en biopsias tumorales) de pacientes que no se benefician del tratamiento convencional.

RESEARCH

Open Access

Expression of the neuron-specific protein CHD5 is an independent marker of outcome in neuroblastoma

Idoia Garcia¹, Gemma Mayol¹, Eva Rodríguez¹, Mariona Suñol², Timothy R Gershon³, José Ríos⁴, Nai-Kong V Cheung⁵, Mark W Kieran⁶, Rani E George⁶, Antonio R Perez-Atayde⁷, Carla Casala¹, Patricia Galván¹, Carmen de Torres¹, Jaume Mora^{1*}, Cinzia Lavarino^{1*}

Abstract

Background: The chromodomain, helicase DNA-binding protein 5 (CHD5) is a potential tumor suppressor gene located on chromosome 1p36, a region recurrently deleted in high risk neuroblastoma (NB). Previous data have shown that *CHD5* mRNA is present in normal neural tissues and in low risk NB, nevertheless, the distribution of CHD5 protein has not been explored. The aim of this study was to investigate CHD5 protein expression as an immunohistochemical marker of outcome in NB. With this purpose, CHD5 protein expression was analyzed in normal neural tissues and neuroblastic tumors (NTs). *CHD5* gene and protein expression was reexamined after induction chemotherapy in a subset of high risk tumors to identify potential changes reflecting tumor response.

Results: We provide evidence that CHD5 is a neuron-specific protein, absent in glial cells, with diverse expression amongst neuron types. Within NTs, CHD5 immunoreactivity was found restricted to differentiating neuroblasts and ganglion-like cells, and absent in undifferentiated neuroblasts and stromal Schwann cells. Correlation between protein and mRNA levels was found, suggesting transcriptional regulation of *CHD5*. An immunohistochemical analysis of 90 primary NTs highlighted a strong association of CHD5 expression with favorable prognostic variables (age at diagnosis <12 months, low clinical stage, and favorable histology; $P < 0.001$ for all), overall survival (OS) ($P < 0.001$) and event-free survival (EFS) ($P < 0.001$). Multivariate analysis showed that CHD5 prognostic value is independent of other clinical and biologically relevant parameters, and could therefore represent a marker of outcome in NB that can be tested by conventional immunohistochemistry. The prognostic value of CHD5 was confirmed in an independent, blinded set of 32 NB tumors ($P < 0.001$).

Reactivation of *CHD5* expression after induction chemotherapy was observed mainly in those high risk tumors with induced tumor cell differentiation features. Remarkably, these NB tumors showed good clinical response and prolonged patient survival.

Conclusions: The neuron-specific protein CHD5 may represent a marker of outcome in NB that can be tested by conventional immunohistochemistry. Re-establishment of CHD5 expression induced by chemotherapy could be a surrogate marker of treatment response.

* Correspondence: jmora@hsjdbcn.org; clavarino@fsjd.org

¹Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

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

Introduction

Neuroblastic tumors (NTs) are embryonal cancers arising from neural crest derived sympathetic nervous system precursors. These neoplasms are the most common extracranial solid tumors in childhood and account for approximately 15% of all pediatric oncology deaths [1].

Neuroblastoma (NB), the most undifferentiated form of NTs, embodies a heterogeneous spectrum of diseases whereby patients with similar clinicopathological features exhibit radically different outcomes ranging from spontaneous regression to inexorable progression. Since treatment strategies vary from a "watchful waiting" approach to multimodal intensive regimens, precise risk assessment is critical for therapeutic decisions. Various combinations of prognostic markers have been used with success for risk group distinction, including clinical, histologic and genetic factors, yet there remain cases where established indicators of aggressiveness have demonstrated limited clinical utility. Additional parameters are therefore needed for a more precise identification and therapeutic targeting of high risk NB patients.

There is an apparent link between NB aggressiveness and specific genetic aberrations. One of the most recurrent genetic alterations described is the deletion of the short arm of chromosome 1 found in approximately 35% of NB [2]. The high incidence of chromosome 1p deletion in human cancer [2], with 1p36 deletion being the most common alteration [3], has led to an extensive search for 1p36 tumor suppressor genes. Recent findings have identified the *CHD5* gene as a candidate tumor suppressor [4,5] mapping to the smallest region of deletion (SRD) described in NB, 1p36.31 [6]. Evidence supporting *CHD5* as a tumor suppressor is the recently reported strong promoter methylation and transcriptional silencing of the remaining allele in 1p deleted NB cell lines [5]. Nevertheless, low or absent *CHD5* expression levels have been found in NB cell lines lacking promoter methylation [7], 1p deletion, or inactivating mutations [6], suggesting other mechanisms by which *CHD5* expression may be inhibited.

CHD5 is one of the nine members of the chromodomain helicase DNA-binding (CHD) family of enzymes that belong to the ATP-dependent chromatin remodeling protein SNF2 superfamily [8]. CHD protein structure is characterized by two N-terminal chromodomains and a SNF2-like ATPase central domain that defines the chromodomain remodeling proteins [9,10]. The members of this evolutionarily conserved class of proteins play a critical role in organizing the chromatin structure and accordingly, in chromatin based transcriptional regulation of genes.

The aberrant expression of some of the CHD genes has been associated with human disease processes like CHARGE syndrome, Hodgkin's lymphoma or dermatomyositis [8]. *CHD5* mRNA expression, restricted to neuronal-derived tissues and the adrenal gland in normal tissues [10], is basically absent in NB primary tumors with high risk features, *MYCN* amplification, advanced stage and 1p monosomy [5].

The distribution of *CHD5* protein in NTs and normal neural tissues has not been explored. Like neural tissue, NTs consist of two main cell populations, neuroblastic cells and Schwann-like cells. The malignant potential of these tumors is inherently dependent on the proportion of immature neuroblastic cells and the abundance of Schwann cell stromal component, Schwannian stroma-poor undifferentiated NB being the most malignant. *CHD5* expression remains to be investigated in these two cell populations. In the present study, we analyzed by immunohistochemistry normal neural derived tissues and NTs to visualize *CHD5* protein distribution within the different cell populations. Because impaired *CHD5* expression is associated with high risk NB tumors, we asked whether *CHD5* protein expression might serve as an immunohistochemical marker of outcome in NB. It is known that gene expression pattern can change with treatment, for this reason, *CHD5* gene and protein expression was re-examined after induction treatment in a set of paired cases.

Material and Methods

Patients and tumor samples

A total of 90 primary tumor specimens (63 NB, 14 ganglioneuroblastomas (GNB) and 13 ganglioneuromas (GN)) (Additional file 1) were obtained at diagnosis from two institutions (Hospital Sant Joan de Déu (HSJD) of Barcelona and Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) of New York) together with 12 high risk NB cases with available paired diagnostic and post-chemotherapy tumor specimens. An independent set of 32 NB tumors was obtained from Children's Hospital of Boston and Dana-Farber Cancer Institute (CHB/DFCI) for data validation analysis. Non-tumor samples (fetal brain, adult cerebral cortex, adult cerebellum, adrenal gland, bone marrow, spinal cord and sympathetic ganglion) were also included in this study.

NB risk assessment was defined by the International Neuroblastoma Staging System (INSS) [11]. NB stages 1, 2, 3 (*MYCN* non-amplified) and 4s were uniformly treated without use of cytotoxic therapy, when possible. Stage 4 and stage 3 *MYCN* amplified NB patients were treated according to N5, N6 or N7 protocols. This study was approved by the Institutional Review Boards and informed consent was obtained before collection of samples.

Tumors were assessed by a pathologist (M.S.), only tumors with >70% viable tumor cell content were included in the study.

Seven NB cell lines (LA-N-1, SKNSH-SY5Y, SK-N-Be (2)C, SKNSH-EP1, SK-N-JD, SK-N-LP and SK-N-AS) were used in this study. NB cell lines were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (GIBCO, Invitrogen, US) at 37°C in 5% CO₂ atmosphere.

In vivo study

NB cell lines SK-N-JD, SK-N-LP and SK-N-AS were harvested and resuspended in phosphate buffered saline (PBS) solution and BD Matrigel Basement Membrane Matrix (BD Biosciences, US). One hundred microliters of cell suspension containing 8×10^6 cells were subcutaneously inoculated into the right flank of six-week old CD-1 Nude (nu/nu) mice (Charles River Laboratories, Europe). Mice were killed when NB cell lines developed tumors that exceeded 1.5 cm³. Tumors were removed surgically, fixed in 10% formalin and embedded in paraffin for histological examination.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical (IHC) analysis was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues using rabbit-polyclonal anti-CHD5 antibody (Strategic Diagnostics, DE) at a 1:1000 dilution for 1 hour; mouse-polyclonal anti-Neurofilament protein, 68kD (NF68) antibody (Zymed, US) 1:300 dilution, 1 hour and mouse-polyclonal anti-Glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (Novocastra, UK) 1:200 dilution, 2 min. Two different anti-CHD5 antibody batches (T00251-A1 and T00251-A02, Strategic Diagnostics, DE) have been tested in this study. Normal human brain was used as positive control.

Slides were examined by a pathologist (M.S.) using an Olympus BX41 light microscopy to assess staining and score both percentage of positive cells and staining intensity (0, negative; 1, weak; 2, strong and 3, very intense staining). Integer values were assigned to the proportion of positive cells (<25% = 1; 25-75 = 2; >75% = 3). Intensity and positive cell values were multiplied to provide a single score for each case.

Double fluorescent immunostaining: Paraformaldehyde (4%, pH 7.4) fixed cryosections, blocked with bovine serum albumin (BSA) 1% for 1 hour, were incubated overnight at 4°C with a rabbit-polyclonal anti-CHD5 antibody (H-185) (Santa Cruz, US) at 1:1000 dilution, followed by anti-rabbit IgG Cy3-conjugated antibody, (Sigma, US) 1:400 dilution for 45 min. Sections were subsequently incubated with anti-NF68 antibody (1:300 dilution) 1 hour or anti-GFAP antibody (1:200 dilution)

2 min, and stained with anti-mouse IgG FITC-conjugated antibody (Sigma, US) 1:700 dilution, 45 min. Nuclei were counterstained with 4'6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma, US), 1:5000 dilution, 5 min.

Paraformaldehyde fixed bone marrow aggregates were incubated with anti-GD2 antibody (BD Biosciences, US) 1:800 dilution 1 hour and stained with anti-mouse IgG-FITC antibody at 1:700 dilution, 45 min, or with anti-CHD5 antibody as described above.

Immunoreactivity was evaluated with a Leica epifluorescence DM5000B microscope (Leica Microsystems, US).

Western blot analysis

Proteins were extracted from cell lines and homogenized tissue in lysis buffer (20 mM Tris pH 8.8, 80 mM NaCl, 1% NP-40 and protease inhibitors). Protein concentrations were quantified using the Bradford method (Bio-Rad laboratories, US) and 30 µg of protein were resolved on an 8% SDS-PAGE. Membranes were incubated with polyclonal anti-CHD5 antibody (1:2000; Strategic Diagnostics, DE) and monoclonal anti β-actin antibody (1:5000; Sigma, US) and detected with donkey anti-rabbit IgG HRP-conjugated antibody (1:2500; Affinity BioReagents, Inc., US) and goat anti-mouse IgG HRP-conjugated antibody (1:5000; Sigma, US) respectively. Antibody conjugates were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Life Science, US).

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from snap frozen samples and cell lines using Tri Reagent (Sigma, US), following manufacturers' protocols. cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using random primers and M-MLV reverse transcriptase (Promega, US) as previously described [12].

Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Quantification of transcript levels, using the $\Delta\Delta C_T$ relative quantification method, were performed on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System with TaqMan[®] Assay-on-Demand Gene Expression products (Applied Biosystems, US), as previously reported [12].

Statistical analysis

Comparisons between immunohistochemical results were performed by means of the log-rank test. qRT-PCR transcript levels were normalized by z-score transformation to enable a correlation analysis with the immunostaining score values. Correspondence between immunoreactivity and mRNA expression levels within the same samples was examined using the Spearman's correlation coefficient analysis. Statistical analyses for qualitative variables were performed by means of the

Fisher's exact test and U Mann-Whitney test for quantitative or ordinal variables. Overall survival (OS) and event-free survival (EFS) probabilities were estimated using the Kaplan-Meier method. Multivariate Cox regression models were used to examine the prognostic significance of CHD5, INSS stage, age at diagnosis, *MYCN* status and 1p LOH. Each variable consisted of two groups: "INSS stage" consisted of: (1) ST1, 2, 3 and 4s, and (2) ST4; "age" (at diagnosis): (1) ≤ 12 months (2) > 12 months; "*MYCN*": (1) *MYCN* non-amplified (2) *MYCN* amplified; "LOH": (1) no LOH (2) LOH. Predictive Positive and Negative Values (PPV and NPV) were used for a descriptive comparison between CHD5 expression and *MYCN* and 1p LOH. All reported P-values are two-sided. P-values ≤ 0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed with SPSS 15.0 package (SPSS, Chicago, IL).

Results

CHD5 protein expression in normal neural tissues is restricted to neuronal cells

In normal human neural tissue sections (brain cortex, cerebellum, spinal cord and sympathetic ganglion), CHD5 immunoreactivity was found restricted to neurons, whereas glial cells were consistently negative (Figure 1A, C, D and 1E). CHD5 expression pattern was confirmed by immunostaining with neuronal (NF68) and glial (GFAP) cell markers. Frozen brain sections analyzed by double immunofluorescence showed colocalization of CHD5 and NF68 in neurons. No CHD5 protein expression was observed in GFAP positive glial cells (Figure 1G and 1H).

Intensity and intracellular localization of CHD5 staining in the cerebral cortex varied among neuron types but did not exhibit a layer-related expression (Figure 1A). Nuclear labeling was intense in morphologically small neurons with scarce cytoplasm present in all cortical layers identified by size and location as interneurons. Larger neurons with triangular shaped soma, including pyramidal neurons present in cortical layers III, IV and V, exhibited essentially negative or lower intensity of nuclear staining and diffuse cytoplasm reactivity (Figure 1A). In the cerebellum, Purkinje cells and deep nuclei neurons exhibited intense nuclear and diffuse cytoplasm staining. Cerebellar granular layer neurons lacked immunoreactivity (Figure 1C).

Spinal cord specimens were characterized by intense positive neuron processes, predominantly located in the external white matter, and large motoneuron cell bodies with positive cytoplasm and mostly negative nuclear staining (Figure 1D). All glial cells, including the ependymal cells lining the central canal of the spinal cord, were negative for CHD5 expression (Figure 1D*). In the sympathetic ganglia, neuron cell bodies showed intense

nuclear and diffuse cytoplasm reactivity, while the stromal cell component was found negative for CHD5 (Figure 1E).

Adrenal gland specimens exhibited weak CHD5 expression, mainly in the nucleus of the medullary cells. Neuroblastic aggregates found in fetal adrenal glands (19-20 weeks) were essentially negative, although few intermixed positive cells were identified in larger neuroblastic islets (Figure 1F).

CHD5 expression was evaluated in brain cortex specimens and in NB cell lines by immunoblot analysis. CHD5 protein (250-260 kDa) was detected only in brain cortex specimens, both in the total protein extract and in the nuclear fraction. No CHD5 protein was detected in the cytoplasmic fraction of all the analyzed specimens or in NB cell lines (Figure 1B).

These results identify CHD5 as a neuron-specific protein, absent in glial cells, with a diverse expression pattern amongst neuron types. Human immature neuroblastic aggregates in the developing adrenal gland are mostly negative for CHD5.

CHD5 protein is expressed in the neuroblastic component of low clinical risk NTs

CHD5 immuno-localization was investigated in a total of 90 primary NTs (63 NB including 24 stage 4, 8 stage 4s and 31 loco-regional NB; 14 GNB and 13 GN) (Table 1).

Stage 4 NB cases, all histologically undifferentiated high risk NB, appeared predominantly (20/24) negative or with $< 25\%$ neuroblastic cells with faint CHD5 nuclear reactivity (Figure 2A and 2E; Table 1, Additional file 1). Only 3/24 undifferentiated NB tumors exhibited weak nuclear reactivity in 25-75% of cells, and one had intense nuclear staining in $> 75\%$ of tumor cells. In contrast, stage 4s NB, histologically undifferentiated low risk tumors, showed consistently (8/8) very intense CHD5 nuclear positivity in $> 75\%$, generally $> 90\%$ of the neuroblasts (Figure 2F, Table 1, Additional file 1). This clinically low risk NB is, nevertheless, a highly proliferative metastatic tumor. Thus, for 2 stage 4s NB tumors, CHD5 expression was also evaluated in the liver and bone marrow metastases. Intense CHD5 immunopositivity, equivalent to the primary tumor, was observed in $> 75\%$ neuroblasts disseminated in the liver. Intriguingly, bone marrow neuroblastic aggregates, identified using an antibody against the ganglioside GD2 ubiquitously expressed in NB (data not shown), lacked CHD5 immunoreactivity (Figure 2H), similar to stage 4 bone marrow smears (Figure 2G).

Loco-regional tumors (stage 1, 2, and 3) displayed more heterogeneous expression patterns (Figure 2B and 2C; Additional file 1), with staining values being highest in differentiating NB, where intense nuclear staining was

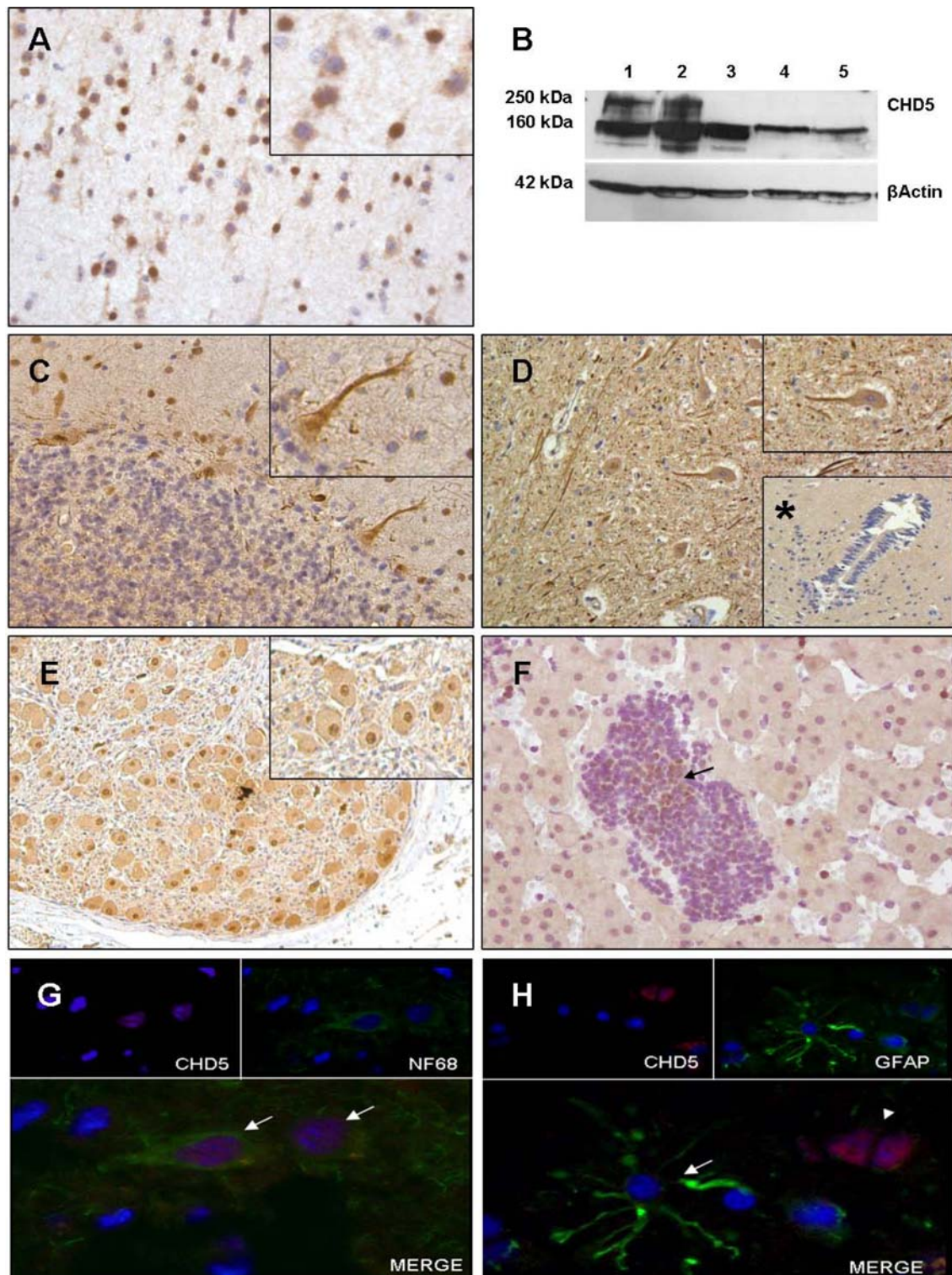


Figure 1 CHD5 protein expression in normal human neural tissues. CHD5 immunostaining in **(A)** normal neural tissue, cerebral cortex (100x), box: pyramidal and interneuron CHD5 staining (400x); **(B)** expression of CHD5 protein detected by immunoblotting in (1) brain cortex total protein, (2) brain cortex nuclear protein fraction, (3) brain cortex cytoplasmic fraction, (4) LA-N-1 NB cell line total protein and (5) LA-N-1 nuclear fraction; CHD5 predicted molecular weight of 250-260 kDa is based on the amino acid composition (ref. 5); all analyzed samples displayed a 150-160 kDa size band, not yet characterized; **(C)** Cerebellum (100x), box: Purkinje cell CHD5 staining (400x); **(D)** Spinal cord (100x), box: Motoneuron CHD5 staining (400x), box*: ependymal cells lining canal spinal cord (100x); **(E)** Sympathetic ganglia (100x), box: Ganglion cell CHD5 staining (400x); **(F)** immature neuroblast aggregates within fetal adrenal gland (200x), (arrow) CHD5 immunopositive neuroblasts; **(G-H)** double fluorescent immunostaining, (G, arrow) NF68⁺/CHD5⁺ neuron; (H, arrow) GFAP⁺/CHD5⁻ astrocyte, (H, arrow head) GFAP⁺/CHD5⁺ neuron.

Table 1 CHD5 immunostaining in Neuroblastic tumors

	n	Percentage of CHD5 immunopositive neuroblastic cells		
		<25%	25-75%	>75%
St 1,2,3	31	10/31 (32.2%)	9/31 (29%)	12/31 (38.7%)
St 4	24	19/24 (79.1%)	4/24 (16.6%)	1/24 (4.1%)
St 4s	8	–	–	8/8 (100%)
GNB	14	14/14* (100%)	–	14/14** (100%)
GN	13	–	–	13/13 (100%)
Total	90	29	13	48

Percentage of CHD5 positive (nuclear staining) tumor cells within each neuroblastic tumor group evaluated using predetermined cutoff values (<25%; 25-75%; >75%). Detailed data regarding percentage of positive tumor cells and staining intensity are reported in Additional file 1. For GNB tumors, the undifferentiated neuroblastic (*) and the ganglionic (**) cell populations were scored separately. GNB = ganglioneuroblastoma, GN = Ganglioneuroma.

observed in >75% of neuroblastic cells (13/32) (Figure 2B; Additional file 1), and lowest in stage 3 *MYCN* amplified NB composed mainly of undifferentiated neuroblasts with undetectable immunoreactivity, similar to stage 4 NB cases (Figure 2C, Table 1, Additional file 1).

GNB (14/14) and GN (13/13) tumors exhibited ganglion-like cells with intense nuclear and diffuse cytoplasmic staining. Absence of nuclear staining and feeble cytoplasmic reactivity was observed in Schwann-like cells (Figure 2D; Additional file 1). The undifferentiated neuroblastic component of GNB lacked CHD5 staining (Table 1, Additional file 1).

The described immunohistochemical assays were performed using two different batches of the anti-CHD5 antibody (T00251-A1 and T00251-A02). Both batches performed consistently across many repeats, further supporting the validity of our results (Additional file 2A). The specificity of the anti-CHD5 antibody was further validated on mouse xenografts of human NB cell lines (SK-N-JD, SK-N-LP and SK-N-AS). All the xenografts were found to be negative for CHD5 staining (Additional file 2B).

Altogether, CHD5 protein was expressed in the nucleus of neuroblastic cells of clinical low risk NTs. In stage 4s NB, CHD5 negative neuroblast bone marrow metastasis imply the existence of intratumoral clones with CHD5 differential expression in an otherwise histologically homogeneous tumor subtype.

CHD5 transcript levels are associated with protein expression

CHD5 protein expression was contrasted with gene transcript levels. Quantification of *CHD5* mRNA in non-tumoral frozen tissue samples using qRT-PCR identified high expression in fetal brain and adult cerebral cortex, as reported previously [10]. Normal bone marrow specimens lacked *CHD5* expression.

CHD5 mRNA levels were analyzed for 84 primary NTs obtained at diagnosis (23 stage 4; 7 stage 4s; 34 loco-regional NB; 9 GNB and 11 GN); 55 of these tumors were also analyzed by immunohistochemistry.

High risk undifferentiated NB tumors, stage 4 and stage 3 *MYCN*-amplified NB displayed significantly lower mRNA expression levels than stage 1, 2, 3 ($P < 0.001$) and stage 4s NB ($P = 0.001$) (Additional file 3). The highest mean expression values, similar to normal fetal brain, were found for stage 4s NB. GN specimens displayed consistently low *CHD5* transcript levels, whereas, GNB tumors were characterized by highly variable expression attributable to the presence of *CHD5* negative component, Schwann-like stroma and undifferentiated neuroblasts, besides the positive ganglion-like cells that compose these tumors.

Correlation between CHD5 immunoreactivity and mRNA expression levels within the same samples was examined in a set of 34 consecutive NB tumors. Immunohistochemical and qRT-PCR analyses were carried out on the same portion of the tumor specimen, with similar cell composition and a high tumor cell content (>70% as recommended for PCR studies). CHD5 nuclear immunoreactivity was assigned a staining score (Additional file 1) and gene expression values were z-score transformed. A significant correlation was observed between mRNA and protein levels (Spearman's rho = 0.774; $P < 0.001$), low CHD5 protein scores were consistently associated with low mRNA levels (negative z-score values), and high IHC scores with high mRNA expression (positive z-score values) (Additional file 4). Interestingly, very intense nuclear staining displayed by low risk tumors, mostly stage 4s and infant stage 1 NB, was not associated with the highest transcript levels (Additional file 4, cases # 1-6, 30, 31 and 33).

These results reveal a correspondence between CHD5 protein and mRNA expression, suggesting a potential regulation of *CHD5* expression at the transcriptional level.

CHD5 protein expression is associated with patient outcome in NB

CHD5 nuclear immunoreactivity was assigned a staining score (Additional file 1) and compared to clinical and biological variables currently used for NB risk classification. High CHD5 staining values were found to be significantly associated with INSS stages 1, 2, 3 (*MYCN* non-amplified) and 4s NB ($n = 63$), age at diagnosis <12 m ($n = 63$) and favorable tumor histology ($n = 63$); $P < 0.001$ for all the tested variables.

To assess whether CHD5 expression was associated with patient outcome, immunoreactivity scores were compared to overall survival (OS) and event-free survival (EFS) for all 63 NB tumors. The median score value

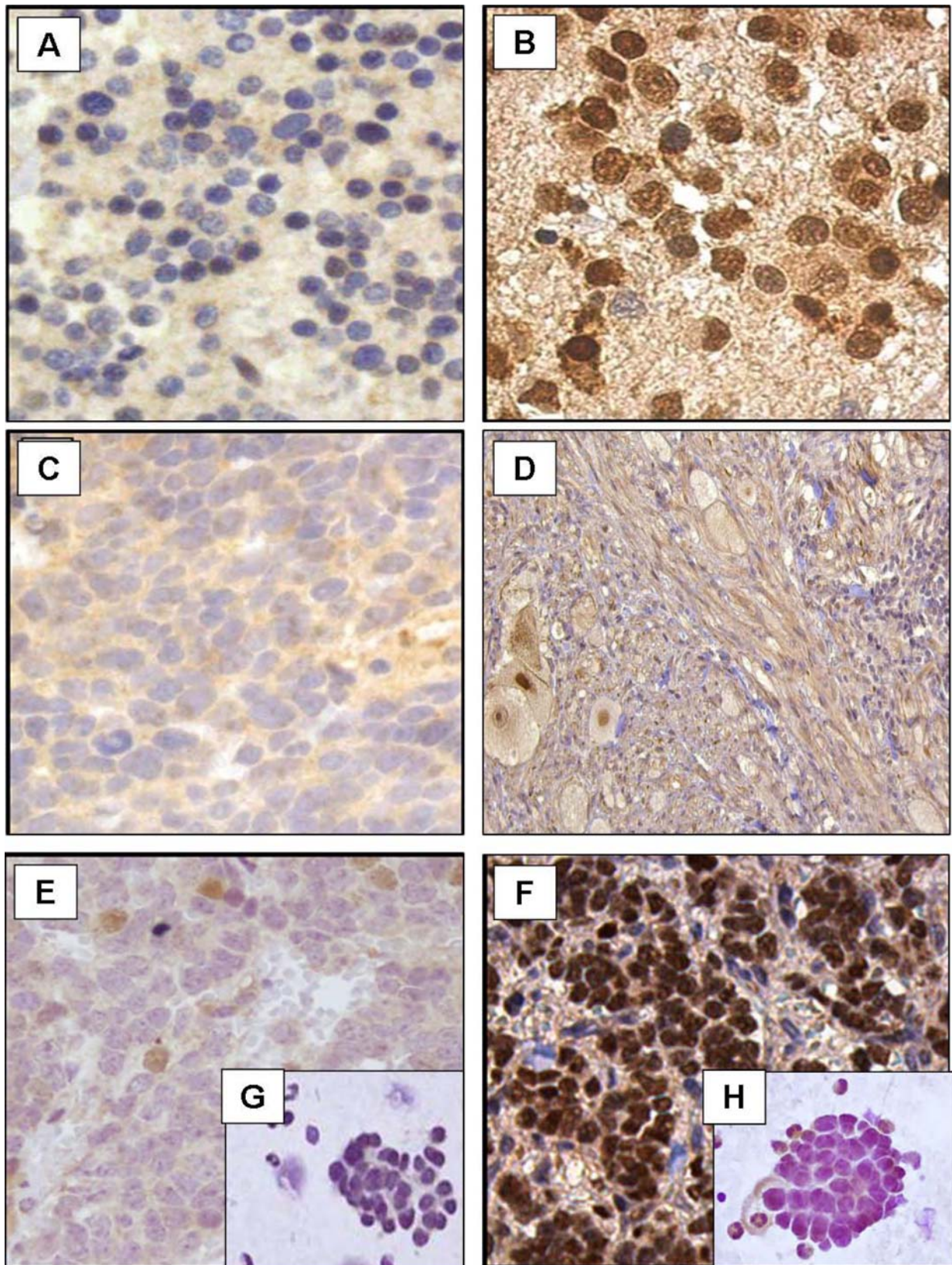
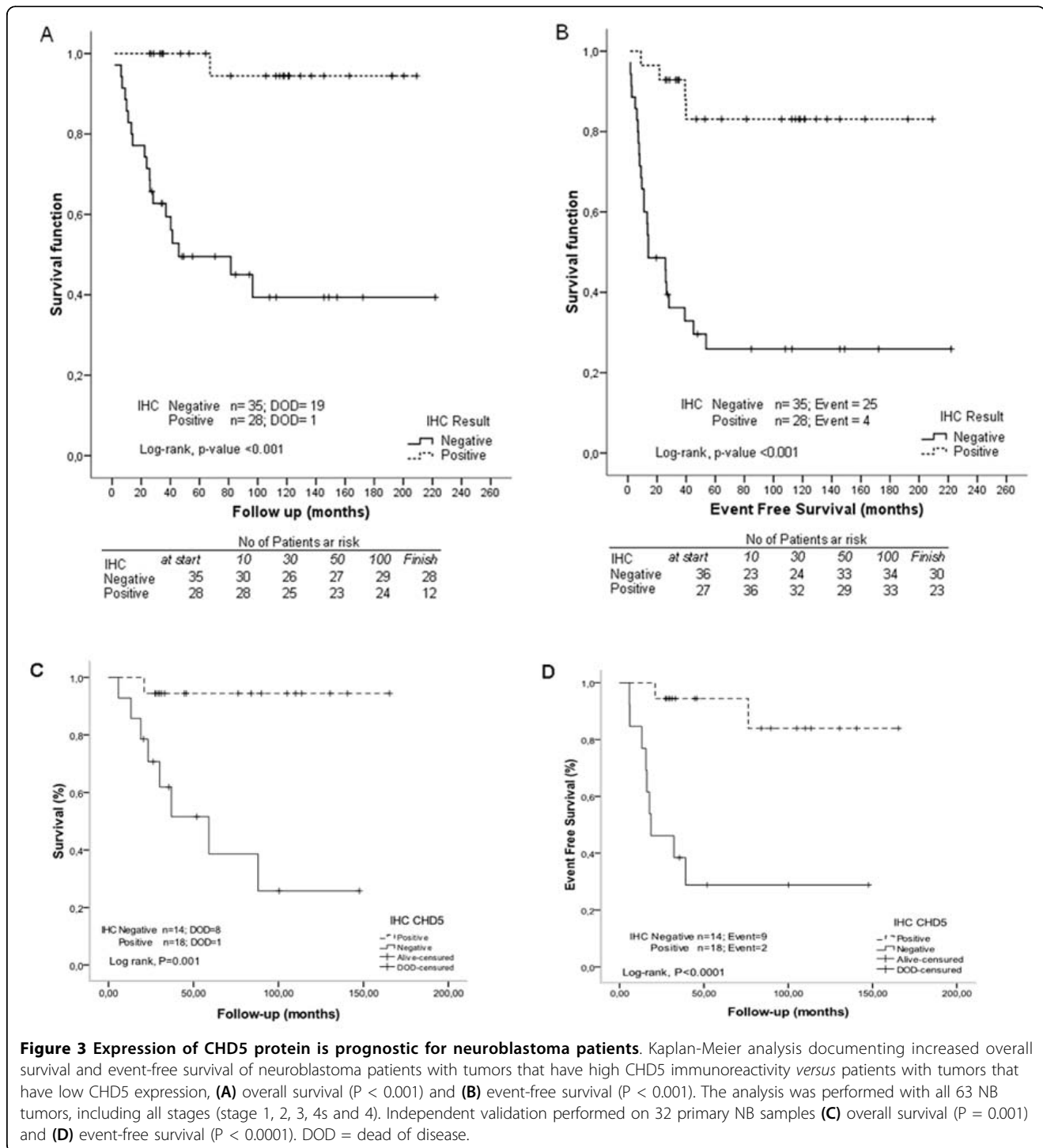


Figure 2 CHD5 protein expression in neuroblastic tumors. CHD5 immunostaining in (A) stage 4 undifferentiated NB (400x); (B) loco-regional differentiating NB (400x); (C) stage 3, *MYCN* amplified, undifferentiated NB (400x); (D) Ganglioneuroblastoma (100x); (E) stage 4 (200x) and (F) stage 4s primary tumor (200x) with bone marrow neuroblast aggregates (G-H), respectively (400x).



was used as a cut-off to define high (>2) and low (≤ 2) CHD5 expressing NB tumors. High CHD5 expression was found to be significantly associated with a better OS (log-rank test $P < 0.001$) and EFS (log-rank test $P < 0.001$) (Figure 3A and 3B). Furthermore, using this cut-off, Cox multivariate analysis showed that expression of CHD5 protein predicted OS and EFS independently of INSS stage, patient age, amplification of *MYCN* and 1p

LOH (Table 2; Additional file 5). Specifically, CHD5 IHC was the only variable that remained statistically significantly associated with event-free survival in both the univariate and multivariate analyses (Table 2; Additional file 5). CHD5 IHC remained statistically significantly associated with overall survival, except when 1p LOH was included in the multivariate analysis, owing to the strong association of *CHD5* expression with

Table 2 Cox regression analysis

Overall Survival						
Variable	HR and 95%CI	p-value	Variable	HR and 95%CI	p-value	Interaction p-value ^{&}
CHD5 IHC	21.28 (2.84-159.39)	0.003				
			CHD5 IHC	18.67 (2.27-153.88)	0.007	0.951
INSS	4.15 (1.63-10.58)	0.003	INSS	1.24 (0.46-3.29)	0.673	
			CHD5 IHC	15.17 (1.89-121.73)	0.011	0.931
Age (>12 m)	5.56 (1.61-19.19)	0.007	Age (>12 m)	2.14 (0.59-7.75)	0.249	
			CHD5 IHC	12.29 (1.56-96.49)	0.017	0.952
MYCN (*)	14.27 (4.28-47.58)	< 0.001	MYCN(*)	8.08 (2.43-26.93)	0.001	
			CHD5 IHC	14.33 (1.84-111.48)	0.011	0.946
LOH(**)	2.88 (1.04-7.96)	0.042	LOH(**)	1.75 (0.63-4.89)	0.287	
Event Free Survival						
Variable	HR and 95%CI	p-value	Variable	HR and 95%CI	p-value	Interaction p-value ^{&}
CHD5 IHC	8.14 (2.82-23.5)	<0.001				
			CHD5 IHC	7.01 (2.09 to 23.51)	0.002	0.939
INSS	3.7 (1.73-7.88)	0.001	INSS	1.26 (0.53 to 2.97)	0.605	
			CHD5 IHC	7.04 (2.24 to 22.09)	0.001	0.638
Age (>12 m)	3.13 (1.33-7.39)	0.009	Age (>12 m)	1.36 (0.54 to 3.44)	0.515	
			CHD5 IHC	5.97 (1.98 to 17.98)	0.001	0.933
MYCN (*)	4.58 (1.84-11.42)	0.001	MYCN	2.72 (1.07 to 6.88)	0.035	
			CHD5 IHC	6.02 (1.98 to 18.34)	0.002	0.492
LOH(**)	2.12 (0.92-4.91)	0.079	LOH	1.24 (0.52 to 2.95)	0.622	

Cox regression analysis of the NB cohort using CHD5 protein expression and clinical and biologically relevant variables (INSS stage, patient age at diagnosis, MYCN amplification status and chromosome 1p LOH). Expression of CHD5 was statistically significantly associated with overall survival and event-free survival in both the univariate and multivariate analyses. All NB patients (n = 63) were included in the study except for the studies with MYCN amplification (n = 58) and 1p LOH (n = 53), due to the undetermined status in some patients. IHC = Immunohistochemical analysis; INSS = International Neuroblastoma Staging System; HR = hazard ratio; CI = confidence interval. P-values are two sided. ([&]) Interaction P-values obtained from Cox regression model: IHC + Co-factor+IHC*Co-factor. (*) data available for 58 patients; (**) data available for 53 patients.

chromosome 1p status (Table 2; Additional file 5). The Predictive Value of CHD5 staining was evaluated and compared to MYCN and 1p LOH (Table 3). CHD5 expression showed the highest Negative Predictive Value (NPV) for overall survival status (96.4%) and event free survival (85.7%). MYCN status and 1p LOH showed a NPV of 81.6% and 78.9%, respectively, for the overall survival status, and of 65.3% and 63.2%, respectively, for the event free survival. The Positive Predictive Value (PPV) of CHD5 expression (overall survival status: 54.3%; event free survival: 71.4%), i.e.

proportion of events or deaths in patients with low CHD5 expressing tumors, was intermediate between MYCN (66.7% and 77.8%, respectively) and 1p LOH (46.7% and 60%, respectively) values. CHD5 IHC showed high sensitivity and accuracy rate for the prediction of OS (95% and 73%, respectively) and EFS (86.20% and 77.80%) (Table 4).

The prognostic value of CHD5 expression was validated on an independent, blinded set of 32 FFPE primary NB tumors of patients diagnosed and treated at the Children's Hospital of Boston (n = 21) and HSJD of

Table 3 Analysis of the Predictive Value was performed for a descriptive comparison between CHD5 expression and MYCN and 1p LOH

		Overall Survival				Event Free Survival			
		Alive	Dead	PPV	NPV	No event	Event	PPV	NPV
CHD5 IHC	High	27 (62.8%)	1 (5%)	54.30%	96.40%	24 (70.6%)	4 (13.8%)	71.40%	85.70%
	Low	16 (37.2%)	19 (95%)			10 (29.4%)	25 (86.2%)		
MYCN	Non amplified	40 (93%)	9 (60%)	66.70%	81.60%	32 (94.1%)	17 (70.8%)	77.80%	65.30%
	Amplified	3 (7%)	6 (40%)			2 (5.9%)	7 (29.2%)		
1p LOH	No	30 (78.9%)	8 (53.3%)	46.70%	78.90%	24 (80%)	14 (60.9%)	60%	63.20%
	LOH	8 (21.1%)	7 (46.7%)			6 (20%)	9 (39.1%)		

Table 4 Comparison of sensitivity, specificity and accuracy rate between CHD5 expression, MYCN status and 1p LOH

	Overall Survival			Event Free Survival		
	Sens	Specif	Accuracy	Sens	Specif	Accuracy
CHD5 IHC	95.00%	62.80%	73.00%	86.20%	70.60%	77.80%
MYCN	40.00%	93.00%	79.30%	29.20%	94.10%	67.20%
1p LOH	46.70%	78.90%	69.80%	39.10%	80.00%	62.30%

Barcelona (n = 11). Kaplan-Meier analysis and a log-rank test showed a statistically significant difference in OS (log-rank test P = 0.001) and EFS (log-rank test P < 0.0001) between patients with high and low CHD5 expression scores (Figure 3C and 3D). Tumors with high IHC scores were associated with longer survival (mean 73 months) in comparison with low expressing tumors (mean 46 months).

These results suggest that CHD5 protein expression is a potential prognostic marker of outcome in NB patients.

CHD5 expression reactivation is associated with tumor response to induction therapy

Tumor histology and gene expression can change with treatment as a result of important changes in cellular processes. We investigated the effects of induction chemotherapy (3 cycles) on CHD5 expression in 12 high risk NB cases with available paired diagnostic and post-chemotherapy tumor specimens for qRT-PCR and immunohistochemical analyses. At diagnosis all these tumors (2 locoregional and 10 stage 4 NB) displayed low CHD5 mRNA expression and negative immunostaining. Following induction chemotherapy, a significant increase of CHD5 transcript and CHD5 positive nuclear staining was detected in 6/12 specimens, together with therapy-induced morphological changes (increased cytoplasm and ganglion-like cell morphology) (Figure 4A and 4C; cases #1-6). All these patients achieved an initial complete or very good response to cytotoxic therapy (chemo- and radiation therapy). At the time of analysis, 5/6 patients were alive with a mean follow-up of 35.62 months (Figure 4B). One case, stage 4 MYCN amplified, progressed after a good initial response to chemotherapy and died of refractory bone marrow disease (Figure 4C; case #6). Bone marrow aspirate smears of this patient exhibited widespread tumor dissemination with CHD5 negative neuroblast aggregates (data not shown).

In contrast, low gene and protein expression levels persisted in the 6 remaining post-therapy specimens (6 stage 4 NB; 3/6 MYCN amplified and 1p36 deleted tumors) (Figure 4A and 4C; cases #7-12). Therapy induced neuroblastic differentiation was observed in only one of these samples (case #7), a stage 4 NB with aberrant morphological changes. All 6 patients died of rapid disease progression with no signs of clinical

response; with a mean survival of 12.73 months (Figure 4B).

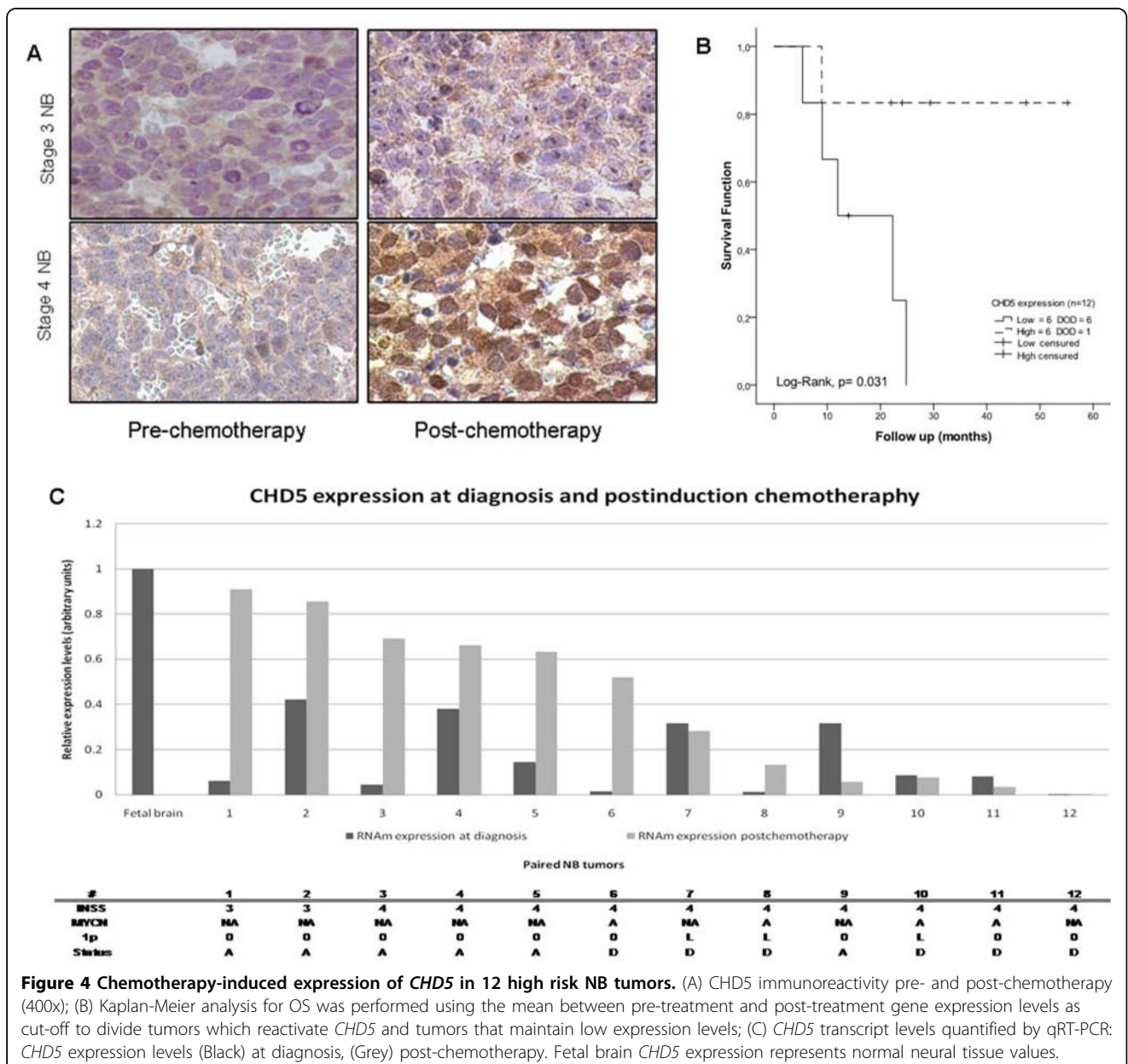
These observations suggest a relationship between CHD5 expression reactivation and response to induction therapy and subsequent patient outcome.

Discussion

Gene expression of CHD5, an ATP-dependent chromatin remodeling enzyme, has been reported to be restricted essentially to the nervous system [8,10]. We describe for the first time that CHD5 is a neuron specific protein in normal neural tissue, with variable immunostaining intensity and intracellular localization among the neuron types of the cerebral cortex. Recent evidences suggest that the diverse neuron cell classes derive from distinct embryonal germinal zones and are characterized by specific cell signaling systems that regulate neural stem cells throughout the developing brain [13-15]. Thus, neuronal cells adopt a brain layer fate determined by their molecular profiles [14]. While we did not observe a layer specific distribution of CHD5 in the cerebral cortex, we did note an association of CHD5 expression with neurons with distinct morphological, physiological and neurochemical features.

In normal neural tissue, glial cells appeared consistently devoid of CHD5 expression. In human glial tumors, chromosome arm 1p allelic loss is a frequent genetic abnormality, especially in oligodendrogliomas (70-85%) and astrocytomas (20-30%) [16]. Recently, low levels of CHD5 expression have been reported in gliomas with 1p deletion, whereas nondeleted tumors displayed expression levels comparable to normal brain [4]. Thus, deletion of CHD5 has been proposed as an initiating event in gliomas [4]. Our findings, however, suggest that the role of CHD5 as a tumor suppressor in glial tumors needs further investigation.

NTs are embryonal cancers that are assumed to originate from primitive sympathetic neuroblast aggregates located in neural crest derived sympathetic nervous system. We observed how primitive neuroblast aggregates found in fetal adrenal gland specimens generally lack CHD5 expression. Interestingly, only a few cells were found with a variable degree of nuclear reactivity in larger aggregates. To date, the fate of these immature neuroblastic aggregates remains unsolved, and spontaneous involution and cell maturation have been proposed [17].



The immunoreactivity observed in a small proportion of neuroblasts within these islets could suggest the establishment of *CHD5* expression prior to their disappearance; however, no evident differentiating features were observed in these immunopositive cells that suggested the activation of the maturation process.

In NTs, *CHD5* is essentially expressed in the nucleus of differentiating neuroblastic cells and ganglion cells, and absent in the Schwannian stromal component. However, the most intense immunoreactivity was observed in stage 4s NB, a rare subgroup of histologically undifferentiated, highly proliferative, metastatic tumors with a high incidence of spontaneous regression, affecting young infants. Accurate distinction of

spontaneously regressing infant NB from high risk infant stage 4 can be difficult, but critical for therapeutic decisions. In our hands, the intensely positive *CHD5* nuclear staining enabled a clear distinction of stage 4s NB from stage 4 NB, which was consistently immunonegative. These results are consistent with our previous gene expression profiling study, where similar differential *CHD5* expression profiles were observed amongst infants with disseminated NB subgroups [18]. Thus, *CHD5* immunohistochemical staining may be clinically useful for a more accurate characterization of disseminated infant NB.

In NB, *CHD5* nuclear staining was strongly associated with established favorable prognostic variables

like low clinical stage, age at diagnosis <12 months and favorable histology. Our findings suggest that CHD5 protein expression may accurately define NB risk groups and may, therefore, be a prognostic marker. Evidence is provided by the statistically significant association found between high CHD5 immunoreactivity and favorable OS and EFS. These results are consistent with recent studies reporting a strong association of *CHD5* mRNA levels with patient outcome in NB [5,10]. Furthermore, Cox multivariate analyses suggest that the prognostic value of CHD5 protein expression is independent of other clinical and biological variables currently used in risk stratification of NB patients and could therefore represent an immunohistochemical marker of prognosis in NB.

Currently, risk stratification of NB patients is performed by combining different markers with strong prognostic impact, including patients' age at diagnosis, tumor stage, genomic amplification of the oncogene *MYCN*, copy number alterations of chromosomal regions 1p, 11q and 17q, tumor DNA content [1,19] and Shimada histological score [20]. However, despite elaborate risk stratification strategies, outcome prediction in neuroblastoma is still deficient. In recent years, to improve risk assessment additional prognostic indicators such as gene-expression signatures [21-23], combined genomic and molecular signatures [24] or expression levels of single candidate genes, e.g., *Trk* (NTRK) family of neurotrophin receptors [25,26], *FYN* [27], *PRAME* [28] and *ZNF423* [29], have been associated with NB clinical behavior. Expression of the *Trk* family receptors has been the most extensively characterized marker in NB and has been found to be consistently correlated with the biology and clinical behavior of NB. Based on our results, there is an apparent similarity between the expression patterns of *CHD5* and *TRKA* in NB and their patterns of association with NB disease outcome. *TRKA* expression has been reported to be high in biologically favorable NB tumors and inversely associated with *MYCN* amplification [30]. The prognostic value of the immunohistochemical detection of *TrkA* has also been examined and reported to be high, especially in combination with Ha-Ras expression pattern [31,32]. Further IHC studies have correlated the lack of *TrkA* expression with metastatic malignant NB [33]. However, in the latter study, 34% of the patients with stage 4 NB displayed *TrkA* expression, a subset of which died of aggressive metastatic disease despite *TrkA* expression [33,34]. In our study, the majority of stage 4 NB either lacked *CHD5* immunoreactivity (83%) or exhibited weak nuclear staining (13%), a high risk phenotype according to our scoring system. Only one stage 4 tumor was found to be clearly immunoreactive for *CHD5*; at the time of analysis the patient is alive, 29 months from

diagnosis. These observations further confirm *CHD5* as a powerful prognostic marker that could complement other known markers such as age at diagnosis, stage, *MYCN* status, cellular DNA content, 1p deletion and tumor histology. However, the potential clinical use of this marker must be tested in larger, prospective cohorts.

It is known that tumor histology and gene expression can change with treatment as a result of important changes in cellular processes, e.g., induced tumor differentiation, DNA repair, apoptosis and tissue necrosis. Undifferentiated NB occasionally exhibit neuroblastic maturation in response to chemotherapy. Assessment of *CHD5* gene and protein expression in NB post-therapy specimens revealed that tumors with evident neuroblastic maturation showed both *CHD5* gene and protein reactivation. Notably, none of these tumors harbored 1p deletion. Conversely, in tumors where minimal or no morphological changes were observed in the post-treatment specimens, low *CHD5* expression persisted. These observations suggest the existence of a subset of tumors within high risk NB where *CHD5* expression can be reactivated from the silenced state by standard chemotherapy. Remarkably, when post-therapy reactivation was observed, *CHD5* expression was largely associated with disease response to cytotoxic induction therapy and subsequently with longer patient OS. All 12 patients included in the study received the same treatment, nevertheless some tumors failed to respond. At present, treatment response in NB is routinely evaluated by monitoring urine levels of catecholamine and its metabolites (VMA/HVA ratio) and by estimating the decrease in the size of measurable lesions with conventional imaging modalities, such as computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI). At the time of second-look surgery, the degree of induced tumor cell differentiation and the extent of necrosis can also be useful to estimate treatment response. However, no biological markers for tumor chemotherapy responsiveness have been reported in NB. The use of such biomarkers would make chemotherapy more effective for individual patients by allowing timely changes of therapy in the case of nonresponding tumors. Furthermore, markers reflecting tumor response can function as surrogates of long-term outcome. Taking into account the small cohort of cases that may have led to an overestimation of the data, our findings would suggest that restoration of *CHD5* expression could be a surrogate marker of treatment response that can be clinically useful to identify patients that do not benefit from conventional treatment. These results warrant further investigation in a larger cohort of uniformly treated patients.

In summary, we report that the differential expression of the neuron-specific protein *CHD5* accurately defines NB risk groups and may represent a marker of outcome in neuroblastoma that can be tested by conventional

immunohistochemistry. In high risk NB patients, re-establishment of CHD5 expression following chemotherapy should be tested prospectively as a surrogate marker of treatment response.

Additional material

Additional file 1: Clinical and biological characteristics of 90 NT specimens included in the study.

INSS = International Neuroblastoma Staging System; Diagnosis: NB = neuroblastoma, GNB = ganglioneuroblastoma, GN = ganglioneuroma; Disease status: A = alive, D = dead; EFS = Event free survival; qRT-PCR = Quantitative real-time PCR; IHC = immunohistochemistry; n.a = not available data

Immunohistochemical analysis of CHD5 expression in NTs Results are displayed as percentage of CHD5 immunopositive cells present in each tumor specimen. Staining intensity: 0 = negative; 1 = weak staining; 2 = strong staining, 3 = very intense staining. Proportion of positive cells values (<25% = 1; 25-75 = 2; >75% = 3). Intensity and positive cell values were multiplied together to provide a single score for each case.

Additional file 2: A. Immunohistochemical staining of FFPE sections of two immunopositive neuroblastic tumors using two different batches of the anti-CHD5 antibody (T00251-A1 and T00251-A02); B. Immunohistochemical assay with the anti-CHD5 antibody (Strategic Diagnostics, DE) on mouse xenografts derived from human NB cell lines.

The specificity of the anti-CHD5 antibody was validated by immunohistochemical assays on FFPE sections of mouse xenografts of human NB cell lines (SK-N-JD, SK-N-LP and SK-N-AS). In these NB cell lines CHD5 gene expression is very low or absent (data not shown), similar to previously reported data (ref. 5, ref. 10). Two different anti-CHD5 antibody batches (T00251-A1 and T00251-A02, Strategic Diagnostics, DE) were tested. Ganglioneuroblastoma FFPE tissue sections were used as positive control samples. All the analyzed xenografts were composed nearly exclusively (>95%) of neuroblastic cells exhibiting no CHD5 nuclear staining and faint cytoplasmic staining (when present). Only few (<5%) immunopositive cells were observed in the SK-N-LP xenograft. However, viable tumor cells in the SK-N-LP xenograft were negative for CHD5 nuclear staining, similar to SK-N-JD and SK-N-AS. These results were comparable to the immunostaining pattern observed in undifferentiated high risk NB tumors. The GNB ganglionic cells showed intense nuclear and diffused cytoplasm immunostaining.

Additional file 3: CHD5 mRNA expression levels in NTs Results are displayed as mean expression levels of NT subgroups obtained from two independent analyses. HR = high risk NB (Stage 4 and Stage 3 MYCN amplified); LR = low risk NB (stage 1, stage 2 and stage 3 MYCN non-amplified); GNB= ganglioneuroblastoma; GN = ganglioneuroma. Quantification was performed relative to normal fetal brain. Error bars illustrate the variability amongst the samples of each NT subgroup.

Additional file 4: Comparison of CHD5 mRNA and protein expression. The lineal graph shows comparison between CHD5 mRNA levels and protein immunoreactivity in 34 NB cases. Low CHD5 protein scores were associated with lower mRNA levels (negative z-score values), and high IHC scores with high mRNA expression (positive z-score values), (Spearman's correlation analysis $\rho = 0.774$; $P < 0.001$). Low risk tumors, stage 4s and infant stage 1 NB tumors showed very intense nuclear staining in comparison to the observed transcript levels (cases # 1-6, 30, 31 and 33).

Additional file 5: Cox multivariate analysis. Cox multivariate regression analysis has been performed using clinical and biological variables currently used in risk stratification of NB patients (INSS stage, age at diagnosis, MYCN status and 1p LOH) in combination with the CHD5 IHC. The analysis has been performed sequentially, adding one variable at each step, in order to assess how the presence of each variable influences the performance of CHD5. CHD5 IHC remained statistically significantly associated with overall survival in all the analyses, except when the 1p LOH parameter is included in the overall survival analysis. This is due to the strong association of the expression of CHD5, located on 1p36, with chromosome 1p status. All the rest of variables, except for

MYCN amplification, were not statistically significant. For event free survival analysis, CHD5 IHC is the only variable that remained statistically significant along the whole analysis, even in the presence of 1p LOH. IHC = Immunohistochemical analysis; INSS = International Neuroblastoma Staging System; HR = hazard ratio; CI = confidence interval. P-values are two sided.

Acknowledgements

Authors thank Dr. B. Spengler (Fordham University, New York) and Dr. N.K.V. Cheung (MSKCC, New York) for annotated NB cell lines; the Neural Tissue Bank (Hospital Clinic, Barcelona) for normal brain samples and the Department of Audiovisual Systems (HSJD, Barcelona) for technical assistance. This study was supported by grants from the Spanish Ministry of Health (PI070286), Spanish Society against Cancer (Asociación Española Contra el Cáncer, 2007), the Catalan government (2005SGR00605; 2006FI00404), and the generous donations from Margarita del Pozo and Alicia Pueyo Foundations.

Author details

¹Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. ²Department of Pathology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. ³Department of Neurology, University of North Carolina, Chapel Hill, USA. ⁴Laboratory of Biostatistics & Epidemiology, Universitat Autònoma de Barcelona; Clinical Pharmacology Service, IDIBAPS, Hospital Clinic, Barcelona, Spain. ⁵Department of Pediatrics, Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre, New York, USA. ⁶Division of Pediatric Hematology/Oncology, Dana-Farber Cancer Institute and Children's Hospital of Boston, USA. ⁷Department of Pathology, Children's Hospital of Boston, USA.

Authors' contributions

CL, IG and JM are responsible for the initial conception and overall hypothesis of this study. IG, GM and CL are responsible for the design of this manuscript, including the original draft and subsequent revisions. IG, GM, ER, MS, TG, JR, NKC, CdT, JM MK, RG, AAP and CL were involved with the interpretation of data, draft and revision of this manuscript. CdT provided guidance for many of the experiments. NKC, TG, MK, RG and AAP are responsible for the procurement and cryopreservation of NBT tissue specimens derived from MSKCC and CHB/DFCI. ER, IG, GM, JM and CL were responsible for the procurement and cryopreservation of NBT tissue specimens derived from the Spanish institutions. ER, IG, GM, CL and MS are responsible of immunohistochemical analyses. MS evaluated tumour specimens for staging classification, tumour content. JM and CL are responsible for patient clinico-biological database management. CC, GM, PG and ER are responsible for the *in vivo* study. IG, GM and CL are responsible for the quantitative PCR experiments and immunoblotting. JR and CL are responsible of statistical analyses. All authors were involved in the drafting and revisions for this manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 25 January 2010 Accepted: 15 October 2010

Published: 15 October 2010

References

1. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL: **Neuroblastoma.** *Lancet* 2007, **369**:2106-2120.
2. Weith A, Brodeur GM, Bruns GA, Matise TC, Mischke D, Nizetic D, Seldin MF, van Roy N, Vance J: **Report of the second international workshop on human chromosome 1 mapping 1995.** *Cytogenet Cell Genet* 1996, **72**:114-144.
3. Fong CT, Dracopoli NC, White PS, Merrill PT, Griffith RC, Housman DE, Brodeur GM: **Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastoma: correlation with N-myc amplification.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, **86**:3753-3757.

4. Bagchi A, Papazoglu C, Wu Y, Capurso D, Brodt M, Francis D, Bredel M, Vogel H, Mills AA: **CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36.** *Cell* 2007, **128**:459-475.
5. Fujita T, Igarashi J, Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Kolla V, Kim J, Zhao H, Pawel BR, London WB, Maris JM, White PS, Brodeur GM: **CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas.** *J Natl Cancer Inst* 2008, **100**:940-949.
6. Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Igarashi J, Fujita T, Silverman KA, Xhao H, Mosse YP, White PS, Brodeur GM: **Expression and sequence analysis of candidates for the 1p36.31 tumor suppressor gene deleted in neuroblastomas.** *Oncogene* 2008, **27**:803-810.
7. Mulero-Navarro S, Esteller M: **Chromatin remodeling factor CHD5 is silenced by promoter CpG island hypermethylation in human cancer.** *Epigenetics* 2008, **3**:210-215.
8. Marfella CG, Imbalzano AN: **The Chd family of chromatin remodelers.** *Mutat Res* 2007, **618**:30-40.
9. Schuster EF, Stöger R: **CHD5 defines a new subfamily of chromodomain-SWI2/SNF2-like helicases.** *Mammalian Genome* 2002, **13**:117-119.
10. Thompson PM, Gotoh T, Kok M, White PS, Brodeur GM: **CHD5, a new member of the chromodomain gene family, is preferentially expressed in the nervous system.** *Oncogene* 2003, **22**:1002-1011.
11. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedberg F: **Revision of the International criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment.** *J Clin Oncol* 1993, **11**:1466-1477.
12. Lavarino C, Garcia I, Mackintosh C, Cheung NKV, Domenech G, Rios J, Perez N, Rodríguez E, De Torres C, Gerald WL, Tuset E, Acosta S, Beleta H, de Alava E, Mora J: **Differential expression of genes mapping to recurrently abnormal chromosomal regions characterize neuroblastic tumours with distinct ploidy status.** *BMC Med Genomics* 2008, **1**:36.
13. Anderson SA, Kaznowski CE, Horn C, Rubenstein JL, McConnell SK: **Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in vivo.** *Cereb Cortex* 2002, **12**:702-709.
14. Hevner RF, Daza RA, Rubenstein JL, Stunnenberg H, Olavarria JF, Englund C: **Beyond laminar fate: toward a molecular classification of cortical projection/pyramidal neurons.** *Dev Neurosci* 2003, **25**:139-151.
15. Gilbertson RJ, Ellison DW: **The origins of medulloblastoma subtypes.** *Annu Rev Pathol* 2008, **3**:341-365.
16. Barbashina V, Salazar P, Holland EC, Rosenblum MK, Ladanyi M: **Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:1119-1128.
17. de Preter K, Vandesompele J, Heimann P, Yigit N, Beckman S, Schramm A, Eggert A, Stallings RL, Benoit Y, Renard M, De Paepe A, Laureys G, Pählman S, Speleman F: **Human fetal neuroblast and neuroblastoma transcriptome analysis confirms neuroblast origin and highlights neuroblastoma candidate genes.** *Genome Biol* 2006, **7**(9):R84.
18. Lavarino C, Cheung NK, Garcia I, Domenech G, de Torres C, Alaminos M, Rios J, Gerald WL, Kushner B, LaQuaglia M, Mora J: **Specific gene expression profiles and chromosomal abnormalities are associated with infant disseminated neuroblastoma.** *BMC Cancer* 2009, **3**:9-44.
19. Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Schleiermacher G, Speleman F, Spitz R, London WB, Cohn SL, Pearson AD, Maris JM: **International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee.** *Br J Cancer* 2009, **100**:1471-1482.
20. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP: **The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system).** *Cancer* 1999, **86**:364-72.
21. Oberthuer A, Berthold F, Warnat P, Hero B, Kahlert Y, Spitz R, Ernestus K, König R, Haas S, Eils R, Schwab M, Brors B, Westermann F, Fischer M: **Customized oligonucleotide microarray gene expression-based classification of neuroblastoma patients outperforms current clinical risk stratification.** *J Clin Oncol* 2006, **24**(31):5070-5078.
22. De Preter K, Vermeulen J, Brors B, Delattre O, Eggert A, Fischer M, Janoueix-Lerosey I, Lavarino C, Maris JM, Mora J, Nakagawara A, Oberthuer A, Ohira M, Schleiermacher G, Schramm A, Schulte JH, Wang Q, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J: **Accurate outcome prediction in neuroblastoma across independent data sets using a multigene signature.** *Clin Cancer Res* 2010, **16**(5):1532-1541.
23. Oberthuer A, Hero B, Berthold F, Juravea D, Faldum A, Kahlert Y, Asgharzadeh S, Seeger R, Scaruffi P, Tonini GP, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G, Vandesompele J, Vermeulen J, Speleman F, Noguera R, Piqueras M, Bénard J, Valent A, Avigad S, Yaniv I, Weber A, Christiansen H, Grundy RG, Schardt K, Schwab M, Eils R, Warnat P, Kaderali L, Simon T, Decarolis B, Theissen J, Westermann F, Brors B, Fischer M: **Prognostic impact of gene expression-based classification of neuroblastoma.** *J Clin Oncol* 2010, **28**(21):3506-15.
24. Tomioka N, Oba S, Ohira M, Misra A, Fridlyand J, Ishii S, Nakamura Y, Isogai E, Hirata T, Yoshida Y, Todo S, Kaneko Y, Albertson DG, Pinkel D, Feuerstein BG, Nakagawara A: **Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature.** *Oncogene* 2008, **27**:441-449.
25. Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM: **Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma.** *N Engl J Med* 1993, **328**:847-854.
26. Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Varela CR, Light JE, Kolla V, Evans AE: **Trk receptor and inhibition in neuroblastomas.** *Clin Can Res* 2009, **15**(10):3244-3250.
27. Berwanger B, Hartmann O, Bergmann E, Bernard S, Nielsen D, Krause M, Kartal A, Flynn D, Wiedemeyer R, Schwab M, Schäfer H, Christiansen H, Eilers M: **Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastomas.** *Cancer Cell* 2002, **2**(5):377-86.
28. Oberthuer A, Hero B, Spitz R, Berthold F, Fischer M: **The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome.** *Clin Can Res* 2004, **10**(13):4307-13.
29. Huang S, Laoukili J, Epping MT, Koster J, Hölzel M, Westerman BA, Nijkamp W, Hata A, Asgharzadeh S, Seeger RC, Versteeg R, Beijersbergen RL, Bernards R: **ZNF423 is critically required for retinoic acid-induced differentiation and is a marker of neuroblastomas outcome.** *Cancer Cell* 2009, **15**:328-340.
30. Nakagawara A, Arima M, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM: **Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas.** *Cancer Res* 1992, **52**:1364-1368.
31. Tanaka T, Hiyama E, Sugimoto T, Sawada T, Tanabe M, Ida N: **trkA gene expression in neuroblastoma.** *Can Res* 1995, **76**:1086-1095.
32. Tanaka T, Sugimoto T, Sawada T: **Prognostic discrimination among neuroblastomas according to Ha-ras/trk A gene expression.** *Can Res* 1998, **83**:1626-1633.
33. Krammer K, Gerald W, LeSauteur L, Saragovi HU, Cheung N-KV: **Prognostic value of TrkA protein detection by monoclonal antibody 5C3 in neuroblastoma.** *Clin Can Res* 1996, **2**:1361-67.
34. Krammer K, Gerald W, LeSauteur L, Saragovi HU, Cheung N-KV: **Monoclonal antibody to human Trk-A: Diagnostic and therapeutic potential in neuroblastoma.** *Eur J Cancer* 33(12):2090-2091.

doi:10.1186/1476-4598-9-277

Cite this article as: Garcia et al.: Expression of the neuron-specific protein CHD5 is an independent marker of outcome in neuroblastoma. *Molecular Cancer* 2010 **9**:277.

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

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

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Additional Files to:

Expression of the neuron-specific protein CHD5 is an independent marker of outcome in neuroblastoma.

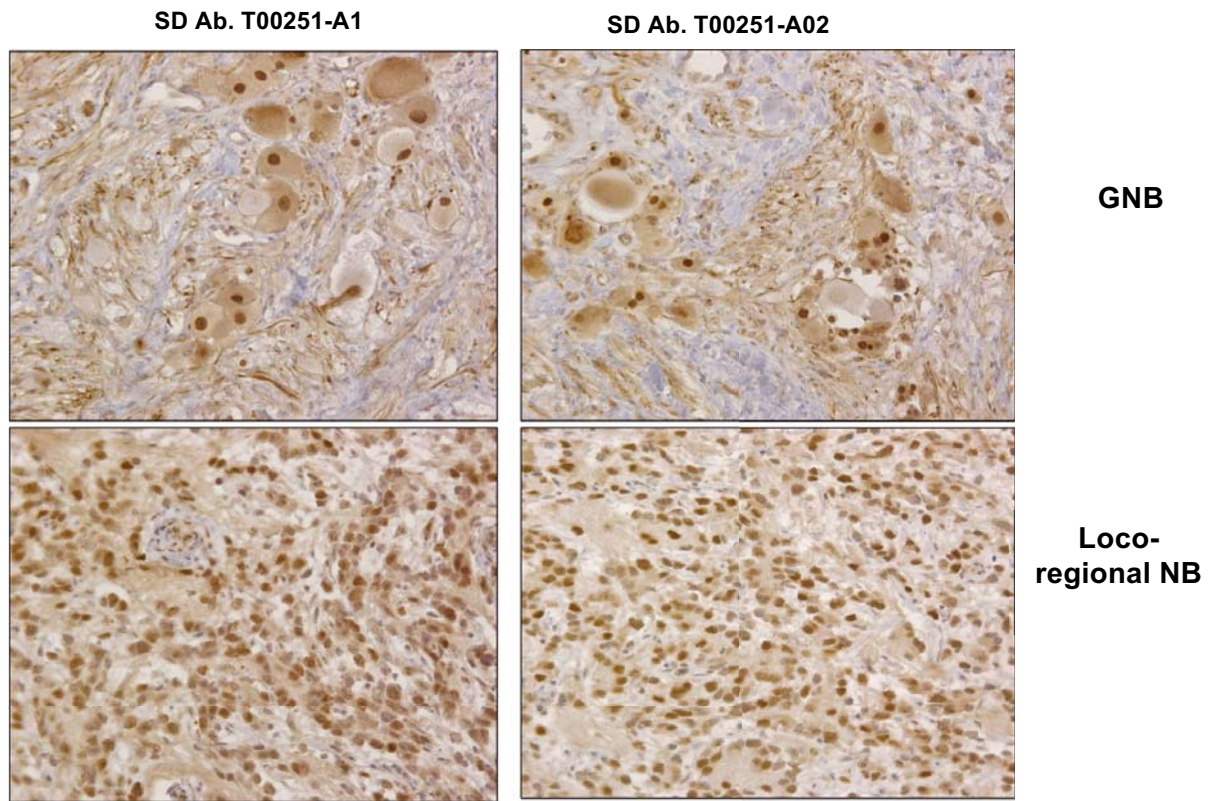
Idoia Garcia, Gemma Mayol, Eva Rodríguez, Mariona Suñol, Timothy R Gershon, José Ríos, Nai-Kong V Cheung, Mark W Kieran, Rani E George, Antonio R Perez-Atayde, Carla Casala, Patricia Galván, Carmen de Torres, Jaume Mora and Cinzia Lavarino.

1. **Additional File 1.** Clinical and biological characteristics of 90 NT specimens included in the study.
2. **Additional File 2.**
 - A. Immunohistochemical staining of FFPE sections of two immunopositive neuroblastic tumors using two different batches of the anti-CHD5 antibody (T00251-A1 and T00251-A02).
 - B. Immunochemical assay with the anti-CHD5 antibody (Strategic Diagnostics, DE) on mouse xenografts derived from human NB cell lines.
3. **Additional File 3.** *CHD5* mRNA expression levels in NTs.
4. **Additional File 4.** Comparison of *CHD5* mRNA and protein expression.
5. **Additional File 5.** Cox multivariate analysis.

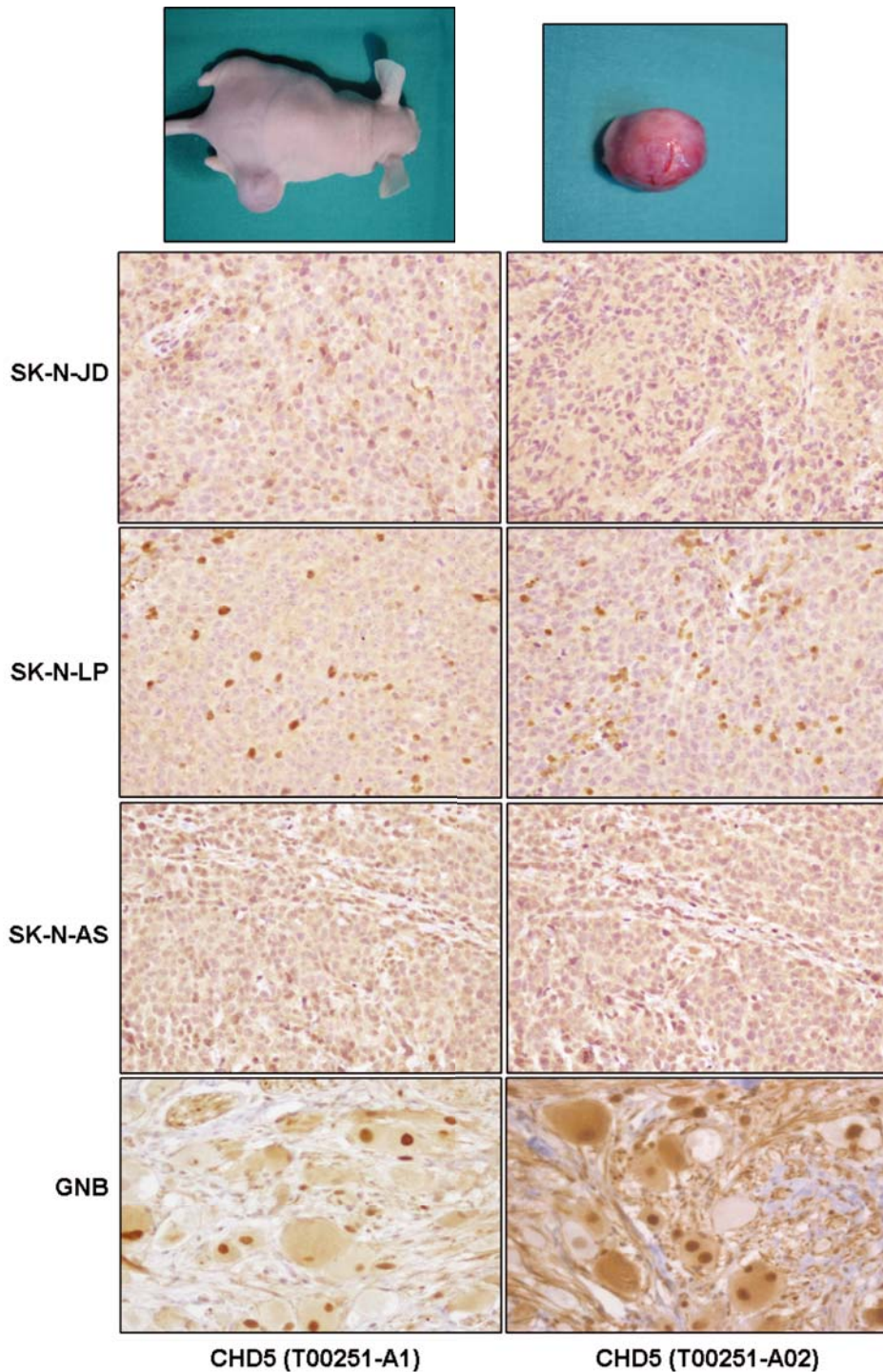
Las tablas **Additional File 1** y **Additional File 3** no se encuentran impresas a continuación, se encuentran en formato digital en el CD que acompaña esta tesis.

Additional File 2.

A. Example of immunohistochemical staining of FFPE sections of two immunopositive neuroblastic tumors using two different batches of the anti-CHD5 antibody (T00251-A1 and T00251-A02).

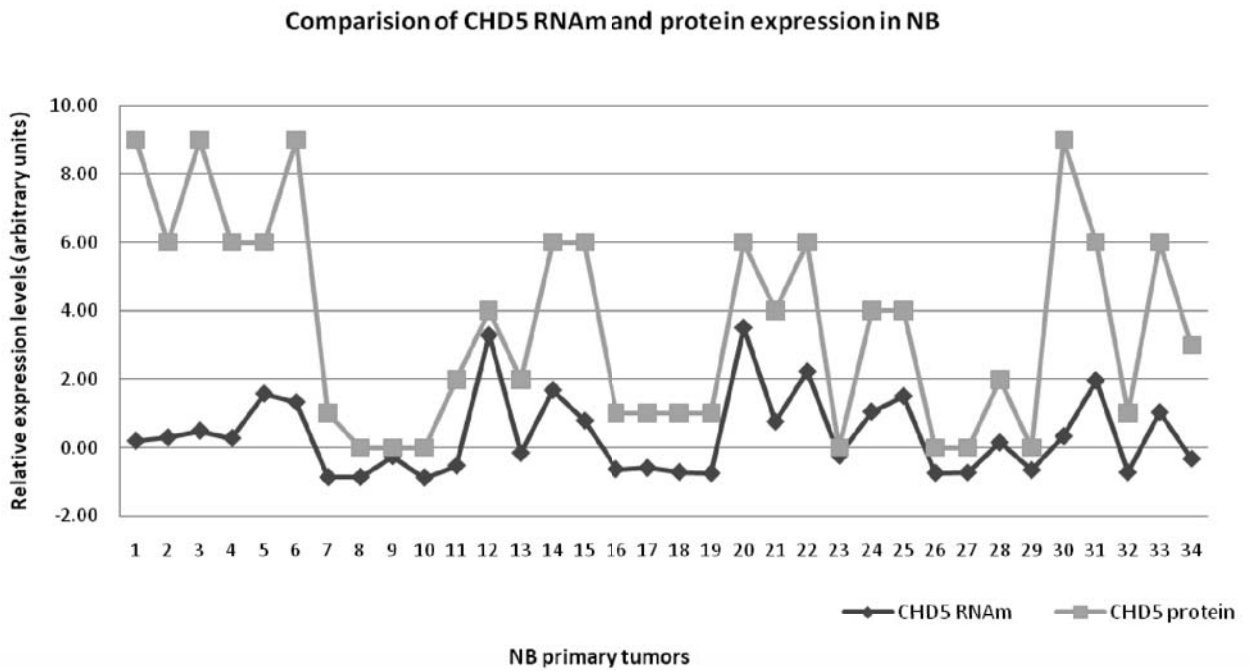


B. Immunochemical assay with the anti-CHD5 antibody (Strategic Diagnostics, DE) on mouse xenografts derived from human NB cell lines.



The specificity of the anti-CHD5 antibody was validated by immunohistochemical assays on FFPE sections of mouse xenografts of human NB cell lines (SK-N-JD, SK-N-LP and SK-N-AS). In these NB cell lines *CHD5* gene expression is very low or absent (data not shown), similar to previously reported data (5,10). Two different anti-CHD5 antibody batches (T00251-A1 and T00251-A02, Strategic Diagnostics, DE) were tested. Ganglioneuroblastoma FFPE tissue sections were used as positive control samples. All the analyzed xenografts were composed nearly exclusively (>95%) of neuroblastic cells exhibiting no CHD5 nuclear staining and faint cytoplasmic staining (when present). Only few (<5%) immunopositive cells were observed in the SK-N-LP xenograft. However, viable tumor cells in the SK-N-LP xenograft were negative for CHD5 nuclear staining, similar to SK-N-JD and SK-N-AS. These results were comparable to the immunostaining pattern observed in undifferentiated high risk NB tumors. The GNB ganglionic cells showed intense nuclear and diffused cytoplasm immunostaining.

Additional file 4. Comparison of *CHD5* mRNA and protein expression.



#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34		
INSS	4s	3	4s	1	1	1	3	4	4	4	4	2	4	3	3	3	4	4	3	4s	3	1	4	3	3	4	4	4	4	4	4s	1	4	1	4	
AGE (months)	0	1	3	6	6	13	30	48	72	72	120	16	18	20	24	47	30	48	22	6	210	22	22	15	12	48	28	36	60	0	0	21	4	24		
MYCN status	NA	NA	NA	NA	NA	NA	A	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	A	A	A	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	A	NA	NA	NA	NA	NA	A	NA	A

= n. patient

INSS = International Neuroblastoma Staging System

MYCN status, NA = non amplified; A = amplified

Additional file 5. Cox multivariate regression analysis.

Model n°	OVERALL SURVIVAL			EVENT FREE SURVIVAL		
	Factor	HR and 95%CI	p-value	Factor	HR and 95%CI	p-value
1	<i>MYCN</i>	8.08 (2.43 to 26.93)	0.0007	<i>MYCN</i>	2.72 (1.07 to 6.88)	0.0351
	CHD5 IHC	12.29 (1.56 to 96.49)	0.0171	CHD5 IHC	5.97 (1.98 to 17.98)	0.0015
2	<i>MYCN</i>	6.96 (2.05 to 23.58)	0.0018	<i>MYCN</i>	2.57 (0.98 to 6.76)	0.0549
	CHD5 IHC	9.21 (1.09 to 78.18)	0.0418	CHD5 IHC	5.51 (1.69 to 17.95)	0.0046
	Age_12	2.13 (0.41 to 11)	0.3679	Age_12	1.22 (0.42 to 3.54)	0.7132
3	<i>MYCN</i>	7.1 (2.03 to 24.84)	0.0022	<i>MYCN</i>	2.53 (0.96 to 6.7)	0.0614
	CHD5 IHC	9.58 (1.07 to 85.89)	0.0436	CHD5 IHC	5.17 (1.43 to 18.72)	0.0124
	Age_12	2.18 (0.41 to 11.66)	0.3612	Age_12	1.18 (0.4 to 3.53)	0.7639
	INSS	0.91 (0.26 to 3.14)	0.88	INSS	1.14 (0.41 to 3.12)	0.802
4	<i>MYCN</i>	13.1 (2.57 to 66.91)	0.002	<i>MYCN</i>	2.63 (0.81 to 8.58)	0.1086
	CHD5 IHC	7.65 (0.79 to 74.4)	0.0795	CHD5 IHC	4.17 (1.05 to 16.57)	0.0427
	Age_12	2.27 (0.41 to 12.45)	0.3444	INSS	1.28 (0.43 to 3.79)	0.6542
	INSS	1.13 (0.31 to 4.1)	0.8481	Age_12	1.3 (0.43 to 3.92)	0.6435
	LOH	0.52 (0.12 to 2.27)	0.386	LOH	0.78 (0.27 to 2.22)	0.6393

Cox multivariate regression analysis has been performed using clinical and biological variables currently used in risk stratification of NB patients (INSS stage, age at diagnosis, *MYCN* status and 1p LOH) in combination with the CHD5 IHC. The analysis has been performed sequentially, adding one variable at each step, in order to assess how the presence of each variable influences the performance of CHD5.

CHD5 IHC remained statistically significantly associated with overall survival in all the analyses, except when the 1p LOH parameter is included in the overall survival analysis. This is due to the strong association of the expression of *CHD5*, located on 1p36, with chromosome 1p status. All the rest of variables, except for *MYCN* amplification, were not statistically significant.

For event free survival analysis, CHD5 IHC is the only variable that remained statistically significant along the whole analysis, even in the presence of 1p LOH.

IHC = Immunohistochemical analysis; INSS = International Neuroblastoma Staging System; HR = hazard ratio; CI = confidence interval. P-values are two sided.

3. La hipometilación del ADN afecta a funciones biológicas relacionadas con el cáncer y a genes relevantes para la patogénesis del neuroblastoma.

Gemma Mayol, José I. Martín-Subero, José Ríos, Ana Queiros, Marta Kulis, Mariona Suñol, Manel Esteller, Soledad Gómez, Idoia Garcia, Carmen de Torres, Eva Rodríguez, Patricia Galván, Jaume Mora y Cinzia Lavarino.

Publicado en la revista *PLoS ONE* 7(11): e48401.
FI: 4.092, Q1.

Resumen

El neuroblastoma (NB) es un tumor embrionario que se caracteriza por la presencia de numerosas alteraciones genéticas biológicamente relevantes que se asocian de forma significativa con la evolución clínica de los pacientes. No obstante los avances en el conocimiento del perfil genético del NB, aún se desconoce el patrón global de las alteraciones epigenéticas del ADN asociadas a esta enfermedad.

Nuestro grupo ha realizado un análisis del estado de metilación del ADN en tumores neuroblásticos (TN) primarios (n=25) utilizando tecnología de *microarrays* de metilación (*Illumina Infinium Human Methylation-27 BeadChip*). Los resultados fueron validados en una cohorte independiente de 15 TN mediante pirosecuenciación con bisulfito.

Mediante análisis supervisados aplicando criterios restrictivos, hemos identificado patrones de metilación del ADN diferencial propios del NB, así como alteraciones del estado de metilación del ADN en distintos subgrupos clínicos y biológicos de NB. Nuestras observaciones muestran como el ADN del NB se ve afectado por una elevada disminución de los niveles de metilación (hipometilación). Sorprendentemente, la hipometilación que hemos identificado es gen-específica y afecta a funciones biológicas relacionadas con cáncer así como a genes relevantes para la patogénesis del NB como *Cyclin D1 (CCND1)*, *Small proline-rich protein 3 (SPRR3)*, *Betacelluline (BTC)*, *Epidermal growth factor (EGF)* o *Fibroblast growth factor 6 (FGF6)*. Cabe destacar, que la metilación diferencial de *CCND1* afecta principalmente a una región evolutivamente conservada y funcionalmente relevante localizada en la región 3'-UTR del gen. Estos resultados sugieren que la pérdida del patrón de metilación del ADN en regiones no promotoras podría jugar un papel importante en la patogénesis del NB. Por otro lado, la ganancia de metilación (hipermetilación) afecta mayoritariamente regiones promotoras de genes involucrados en el desarrollo celular y en la regulación de la proliferación celular, como por ejemplo *Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1 (RASSF1A)*, *POU class 2 homeobox2 (POU2F2)* y *Homeobox D3 (HOXD3)*, entre otros.

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan genes candidatos a ser biomarcadores epigenéticos asociados con NB, así como un mayor conocimiento de las bases moleculares de esta enfermedad, caracterizada por una marcada hipometilación gen-específica, entre otras alteraciones genéticas.

DNA Hypomethylation Affects Cancer-Related Biological Functions and Genes Relevant in Neuroblastoma Pathogenesis

Gemma Mayol¹, José I. Martín-Subero², José Ríos^{3,4}, Ana Queiros², Marta Kulis⁵, Mariona Suñol⁶, Manel Esteller^{7,8,9}, Soledad Gómez¹, Idoia Garcia¹, Carmen de Torres¹, Eva Rodríguez¹, Patricia Galván¹, Jaume Mora¹, Cinzia Lavarino^{1*}

1 Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, **2** Department of Anatomic Pathology, Pharmacology and Microbiology, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Laboratory of Biostatistics and Epidemiology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, **4** Clinical Pharmacology Service, IDIBAPS, Hospital Clinic, Barcelona, Spain, **5** Hematopathology Unit, Hospital Clinic, Barcelona, Spain, **6** Department of Pathology, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, **7** Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet, Barcelona, Spain, **8** Department of Physiological Sciences II, School of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **9** Institutíó Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain

Abstract

Neuroblastoma (NB) pathogenesis has been reported to be closely associated with numerous genetic alterations. However, underlying DNA methylation patterns have not been extensively studied in this developmental malignancy. Here, we generated microarray-based DNA methylation profiles of primary neuroblastic tumors. Stringent supervised differential methylation analyses allowed us to identify epigenetic changes characteristic for NB tumors as well as for clinical and biological subtypes of NB. We observed that gene-specific loss of DNA methylation is more prevalent than promoter hypermethylation. Remarkably, such hypomethylation affected cancer-related biological functions and genes relevant to NB pathogenesis such as *CCND1*, *SPRR3*, *BTC*, *EGF* and *FGF6*. In particular, differential methylation in *CCND1* affected mostly an evolutionary conserved functionally relevant 3' untranslated region, suggesting that hypomethylation outside promoter regions may play a role in NB pathogenesis. Hypermethylation targeted genes involved in cell development and proliferation such as *RASSF1A*, *POU2F2* or *HOXD3*, among others. The results derived from this study provide new candidate epigenetic biomarkers associated with NB as well as insights into the molecular pathogenesis of this tumor, which involves a marked gene-specific hypomethylation.

Citation: Mayol G, Martín-Subero JI, Ríos J, Queiros A, Kulis M, et al. (2012) DNA Hypomethylation Affects Cancer-Related Biological Functions and Genes Relevant in Neuroblastoma Pathogenesis. PLoS ONE 7(11): e48401. doi:10.1371/journal.pone.0048401

Editor: Javier S. Castresana, University of Navarra, Spain

Received: August 7, 2012; **Accepted:** October 1, 2012; **Published:** November 7, 2012

Copyright: © 2012 Mayol et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, 2007; PI070286) and Spanish Society against Cancer (Asociación Española Contra el Cáncer, 2007). G.M. is supported by a grant of Hospital Sant Joan de Déu of Barcelona (Grant BR201102), S.G. by a donation from the NEN association and J.I.M-S. studies on epigenomics are supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (RyC contract and SAF2009-08663).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: clavarino@fsjd.org

Introduction

Neuroblastoma (NB), the most common extracranial tumor of childhood, is a complex developmental malignancy characterized by numerous biologically significant genetic alterations that are intimately associated with the clinical outcome of patients [1]. In addition to genetic changes, the complex and heterogeneous clinical evolution of NB greatly depends on patient's age at diagnosis, as well as clinical stage and histopathologic features of the tumor [1].

Altered DNA methylation patterns have been widely reported to be a critical factor in cancer development and progression. In particular, regional DNA hypermethylation (hyperM) of CpG islands in promoter regions of tumor suppressor genes as well as global hypomethylation (hypoM) affecting DNA repeats are considered to be the most frequent cancer-related epigenetic changes [2,3]. So far, most studies have focused their attention on the role and mechanisms of promoter hyperM, since loss of global

DNA methylation was believed to affect DNA repeats and to be mainly involved in structural-nuclear functions such as chromosomal instability [2].

Although the genomic profile of NB is well-characterized, DNA methylation changes have not been extensively studied in these tumors. Several genes have been reported as being methylated in NB [4–9], nevertheless the genome-wide DNA methylation pattern of NB is still greatly unknown. The aim of the present study was to investigate the pattern of epigenetic changes in NB at the genome-wide level using DNA methylation-specific microarrays. Besides identifying changes globally associated with NB, we characterized DNA methylation patterns associated with distinct clinical and biological subtypes of the disease. Interestingly, we observed that gene-specific loss of DNA methylation is more prevalent than promoter hyperM. Such hypoM affected cancer-related biological functions and genes relevant to NB pathogenesis such as *CCND1* [10].

Materials and Methods

Patients and samples

A total of 25 primary neuroblastic tumors (NT) including 22 NBs, 2 ganglioneuromas (GN) and 1 ganglioneuroblastoma (GNB) were used for genome wide methylation analysis. Additionally, an independent cohort of 13 NBs and 2 GN was used for bisulfite pyrosequencing, mRNA gene expression and DNA copy number variation analyses (Table 1 and Table S1A). GN and GNB as well as normal human fetal brain (FB) and adrenal gland (AG) tissues were used as reference samples. NB risk assessment was defined by the International Neuroblastoma Staging System (INSS) [11]. Tumor samples were assessed by a pathologist (M.S.), only tumors with >70% viable tumor cell content were included in the study. DNA was isolated from snap-frozen samples using Cell Lysis Solution (Promega, USA) and proteinase K (Sigma, USA) following manufacturers' protocols.

Ethics statement: The study was approved by the Institutional Research Ethics Committee (Comité Ético de Investigación Clínica, Fundación Sant Joan de Déu – CEIC-FSJD). Patients/parents/guardians signed an informed consent before collection of samples.

Genome-wide DNA methylation profiling

DNA methylation profiling was performed using the Infinium HumanMethylation27 BeadChip (Illumina, USA). Genomic DNA bisulfite conversion and hybridization to the platform was performed at the Human Genotyping Unit at the Spanish National Cancer Center (CEGEN-CNIO, Madrid, Spain), as previously described. Data were analyzed using the BeadStudio software (version 3, Illumina Inc, USA) [12,13]. For each CpG site we calculated the beta-value (β value), which is a quantitative measure of DNA methylation levels ranging from 0 for completely unmethylated to 1 for completely methylated cytosines. Possible sources of biological and technical biases that could affect our results such as gender-specific and low quality CpGs were excluded from the study [14–16]. Methylation microarray data have been deposited at Gene Expression Omnibus data repository (GSE39626).

Differential DNA methylation analysis

Since there is no consensus strategy for differential methylation analysis, we used three different approaches. First, CpG sites were categorized as hyperM when β values were <0.25 in the reference samples and >0.75 in at least 10% of NB samples, and hypoM when β values were >0.75 in the reference samples and <0.25 in at least 10% of NB samples. Second, differential methylation was defined as mean β values between NB and reference samples showing an absolute difference greater than 0.25 [17]. Finally, an unpaired t-test was performed using Step Down Permutation (SDP) [18] and False Discovery Rate (FDR) analyses [19]. Venn diagrams were used to compare lists of differentially methylated CpGs (<http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/venn.cgi>) and only those concomitantly identified by all three classification criteria were defined as differentially methylated.

Hierarchical clustering and principal component analysis

Unsupervised and supervised agglomerative hierarchical clustering were performed using the Cluster Analysis tool from Bead Studio (version 3, Illumina Inc, USA). Principal Component Analysis (PCA) was performed with R (www.r-project.org) using the FactoMineR package available through Bioconductor.

Bisulfite pyrosequencing

To validate DNA methylation data, bisulfite pyrosequencing (BPS) analysis was performed as previously described [20]. Briefly, genomic DNA was bisulfite converted using EpiTect Plus Bisulfite Conversion Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. A subsequent PCR amplification was performed using biotinylated primers (Table S1B). Pyrosequencing and data analysis were performed with the pyrosequencer analyzer PyroMark Q96 (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions.

Gene expression analysis

To assess expression levels of differentially methylated genes, publicly-available expression microarray data sets [21–23] with representative NB tumor spectra were analyzed. Raw data was normalized to a z-score transformation. Unpaired t-test analysis adjusted by SDP and FDR was performed. Genes with a

Table 1. Patients' clinical and biological characteristics.

Characteristics	Methylation Array Samples (n=22)	Independent Sample Set (n=13)
Age, months		
Median	28,9	32,6
Range	0–120	0–216
INSS, n (%)		
Stage 1–3	11 (50)	5 (38,5)
Stage 4	7 (31,8)	6 (46,2)
Stage 4S	4 (18,2)	2 (15,3)
MYCN status, n (%)		
Amplified	5 (22,7)	10 (76,9)
Non-amplified	16 (72,8)	3 (23,1)
Undetermined	1 (4,5)	0

The NB cohort used for genome-wide methylation analysis (Methylation Array Sample Set) as well as the NB cohort used for bisulfite pyrosequencing, mRNA gene expression and DNA copy number variation analyses (Independent Sample Set) are reported in the table.
doi:10.1371/journal.pone.0048401.t001

statistically significant differential expression ($p < 0.01$), z-score > 1 in $> 50\%$ of samples, were considered differentially expressed.

For candidate genes, total RNA isolation and gene expression quantification was performed for 10 cases included in the methylation array and an independent set of 13 NB samples using quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) as previously described [22] (Table S1B).

Bioinformatic annotation of differentially methylated genes

The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) was used for gene-annotation enrichment analysis and biological pathway mapping [24]. Probability (Benjamini-Hochberg correction) lower than 0.05 was considered statistically significant.

Differentially methylated genes were classified according to their chromosomal localization. Probability distribution analysis was performed to determine potential chromosome enrichment. P -value < 0.05 was considered statistically significant.

Promoter classification of differentially methylated genes into promoters with high (HCP), intermediate (ICP), low (LCP) and mixed CpG content, as well as the identification of Polycomb (PcG) target genes was performed as previously reported [14].

Hypergeometric probability distribution analysis with a probability cut-off < 0.05 , was performed to determine hyperM or hypoM chromosome enrichment and to determine promoter type and PcG-mark enrichment in differentially methylated genes. Analyses were performed with SPSS version 15.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL).

Results

DNA methylation profiling and identification of differentially methylated genes in NB

In order to investigate the pattern of DNA methylation in NB, we analyzed 22 primary NB tumors using the Infinium HumanMethylation27 BeadChip microarray. Two GN, 1 GNB, as well as, normal human FB and AG tissues were used as reference samples to identify differentially methylated genes specific for NB.

We initially performed a quality control of the data obtained from the microarray analysis and excluded 3337 gender-specific and low quality CpGs. Additionally, one NB sample (NT18, Table S1A) was excluded because of poor detection p -values.

Unsupervised Principal Component Analysis (PCA) performed on all the samples included in the study, showed that NBs display a clearly distinct DNA methylation profile as compared to normal reference samples (FB and AG) and the clinically less aggressive GNB and benign GN (Figure 1A), being these two entities epigenetically undistinguishable from normal reference samples. In order to identify differentially methylated genes in NB, supervised analyses were performed using independently three different reference samples (FB, AG and 2 GN with 1 GNB). By comparing gene lists generated by these analyses we were able to identify a common set of 351 genes, being 23 hyperM and 328 hypoM, in NB (Figure 1B, Table S2A). This set of genes will be hereafter referred as NB-specific genes. We then performed a supervised hierarchical cluster and a PCA using the hyperM and hypoM gene sets separately. Remarkably, the DNA methylation pattern of hyperM genes allowed us to differentiate NBs with diverse *MYCN* amplification status. Interestingly, hypoM genes segregated NBs by their age at diagnosis, clustering those with 5 or more years separately from younger patients (Figure 1C and 1D).

The NB-specific genes were ranked according to the percentage of samples found differentially methylated and the level of β value changes. The most clearly hyperM genes in our series were *EMP1*, *RASSF1A*, *ACTC*, *GNG12*, *HOXD3*, *PAMR1*, *IL17RC*, *CARD11*, *POU2F2* and *P2RY6* (Table S2B). Among these, *RASSF1A* and *POU2F2* have previously been described methylated in NB tumors and cell lines. Here, both genes showed clearly increased methylation levels in $\geq 80\%$ of the NB samples, which is consistent with prior reports [5,7,25]. Besides, to our knowledge only *HOXD3* has previously been described hyperM in cancer, specifically in prostate carcinoma [26,27].

Applying the same strategy, 69 genes were clearly hypoM in NB (Table S2B). Notably, among these we identified *CCND1*. This gene has been reported to be highly expressed in a significant portion ($> 75\%$) of NB tumors and cell lines [10,28]. The 17 CpGs analyzed across the length of the *CCND1* locus revealed a complex epigenetic pattern in NB cases and control samples (Figure 2A). In NB, we observed a reduction of DNA methylation levels at 12 of 17 CpG sites and a significant hypomethylation, using stringent criteria, only at two CpGs (Target IDs cg04717045 and cg02723533). Unexpectedly, DNA methylation loss was observed outside the 5' region of *CCND1*, which was unmethylated in NB cases and control samples. Hypomethylation within the gene-body was not considered significant due to epigenetic heterogeneity in the reference samples (Figure 2A). The 3' untranslated region (3'-UTR), in contrast, was consistently methylated in reference samples and hypomethylated in a large fraction of NBs. At the two significantly hypoM sites, 17 of 21 NB lose methylation as compared to all the reference samples (β value > 0.90), being 11 of them markedly hypoM (Figure 2A).

DNA methylation changes in clinically and biologically relevant NB subgroups

A supervised approach was used to analyze differential DNA methylation profiles between clinical and biologically relevant NB subgroups.

High-risk (HR) NBs ($n = 9$), defined as stage 4 and *MYCN* amplified (*MYCN* A) tumors, were compared with low-risk (LR) NBs ($n = 8$), which include stage 1 to 3 *MYCN* non-amplified (*MYCN* NA) tumors. A total of 19 clearly differentially methylated genes were identified. Five genes were hyperM in HR with respect to LR NB and reference samples, whereas no hypoM gene was observed in this clinical subgroup. In contrast, hyperM was not observed in LR NBs whilst 14 genes exhibited *de novo* loss of methylation in this clinically favorable subgroup (Table S2C).

We next compared the two clinically relevant metastatic NB subgroups, i.e. stage 4 ($n = 6$) and stage 4S ($n = 4$) NBs. We identified a total of 9 differentially methylated genes. Of these, 2 genes were hyperM in at least 3 of 4 stage 4S NBs and no hyperM was detected in stage 4 NBs. With regard to hypoM, 5 and 2 genes were observed in stage 4S and 4 NBs, respectively (Table S2C).

Comparing *MYCN* A ($n = 5$) and NA ($n = 15$) tumors, we identified 23 differentially methylated genes (7 hyperM and 16 hypoM) in *MYCN* amplified with respect to non-amplified tumors and reference samples (Table S2C).

Finally, we compared NBs based on patient's age at diagnosis using the clinically-established 18 month age cut-off, i.e. < 18 months ($n = 11$) and ≥ 18 months ($n = 10$). According to our selection criteria, no consistently differentially methylated genes were identified, most likely due to the high heterogeneity in both subgroups. Based on the supervised PCA analysis shown in Figure 1D, we observed that patients with 5 or more years of age segregated separately from the younger patients, suggesting different underlying methylation patterns. A supervised analysis

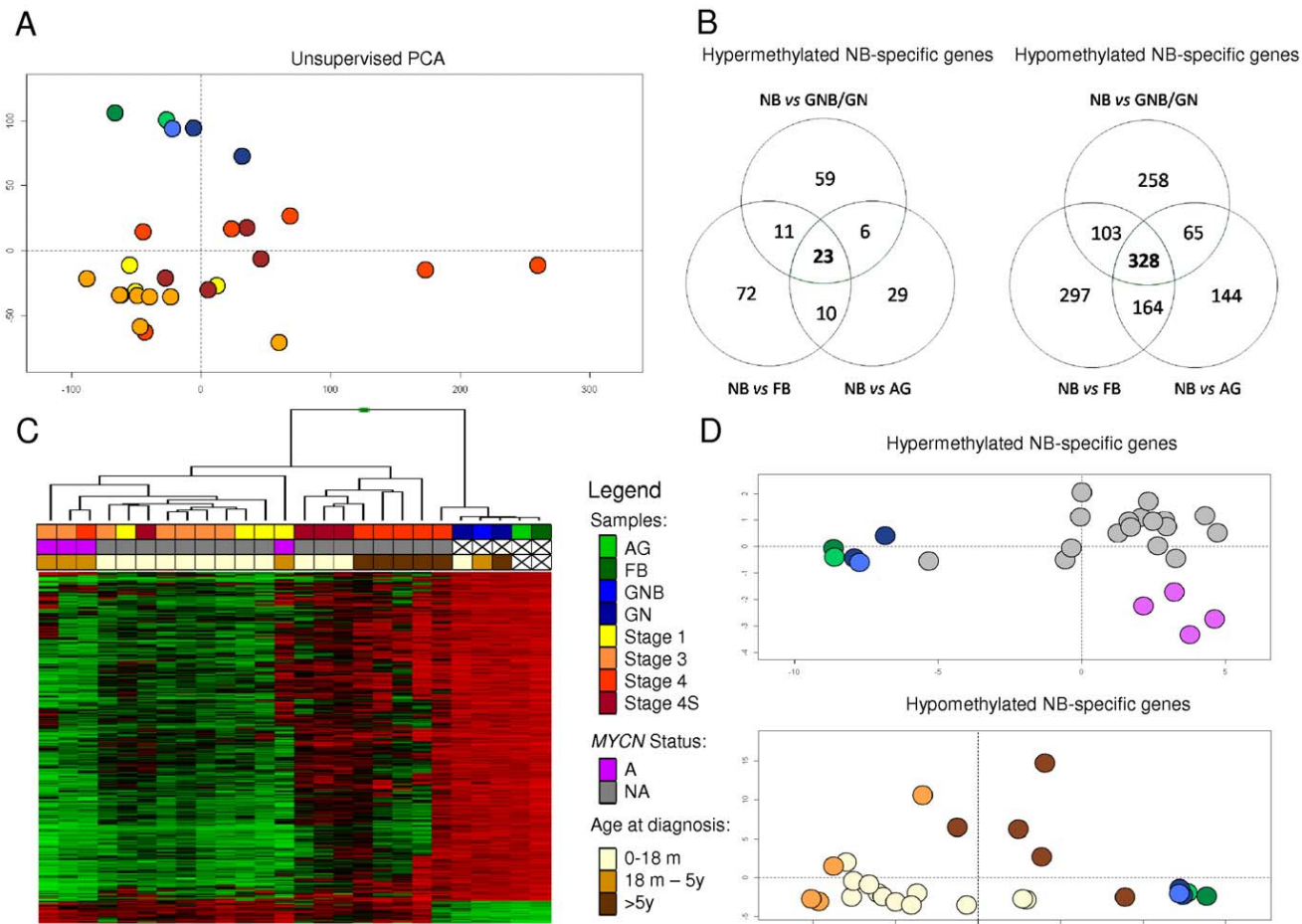


Figure 1. DNA methylation profiling and identification of differentially methylated genes in NB. **A:** Unsupervised Principal Component Analysis (PCA) of array-based DNA methylation data in 21 neuroblastomas (NB) (classified according to INSS Stage), 2 ganglioneuroma (GN), 1 ganglioneuroblastoma (GNB); and normal reference samples: fetal brain (FB) and adrenal gland (AG). **B:** Venn diagram showing the strategy used to identify NB-Specific genes. Hypermethylated and hypomethylated genes in NB were determined using three different supervised analyses with distinct reference samples (FB, AG and GN/GNB). **C:** Supervised hierarchical cluster analysis of DNA methylation data from NB-specific genes in 21 NB samples, 2 GN, 1 GNB; and 2 normal reference samples: FB and AG. **D:** Supervised Principal Component Analysis (PCA) in 21 NB samples, 2 GN, 1 GNB; and normal reference samples: FB and AG for NB-specific genes. doi:10.1371/journal.pone.0048401.g001

was thus performed using two age cut-offs, 18 months and 5 years (i.e. 0 to <18 months ($n = 12$), ≥ 18 months to <5 years ($n = 4$), ≥ 5 years ($n = 5$)). Differences between the methylation patterns of the three age subgroups were observed. However, methylation was heterogeneous in patients younger than 5 years, but clearly distinct from the older NB patients (Table S2C). Applying only a 5 year age cut-off (<5 years, $n = 16$ and ≥ 5 years, $n = 5$), we identified a clear DNA methylation pattern characterized by a set of genes with a consistent loss of DNA methylation in patients younger than 5 years of age compared with the older patients, the latter being similar to reference samples (Table S2C).

Technical and clinical validation of candidate genes by pyrosequencing

DNA bisulfite pyrosequencing of 3 NB-specific candidate genes (*EMPI*, *GNG12* and *CCND1*) as well as of *EPSTII*, which is differentially methylated in clinically relevant NB subgroups, was performed to validate DNA methylation array data. Two NB tumors included in the microarray as well as an independent cohort of 13 NB and 2 GN samples were used for this aim. First,

the degree of correlation between microarray DNA methylation and BPS data was tested and found to be significantly high ($r = 0.958$, $p < 0.001$) (Figure S1).

Consistent with the array results, *EMPI* and *GNG12* NB-specific genes showed high methylation levels compared to reference samples in all the NB cases of the validation set ($n = 13$) (Figure S2B and S2C). *CCND1* showed a clear loss of methylation in 10 of the 13 independent NBs tested, which is in line with the proportion of hypoM cases identified by the methylation array (Figure 2A, 2B and 2C, Figure S2A). *EPSTII* methylation analysis in the validation series also confirmed the array data (Figure S2D).

Association between DNA methylation and gene expression

To investigate whether differential DNA methylation in NB is associated with gene expression, we analyzed published gene expression data of independent and representative NB tumor sets [21–23]. Expression data was available for 13 of 23 hyperM and 136 of 328 hypoM NB-specific genes (Table S3A). Five of thirteen (38.4%) hyperM genes showed lower expression levels as

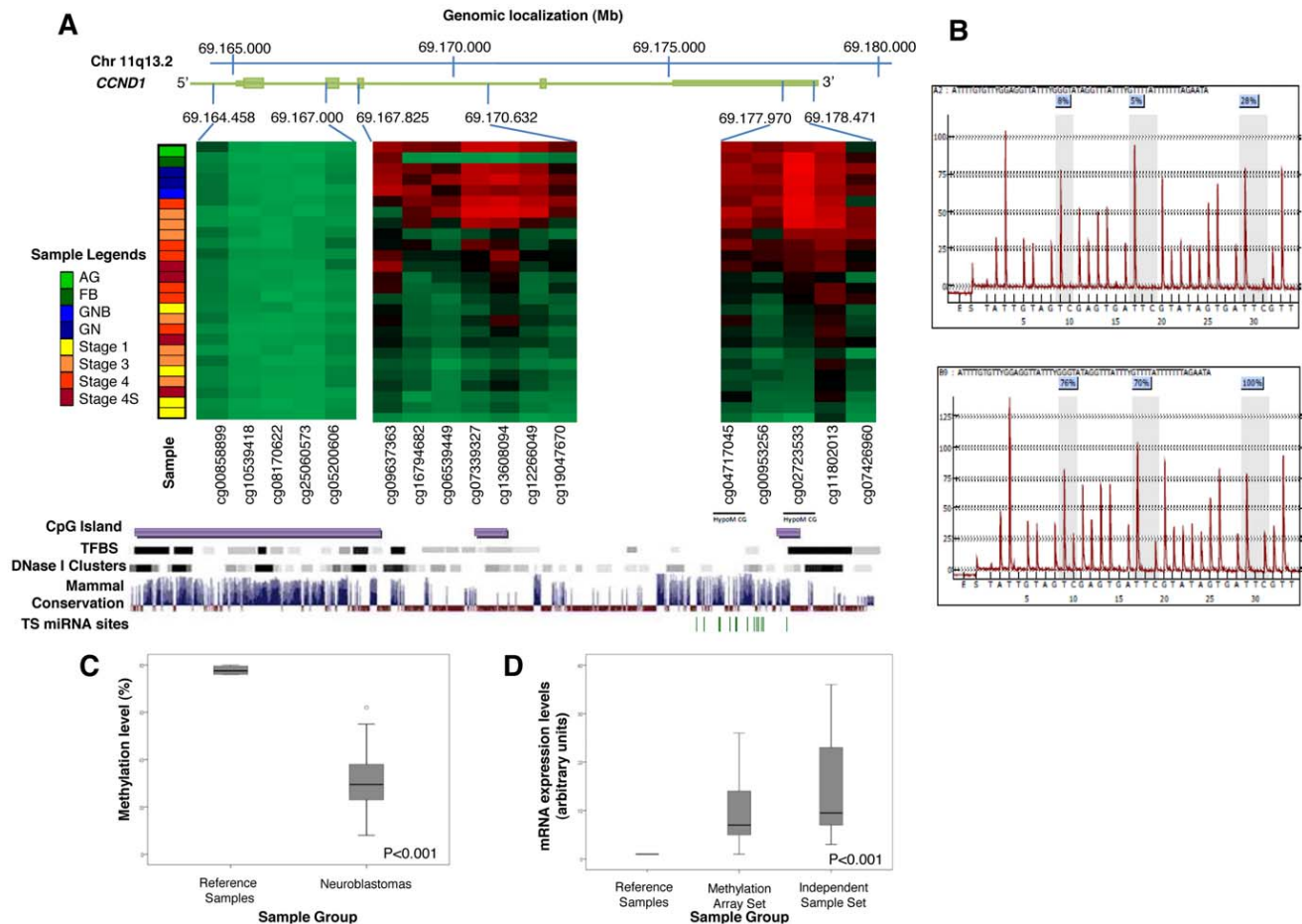


Figure 2. Methylation and expression data of *CCND1*. **A:** Graphical display of the DNA methylation levels of the 17 CpGs measured across the *CCND1* length. The heatmap shows the data from 21 neuroblastoma (NB) and reference samples (2 GN, 1 GNB; 1 FB and 1 AG). Below the heatmap we show some genomic features of the *CCND1* locus (UCSC Genome Browser, data from the hg19 adapted to the hg18) including Transcription Factor binding sites (TFBS), evolutionary conserved DNaseI hypersensitive domain (DNaseI cluster) and Vertebrate Multiz Alignment, PhastCons Conservation (Mammal Conservation) and miRNA target sites (TS). **B:** DNA methylation-specific pyrograms for *CCND1*. The pyrogram above corresponds to a neuroblastoma sample whereas the pyrogram below corresponds to a reference sample (FB). Grey shading shows the percentage of methylation observed for the CpGs analyzed. **C:** Box-plot for DNA methylation data of *CCND1* obtained by bisulfite pyrosequencing in an independent cohort of 13 NB and 2 GN samples and reference samples. **D:** mRNA expression levels of *CCND1* analyzed by qRT-PCR in two NB independent cohorts. doi:10.1371/journal.pone.0048401.g002

compared to reference samples. In contrast, 10 of 136 genes (7.3%) with lower methylation levels were highly expressed in NB as compared to reference samples. These results are in line with previous studies reporting that only a fraction of genes with promoter hypomethylation show a significant increase in gene expression, being, possibly, conditioned to specific activation [29–30].

To validate if differential DNA methylation in NB is associated with gene expression changes, we analyzed 5 candidate genes by qRT-PCR in 23 NBs with available RNA (10 cases included in the methylation array and an independent set of 13 NB samples). In general, hyperM genes showed lower expression levels in NB samples compared to reference samples. Likewise, most hypoM genes showed higher expression levels in the NB tumors with respect to reference samples, confirming microarray data (data not shown). *CCND1* was found to be highly expressed in all NB samples, consistent with previous reports [10,31] (Figure 2D).

Biological and functional features of differentially methylated genes in NB

Differentially methylated genes were functionally characterized using bioinformatic approaches. A gene ontology (GO) analysis of genes hypoM in NB allowed the identification of significantly enriched ($p < 0.05$) functions such as defense response, immune response, immune system process, response to stimulus and epidermis development (Table S3B). Due to the small sample size, gene sets derived from other comparisons did not result in any significantly enriched GO term.

Most studies in adult tumors have reported that hyperM genes are enriched in promoters with high CpG content (HCP) and PRC2 target genes in embryonic stem cell (ESC) [17]. Remarkably, in our series, the group of hyperM genes showed a loss for HCP promoters (21.7% vs. 53.5% in the background, $p = 0.072$) and an enrichment for ICP promoters (34.78% vs. 11.68% in the background, $p = 0.012$). No significant enrichment for PRC2 targets was observed (13% vs. 9.6% in the background, $p = 0.49$). In contrast, hypoM genes showed the previously reported pattern [17], i.e. they were associated with an increase for low CpG

content promoters (LCP) (68.3% vs. 22.6% in the background, $p < 0.001$) and a decrease of PRC2 targets (3.3% vs. 9.6% in the background, $p < 0.001$) (Table S3C).

To determine if differential methylation in NB occurs homogeneously throughout the genome, the chromosome distribution of NB-specific genes was analyzed. Given the small number of hyperM genes no significant enrichment or grouped tendency was observed (Table S3D). Conversely, a significant portion of hypoM genes mapped to chromosomes 1 (48 genes), 17 (25 genes), 19 (58 genes) and 21 (9 genes) ($p < 0.05$ for all) and showed chromosome specific localization. These genes mapped to specific chromosome regions 1p36 (20%) and 1q21 (25%), chromosome 17p13 and 17q21 (both 27%), whereas the majority of genes identified on chromosome 19 were restricted to 19p13 ($> 70\%$; 43 of 58), and all chromosome 21 hypoM genes mapped to 21q22 (9/9).

Discussion

In the present study, we have analyzed the pattern of differential methylation in primary NB samples using microarray-based DNA methylation analysis. Unsupervised PCA showed that DNA methylation profiles in NB are clearly distinct from those of the clinically less aggressive GNB and benign GN and the normal reference samples used in this study (Figure 1A). Differential DNA methylation analysis using stringent criteria enabled us to identify DNA methylation changes characteristic of NB tumors. Interestingly, the pattern of hyperM and hypoM was found to be associated with clinic-biologically relevant subgroups of NB tumors. Specifically, the DNA methylation pattern of hyperM genes allowed us to differentiate NBs with diverse *MYCN* amplification status. HypoM genes segregated cases according to age at diagnosis, clustering those with 5 or more years separately from younger patients (Figure 1D). Supervised DNA methylation analysis comparing well-known NB clinical subgroups confirmed the existence of differentially methylated genes between high and low risk tumors, *MYCN* A from NA tumors as well as stage 4 from stage 4S NB. Previous reports analyzing specific candidate genes have identified hypermethylated genes associated with *MYCN* amplification status in NB cell lines and tumors [4], thus corroborating the existence of subgroup-specific DNA methylation patterns in NB. However, no consistent DNA methylation differences were identified when comparing subgroups using the clinically established prognostic age cut-off of 18 months. In contrast, in line with the analysis shown in Figure 1D, a consistent loss of DNA methylation was observed in patients younger than 5 years as compared to older patients and reference samples (Table S2C). In NB, age at time of diagnosis is a powerful marker of tumor behavior, and is thus critical in the prognostic evaluation of this developmental malignancy [32]. Traditionally, patient's age has been analyzed as a binary function, with a cut-off point initially established at 12 months and recently set at a more optimal prognostic age cut-off of 18 months [32]. However, the International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system) evaluates the prognostic impact of the histological features of the tumor considering two age cut-offs at time of diagnosis: 18 months and 5 years [33]. Interestingly, although we observed age-related DNA methylation patterns recalling these two age cut-offs, they were more consistent using the 5 years cut-off.

Overall, we observed that loss of DNA methylation is more prevalent than promoter hyperM in NB. This is in line with the well known global hypomethylation of cancer cell DNA, generally believed to affect repetitive sequences and satellite DNA and to contribute to the generation of chromosomal instability [2].

Therefore, gene-specific hypomethylation has not been extensively studied. Interestingly, we observed that hypoM affected genes relevant to NB pathogenesis such as *CCND1*. Cyclin D1 is a regulator subunit of cyclin-dependent kinases required for cell cycle G1/S transition that has been described highly expressed in various types of solid tumors as well as in more than 75% of NBs. The cause of *CCND1* overexpression in these tumors is greatly unknown. High-level amplifications of *CCND1* have been reported only in a small percentage (2%) of NB tumors [10]. Therefore, mechanisms other than gene amplification seem to be responsible for increased *CCND1* expression [34]. Recently, *GATA3*, a transcription factor overexpressed in NB, has been reported to be implicated in *CCND1* overexpression [35]. In this study, we observed loss of *CCND1* gene methylation in more than 70% of the NB tumors analyzed, associated with high *CCND1* expression levels and absence of gene amplification (data not shown). Differentially methylated CpGs were not localized in the promoter region but in the 3' untranslated region (Figure 2A). Interestingly, based on the data available in the UCSC Genome Browser (GRCh37/hg19), the 3'-UTR of *CCND1* is an evolutionary conserved DNaseI hypersensitive domain highly enriched for microRNA target sites and Transcription Factor binding sites, including *GATA3*, *MYC*, *FOXA1/2* and *JUND*, among others. Experimental data supporting the functional role of the 3'-UTR region in the expression of *CCND1* have been reported in mantle cell lymphomas (MCL), where in addition to the fusion of *CCND1* gene on chromosome 11 to the immunoglobulin heavy chain enhancer, the loss of the 3'-UTR has been linked to hyperproliferative MCL [36]. However, *CCND1* rearrangements leading to loss of the 3'-UTR have been observed only in a very small percentage of NBs [10]. Noteworthy, in our series *CCND1* hypoM occurs in the presence of *RASSF1A* promoter hyperM. Selective epigenetic silencing of *RASSF1A* is a common event in human cancer, including NB where it has been reported hypermethylated in $> 75\%$ of tumors [5,25]. Ras association domain family 1 isoform A is a tumor suppressor that negatively regulates cell proliferation by inhibiting cyclin D1 protein accumulation through posttranscriptional mechanisms [37]. *RASSF1A* hyperM has previously been inversely associated with cyclin D1 expression and tumor cell proliferation [38]. It is thus tempting to speculate that loss of *CCND1* gene methylation in the 3'-UTR regulatory region and concomitant hypermethylation of *RASSF1A* could represent a potential mechanism underlying *CCND1* gene overexpression in NB.

Loss of methylation also affected genes with cancer-related biological functions i.e. *SPRR3*, previously reported as hypomethylated in cancer, specifically in hepatocellular carcinoma [39]. Overexpression of *SPRR3* has been reported to promote breast and colon cancer proliferation by enhancing p53 degradation via the *AKT* and *MAPK* pathways [40,41]. HypoM also affected genes reported to stimulate cell proliferation, i.e. *BTC*, *EGF* and *FGF6*. Betacellulin, member of the EGF family, has recently been reported to induce proliferation of neural stem cells and prevent spontaneous differentiation in cell culture via both the EGF receptor (*EGFR*) located in NSCs and *ErbB4* on neuroblasts [42]. The epidermal growth factor also acts via the *EGFR* to stimulate cell proliferation and neoplastic transformation. Fibroblast growth factor 6, a FGF family member, is implicated in self-renewal and maintenance of pluripotency of ES and iPS cells [43].

On the other hand, epigenetically suppressed genes included genes involved in tissue development and differentiation. Among these, *POU2F2*, previously described as being hypermethylated in NB tumors and cell lines, encodes a transcription factor involved in neuronal differentiation [7,44]. Homeobox D3, member of the

Hox gene family, has been described associated with the modulation of cell-adhesive properties during embryonic development [45]. Aberrant methylation of *HOXD3* has not been described previously in NB, but has recently been reported as a novel biomarker of prostate cancer progression together with *RASSF1A*, *TGF- β* and *APC* [27]. Differentiation-related genes included *IRF6*, which encodes a transcription factor that regulates craniofacial development and epidermal proliferation. *IRF6* downregulation has been correlated with promoter methylation in invasive squamous cell carcinomas [46]. Epithelial membrane protein-1, a member of the peripheral myelin protein 22 family expressed in first differentiating neurons, has been described involved in neural differentiation [47]. Downregulation of *EMPI* has been described in squamous cell lung carcinoma suggesting a potential tumor suppressor function [48].

The functional characterization of differentially methylated genes revealed that hyperM occurs predominantly at ICP promoters, while hypoM affects mostly LCP genes, regardless of the NB subgroup studied. Moreover, the vast majority of changes of DNA methylation were observed in genes that are not targets of PcG proteins in ESCs. These findings are in contrast with most other tumors in which *de novo* methylation affects predominantly genes with dense CpG island promoters highly enriched for PcG targets [14,16,17]. The epigenetic features of NB identified in this study may be related to the embryonic origin of this developmental disease, fundamentally different from that of adult cancers. Additionally, chromosome distribution of NB-specific genes showed that global DNA hypoM in NB is organized not only at the functional level but also at spatial level since it significantly affects specific chromosomes as well as chromosomal regions previously described to be recurrently altered in NB.

This study provides a genome-wide view of the DNA methylation landscape in NB. However, it is worth mentioning that our conclusions are based on a small cohort of cases which may have led to an overestimation of the data, and that the array used does not differentiate 5-methylcytosine from 5-hydroxymethylcytosine. In spite of these caveats, our findings suggest that hypoM is a prevalent epigenetic alteration in NB that affects cancer-related biological functions and specific genes relevant for NB pathogenesis, such as *CCND1*. Moreover, hypomethylation involves chromosomal regions recurrently altered in this malig-

nancy. Our findings also provide evidence for the existence of DNA methylation profiles characteristic of NB. We identified specific DNA methylation changes associated with clinical and genetic features of NB tumors, suggesting altered DNA methylation patterns as a critical factor for NB tumorigenesis.

Supporting Information

Figure S1 Technical validation of methylation analysis. (TIFF)

Figure S2 Biological validation of methylation analysis. (TIFF)

Table S1 Table S1A: Clinical and biological data of samples. Table S1B: Primer information. (XLSX)

Table S2 Table S2A: Methylation status of the CpG dinucleotide analyzed to identify NB-specific genes. Table S2B: NB-specific ranked genes. Table S2C: Differentially methylated genes in NB subgroups. (XLSX)

Table S3 Table S3A: Gene expression data from microarrays of NB-specific genes. Table S3B: Gene-ontology terms enrichment for differentially methylated genes. Table S3C: Polycomb Repressive Complex 2 (PCR2) target genes and promoter class distribution of NB-specific genes. Table S3D: Chromosomal distribution of NB-specific genes. (XLSX)

Acknowledgments

Authors would like to thank Gloria Garcia Castellvi and Mercè Tura for their remarkable fund raising support and Nuria Russiñol for her excellent technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CL GM JIM-S JR. Performed the experiments: CL GM JIM-S JR AQ MK SG. Analyzed the data: CL GM JIM-S JR AQ MK MS SG. Contributed reagents/materials/analysis tools: CL GM JIM-S JR AQ MK ME IG CdT ER PG JM. Wrote the paper: CL GM JIM-S JR JM.

References

1. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007) Neuroblastoma. *Lancet* 369: 2106–2120.
2. Esteller M (2008) Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med* 358: 1148–1159.
3. Baylin SB, Jones PA (2011) A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 11: 726–734.
4. Alaminos M, Davalos V, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M (2004) Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst* 96: 1208–1219.
5. Michalowski MB, de Fraipont F, Plantaz D, Michelland S, Combaret V, et al. (2008) Methylation of tumor-suppressor genes in neuroblastoma: The *RASSF1A* gene is almost always methylated in primary tumors. *Pediatr Blood Cancer* 50: 29–32.
6. Kamimatsuse A, Matsuura K, Moriya S, Fukuba I, Yamaoka H, et al. (2009) Detection of CpG island hypermethylation of caspase-8 in neuroblastoma using an oligonucleotide array. *Pediatr Blood Cancer* 52: 777–783.
7. Carén H, Djos A, Nethander M, Sjöberg RM, Kogner P, et al. (2011) Identification of epigenetically regulated genes that predict patient outcome in neuroblastoma. *BMC Cancer* 11: 11–66.
8. Grau E, Martínez F, Orellana C, Canete A, Yañez Y, et al. (2011) Hypermethylation of apoptotic genes as independent prognostic factor in neuroblastoma disease. *Mol Carcinog* 50: 153–162.
9. Buckley PG, Das S, Bryan K, Watters KM, Alcock L, et al. (2011) Genome-wide DNA methylation analysis of neuroblastic tumors reveals clinically relevant epigenetic events and large-scale epigenomic alterations localized to telomeric regions. *Int J Cancer* 128: 2296–2305.
10. Molenaar JJ, van Sluis P, Boon K, Versteeg R, Caron HN (2003) Rearrangements and increased expression of cyclin D1 (*CCND1*) in neuroblastoma. *Genes Chromosomes & Cancer* 36: 242–249.
11. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, et al. (1993) Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 11: 1466–1477.
12. Bibikova M, Le J, Barnes B, Saedinia-Melnyk S, Zhou L, et al. (2009) Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium[®] assay. *Epigenomics* 1: 177–200.
13. Kanduri M, Cahill N, Göransson H, Enström C, Ryan F, et al. (2010) Differential genome-wide array-based methylation profiles in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 115: 296–305.
14. Martín-Subero JI, Kreuz M, Bibikova M, Bentink S, Ammerpohl O, et al. (2009) New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling. *Blood* 113: 2488–2497.
15. Martínez R, Martín-Subero JI, Rohde V, Kirsch M, Alaminos M, et al. (2009) A microarray-based DNA methylation study of glioblastoma multiforme. *Epigenetics* 4: 255–264.
16. Richter J, Ammerpohl O, Martín-Subero JI, Montesinos-Rongen M, Bibikova M, et al. (2009) Array-based DNA methylation profiling of primary lymphomas of the central nervous system. *BMC Cancer* 9: 455.
17. Martín-Subero JI, Ammerpohl O, Bibikova M, Wickham-García E, Agirre X, et al. (2009) A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms. *PLoS One* 4: e6986.

18. Westfall PH and Young SS (1993) Resampling-based Multiple Testing: Examples and Methods for p-values Adjustment. New York: John Wiley & Sons Inc.
19. Benjamini Y and Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 57: 289–300.
20. Tost J and Gut I (2007) DNA methylation analysis by Pyrosequencing. *Nat Protoc* 2: 2265–2275.
21. Wang Q, Diskin S, Rappaport E, Attiyeh E, Mosse Y, et al. (2006) Integrative genomics identifies distinct molecular classes of neuroblastoma and shows that multiple genes are targeted by regional alterations in DNA copy number. *Cancer Res* 66: 6050–6062.
22. Lavarino C, Garcia I, Mackintosh C, Cheung NK, Domenech G, et al. (2008) Differential expression of genes mapping to recurrently abnormal chromosomal regions characterize neuroblastic tumours with distinct ploidy status. *BMC Med Genomics* 1: 36.
23. Lavarino C, Cheung NK, Garcia I, Domenech G, de Torres C, et al. (2009) Specific gene expression profiles and chromosomal abnormalities are associated with infant disseminated neuroblastoma. *BMC Cancer* 9: 44.
24. Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, et al. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4: P3.
25. Hesson LB, Cooper WN, Latif F (2007) The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis Markers* 23: 73–87.
26. Kron K, Pethe V, Briollais L, Sadikovic B, Ozcelik H, et al. (2009) Discovery of novel hypermethylated genes in prostate cancer using genomic CpG island microarrays. *PLoS One* 4: e4830.
27. Liu L, Kron KJ, Pethe W, Demetrashvili N, Nesbitt ME, et al. (2011) Association of tissue promoter methylation levels of APC, TGF β 2, HOXD3 and RASSF1A with prostate cancer progression. *Int J Cancer* 129: 2454–2462.
28. van Noesel MM, Versteeg R (2004) Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic 'danse macabre'. *Gene* 325: 1–15.
29. Stefanska B, Huang J, Bhattacharyya B, Suderman M, Hallett M, et al. (2011) Definition of the landscape of promoter DNA hypomethylation in liver cancer. *Cancer Res* 71: 5891–5903.
30. Calvanese V, Fernández AF, Urduingio RG, Suárez-Alvarez B, Mangas C, et al. (2012) A promoter DNA demethylation landscape of human hematopoietic differentiation. *Nucleic Acids Res* 40: 116–131.
31. Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, van Sluis P, van Noesel CJ, et al. (2008) Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma. *Cancer Res* 68: 2599–2609.
32. Sano H, Bonadio J, Gerbing RB, London WB, Matthay KK, et al. (2006) International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age. *Eur J Cancer* 42: 1113–1119.
33. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, et al. (1999) The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 86: 364–372.
34. Donnellan R, Chetty R (1998) Cyclin D1 and human neoplasia. *Mol Pathol* 51: 1–7.
35. Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, Santo E, Geerts D, et al. (2010) Cyclin D1 is a direct transcriptional target of GATA3 in neuroblastoma tumor cells. *Oncogene* 29: 2739–2745.
36. Deshpande A, Pastore A, Deshpande AJ, Zimmermann Y, Hutter G, et al. (2009) 3'UTR mediated regulation of the cyclin D1 proto-oncogene. *Cell Cycle* 8: 3584–3592.
37. Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA (2002) The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol* 22: 4309–4318.
38. Pizzi S, Azzoni C, Bottarelli L, Campanini N, D'Adda T, et al. (2005) RASSF1A promoter methylation and 3p21.3 loss of heterozygosity are features of foregut, but not midgut and hindgut, malignant endocrine tumors. *J Pathol* 206: 409–416.
39. Ammerpohl O, Pratschke J, Schafmayer C, Haake A, Faber W, et al. (2012) Distinct DNA methylation patterns in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 130: 1319–1328.
40. Kim JC, Yu JH, Cho YK, Jung CS, Ahn SH, et al. (2011) Expression of SPRR3 is associated with tumor cell proliferation in less advanced stages of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 133: 909–916.
41. Cho DH, Jo YK, Roh SA, Na YS, Kim TW, et al. (2010) Upregulation of SPRR3 promotes colorectal tumorigenesis. *Mol Med* 16: 271–277.
42. Gómez-Gaviro MV, Scott CE, Sesay AK, Matheu A, Booth S, et al. (2012) Betacellulin promotes cell proliferation in the neural stem cell niche and stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 1317–1322.
43. Chen G, Gulbranson DR, Yu P, Hou Z, Thomson JA (2012) Thermal stability of fibroblast growth factor protein is a determinant factor in regulating self-renewal, differentiation, and reprogramming in human pluripotent stem cells. *Stem Cells* 30: 623–630.
44. Theodorou E, Dalember G, Heffelfinger C, White E, Weissman S, et al. (2009) A high throughput embryonic stem cell screen identifies Oct-2 as bifunctional regulator of neuronal differentiation. *Genes Dev* 23: 575–588.
45. Taniguchi Y, Tanaka O, Sekiguchi M, Takekoshi S, Tsukamoto H, et al. (2011) Enforced expression of the transcription factor HOXD3 under the control of the Wnt1 regulatory element modulates cell adhesion properties in the developing mouse neural tube. *J Anat* 219: 589–600.
46. Botti E, Spallone G, Moretti F, Marinari B, Pinetti V, et al. (2011) Developmental factor IRF6 exhibits tumor suppressor activity in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 13710–13715.
47. Wulf P and Suter U (1999) Embryonic expression of epithelial membrane protein 1 in early neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 116: 169–180.
48. Zhang J, Cao W, Xu Q, Chen WT (2011) The expression of EMP1 is downregulated in oral squamous cell carcinoma and possibly associated with tumor metastasis. *J Clin Pathol* 64: 25–29.

Supporting Information to:

DNA Hypomethylation Affects Cancer-Related Biological Functions and Genes Relevant in Neuroblastoma Pathogenesis.

Gemma Mayol, José I. Martín-Subero, José Ríos, Ana Queiros, Marta Kulis, Mariona Suñol, Manel Esteller, Soledad Gómez, Idoia Garcia, Carmen de Torres, Eva Rodríguez, Patricia Galván, Jaume Mora and Cinzia Lavarino.

1. Figure S1. Technical validation of methylation analysis.

2. Figure S2. Biological validation of methylation analysis.

3. Table S1.

Table S1A: Clinical and biological data of samples.

Table S1B: Primer information.

4. Table S2.

Table S2A: Methylation status of the CpG dinucleotide analyzed to identify NB- specific genes.

Table S2B: NB- specific ranked genes.

Table S2C: Differentially methylated genes in NB subgroups.

5. Table S3.

Table S3A: Gene expression data from microarrays of NB-specific genes.

Table S3B: Gene-ontology terms enrichment for differentially methylated genes.

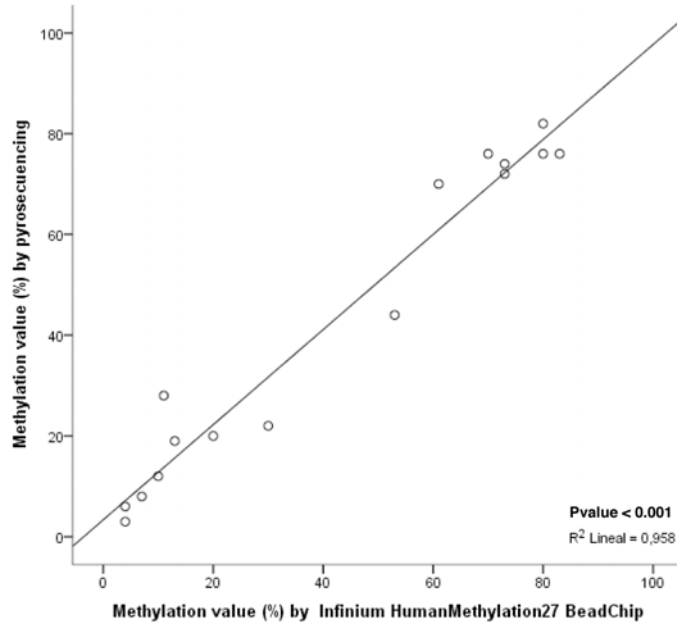
Table S3C: Polycomb Repressive Complex 2 (PCR2) target genes and promoter class distribution of NB-specific genes.

Table S3D: Chromosomal distribution of NB-specific genes.

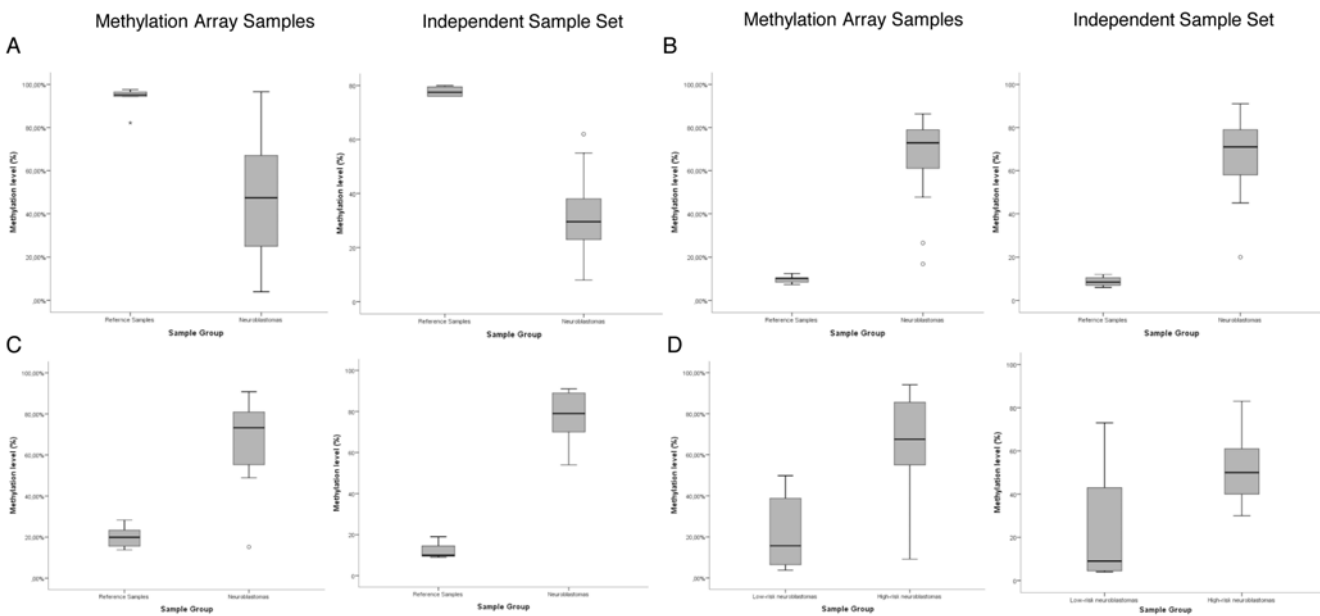
Todas las tablas (S1, S2 y S3) no se encuentran impresas a continuación, se encuentran en formato digital en el CD que acompaña esta tesis.

Figure S1

Scatter plot of bisulfite pyrosequencing and β values obtained on Infinium HumanMethylation27 BeadChip methylation levels, for 4 genes (*CCND1*, *GNG12*, *EMP1* and *EPST11*) in 4 samples (1 fetal brain, 1 adrenal gland and 2 neuroblastomas).

**Figure S2**

Box plots of β values obtained by Infinium HumanMethylation27 BeadChip (methylation array samples) and Bisulfite Pyrosequencing methylation levels (independent sample set), for A) *CCND1*, B) *EMP1*, C) *GNG12* and D) *EPST11*.



Discusión

Anexos

Abreviaciones

Bibliografía

Conclusiones

Discusión

Resultados

Hipótesis y Objetivos

Introducción

Los tumores neuroblásticos (TN) constituyen aproximadamente el 40% de los tumores extracraneales diagnosticados durante los primeros 4 años de vida y son la causa del 15% de las muertes por cáncer en niños menores de 15 años de edad (Kaatsch P 2010; Ora I y Eggert A 2011).

Estos tumores se originan en la glándula suprarrenal o en los ganglios del sistema nervioso simpático a partir de células primordiales derivadas de la cresta neural ya comprometidas en la diferenciación de las células ganglionares del sistema nervioso periférico. Un bloqueo en el proceso normal de diferenciación de los neuroblastos se postula cómo la causa fundamental de estos tumores (Mora J y Gerald W 2004; van Noesel MM y Versteeg R 2004).

Los TN están constituidos por una proporción variable de neuroblastos y células estromales de tipo Schwann. Histológicamente, el grado de diferenciación de los neuroblastos y la proporción de células estromales determinan la clasificación de los TN en tres grupos: neuroblastoma (NB) (predominio de neuroblastos indiferenciados o en diferenciación), ganglioneuroma (GN) (primordialmente células estromales y ganglionares [célula neuronal madura]) y ganglioneuroblastoma (GNB) (células estromales y ganglionares con focos de células neuroblásticas) (ver apartado 1.7). El comportamiento clínico de estos tumores depende intrínsecamente del grado de maduración de las células neuroblásticas y de la abundancia de estroma, siendo el GN la forma más madura y benigna, y el NB indiferenciado pobre en estroma el TN con mayor capacidad de proliferación, asociado a pronóstico desfavorable.

Los avances en el conocimiento de la biología de los TN adquiridos en los últimos 20 años, se han traducido en un incremento de la supervivencia de los pacientes. Actualmente una porción elevada (al menos el 60%) de los TN tienen una supervivencia excelente exclusivamente con cirugía. Sin embargo, los índices de supervivencia global del NB siguen estancados en cifras extremadamente pobres desde hace años, puesto que menos de un 50% de los pacientes con NB de biología desfavorable sobreviven a pesar de recibir tratamientos intensivos multimodales (Mora J *et al.* 2008; Modak S y Cheung NK V 2010).

El NB agrupa un espectro muy heterogéneo de tumores que evolucionan de forma radicalmente distinta, mostrando en ocasiones una proliferación agresiva, metastásica, resistente al tratamiento y con índices de supervivencia bajos, y en otras, un crecimiento loco-regional con pronóstico excelente. La variedad de comportamiento clínico del NB determina un enfoque terapéutico que puede variar entre un abordaje terapéutico intensivo multimodal que incluye quimioterapia, cirugía, radioterapia e inmunoterapia, o una actitud expectante (Mora J *et al.* 2006; Modak S y Cheung NK V 2010). Por lo tanto, el esfuerzo y el reto principal reside en la capacidad para discriminar el tumor con una biología agresiva de aquellos cuya biología es favorable.

En NB se han descrito numerosas variables clínico-biológicas que se asocian de forma significativa con la evolución clínica de este tumor (ver apartado 1.5 y 1.6). Entre ellas destacan por su importancia pronóstica: la edad del paciente al momento del diagnóstico, el estado de amplificación del oncogén *MYCN*, las ganancias y pérdidas de regiones cromosómicas concretas, las alteraciones del contenido de ADN (ploidía), la histología y el índice de proliferación de la célula tumoral.

Actualmente los sistemas de estratificación de riesgo clínico aceptados en NB, se basan en múltiples combinaciones de estas variables clínico-biológicas. Sin embargo, estos sistemas de predicción de pronóstico, aunque elaborados, en algunos casos se han mostrado insuficientes para determinar con precisión el grupo de riesgo clínico del tumor. Existen subtipos de NB biológicamente distintos que se hallan agrupados en un mismo estadiaje clínico y que reciben el mismo tratamiento a pesar de que evolucionan de manera diferente. Esto es especialmente importante en los NB loco-regionales, incapaces de metastatizar, que en su mayoría son biológicamente favorables pero en algunos casos, aunque poco frecuentes, pueden ser biológicamente agresivos y mortales para el paciente.

Las diferencias entre el pronóstico y la evolución clínica son un reflejo de las características genético-biológicas subyacentes del tumor que tienen su impacto en los perfiles de expresión génica (De Preter K *et al.* 2010). Nuestro grupo ha hallado, mediante un análisis de expresión génica con *microarrays*, perfiles transcripcionales de grupos de genes con capacidad de discriminar entre subgrupos con claras diferencias de comportamiento clínico y biológicamente distintos, como son los tumores cuasi-triploides (pronóstico favorable) y los tumores cuasi-diploides/tetraploides (pronóstico desfavorable) (Lavarino C *et al.* 2008).

La aneuploidía o alteración del número de cromosomas es un hallazgo muy frecuente en numerosas neoplasias (Gordon DJ *et al.* 2012). A diferencia de lo que ocurre en otros tumores, la hiperploidía se asocia con pronóstico favorable en NB. Recientemente, el Grupo Internacional de Riesgo de Neuroblastoma (INRG, del inglés *International Neuroblastoma Risk Group*) ha publicado el consenso internacional para incluir el índice de ADN de la célula tumoral, junto al estado alélico de la región cromosómica 11q23 y el estado de amplificación del oncogén *MYCN*, como biomarcador en su sistema de clasificación (Ambros PF *et al.* 2009). Consiguientemente, los genes hallados diferencialmente expresados entre NB cuasi-triploides (pronóstico favorable) y NB cuasi-diploides/tetraploides (pronóstico desfavorable), son susceptibles de poder representar un marcador molecular de pronóstico.

En NB, se han llevado a cabo varios estudios dirigidos al análisis de expresión con *microarrays* con el fin de identificar perfiles de expresión génica útiles para predecir el pronóstico de los pacientes (Ohira M *et al.* 2003 y 2005; Hiyama E *et al.* 2004; Takita J *et al.* 2004; Schramm A *et al.* 2005; Oberthuer A *et al.* 2006 y 2010; Vermeulen J *et al.* 2009; De Preter K *et al.* 2010). Sin embargo, la utilidad en la práctica clínica de los perfiles de expresión hallados se ve limitada por el número elevado de genes, la necesidad de cantidades elevadas de tejido tumoral adecuado, la necesidad de métodos estadísticos y computacionales complejos, y la baja reproducibilidad de los datos obtenidos. Para traducir estos perfiles en pruebas aplicables en clínica, es imprescindible reducir el número de genes y generar perfiles que puedan ser analizados con una técnica convencional como es la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR, del inglés *quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*).

Con este objetivo, nuestro grupo ha desarrollado un modelo estadístico de predicción de pronóstico basado en el patrón de expresión de genes hallados previamente diferencialmente expresados en NB con distinta ploidía (Lavarino C *et al.* 2008). El modelo ha sido desarrollado utilizando datos de expresión génica obtenidos mediante qRT-PCR de muestras de tejido tumoral de 96 NB primarios. Inicialmente se realizó un estudio exhaustivo de los perfiles de genes diferencialmente expresados mediante modelos univariantes de regresión de Cox y análisis de componentes principales (PCA, del inglés *Principal Component Analysis*). Estos análisis nos permitieron identificar tres genes *Chromodomain helicase DNA binding protein 5 (CHD5)*, *Platelet-activating factor acetylhydrolase 1B (PAFAH1B1)* y *Non-metastatic cells 1 protein (NME1)*, asociados de forma estadísticamente significativa con las variables de valoración de la evolución clínica, como son la supervivencia global (OS, del inglés *Overall Survival*) y supervivencia libre de evento (EFS, del inglés *Event Free Survival*). Asimismo, estos tres genes mostraron la capacidad de discriminar entre NB con distinto comportamiento clínico, por consiguiente, reúnen el potencial para convertirse en marcadores de pronóstico clínico. Este hallazgo llevo a nuestro grupo a preguntarse si la cuantificación del patrón de expresión de la combinación de los genes *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1* podría representar un marcador útil para la predicción del pronóstico de pacientes con NB.

A partir de la combinación lineal de los niveles de expresión de estos tres genes cuantificados por qRT-PCR, analizados por PCA y por modelos de regresión de Cox, hemos desarrollado un modelo estadístico con el objetivo de poder valorar el riesgo clínico de cada paciente en función de una única variable que incorporara el perfil de expresión de los tres genes.

La validez del modelo se testó utilizando datos de expresión obtenidos con qRT-PCR y de dos bases de datos públicas de *microarrays* de expresión incluyendo un total de 362 pacientes. En todas las cohortes analizadas el modelo mostró capacidad para clasificar de manera fiable los pacientes con evolución clínica distinta.

Análisis multivariantes mediante modelos de regresión de Cox mostraron como el modelo desarrollado es un marcador de predicción de pronóstico independiente respecto a marcadores actualmente aceptados para NB (edad del paciente, estado de amplificación de *MYCN*, estado alélico de 1p y estadiaje según el Sistema Internacional de Estadiaje del NB (INSS, del inglés *International Neuroblastoma Staging System*)). Asimismo, un análisis comparativo con los sistemas de estratificación de riesgo clínico internacionales basados en la combinación de diversas variables clínicas, morfológicas y biológicas, demostró la capacidad predictiva y la robustez de nuestro modelo basado únicamente en los niveles de expresión de tres genes. Cabe resaltar que el modelo propuesto también mostró una elevada capacidad para discriminar entre subgrupos de NB definidos por marcadores de pronóstico ya establecidos. Entre ellos, se observó una clara capacidad de clasificación de los pacientes con NB loco-regionales sin amplificación del oncogén *MYCN*. Estos resultados son relevantes, ya que para este subgrupo de tumores la predicción de su evolución clínica continua siendo un desafío, tal como demuestran los pacientes clasificados de riesgo clínico bajo o intermedio por parámetros actualmente utilizados para NB y que en cambio presentan una evolución clínica adversa. Estos resultados sugieren que el modelo desarrollado podría mejorar la clasificación de estos pacientes y, consiguientemente, su tratamiento.

Ejemplos de modelos de predicción de pronóstico, similares al nuestro, y patrones de expresión génica basados en un número reducido de genes con capacidad predictiva, han sido propuestos previamente para la determinación de pronóstico en linfoma difuso de células B grandes (6 genes, Lossos IS *et al.* 2004), carcinoma de riñón de células claras (3 genes, Yao M *et al.* 2008), sarcoma de partes blandas (3 genes, Hoffman AC *et al.* 2009) y cáncer de pulmón de célula no pequeña (5 genes, Chen HY *et al.* 2007). En NB, diversos estudios han propuesto sistemas de clasificación de riesgo clínico basados en perfiles transcripcionales generados por *microarrays* de expresión génica. Aunque estos perfiles han demostrado capacidad predictiva significativa, las listas de genes descritas hasta la fecha son demasiado extensas para poder ser implementadas en la práctica clínica de forma rutinaria; 144 genes (Oberthuer A *et al.* 2006 y 2010), 59 genes (Vermeulen J *et al.* 2009), 42 genes (De Preter K *et al.* 2010), 39 genes (Schramm A *et al.* 2005) y 19 genes (Wei JS *et al.* 2004). Nosotros hemos refinado la lista de genes hallados diferencialmente expresados, y reducido a tres el número de genes significativamente asociados con el comportamiento clínico del NB. Asimismo, hemos desarrollado un modelo estadístico de predicción de pronóstico basado en una técnica convencional como es la qRT-PCR, una técnica utilizada en la práctica clínica de forma rutinaria. Además, nuestro modelo ha mostrado una capacidad predictiva robusta e independiente de otros marcadores de pronóstico actualmente aceptados en NB.

En conclusión, el valor de este modelo viene dado por el número reducido de genes que lo componen, la viabilidad a nivel

técnico (qRT-PCR), la aplicabilidad a biopsias de tejido tumoral pequeñas, la rapidez y fácil interpretación además de la reproducibilidad de los resultados, y el bajo coste económico. Cabe destacar, que la valoración del potencial predictivo de este modelo y, consiguientemente, su viabilidad en la práctica clínica, precisa de una validación de forma prospectiva en cohortes independientes de NB.

Los tres genes que constituyen nuestro modelo estadístico de predicción de pronóstico han sido asociados previamente con la biología de los TN.

CHD5, es un gen supresor de tumores (GST) localizado en la región cromosómica 1p36.31, región recurrentemente perdida en NB (Mora J *et al.* 2000; White PS *et al.* 2005, Bagchi A *et al.* 2007). La expresión génica de esta cromohelicasa dependiente de ATP se encuentra restringida a tejidos neurales normales (Thompson PM *et al.* 2003) y ausente tanto en líneas celulares como en tumores primarios de NB con características clínico-moleculares asociadas a pronóstico desfavorable (histología indiferenciada, amplificación del oncogén *MYCN*, estadios avanzados de la enfermedad y pérdida de la región cromosómica 1p) (Thompson PM *et al.* 2003; Fujita T *et al.* 2008; Okawa ER *et al.* 2008). Estudios con *microarrays* también han observado niveles bajos de expresión de *CHD5* asociados a NB de pronóstico desfavorable (Schramm A *et al.* 2005; Lavarino C *et al.* 2008 y 2009; Vermeulen J *et al.* 2009).

PAFAH1B1, localizado en la región cromosómica 17p13.3, codifica para una proteína acetilhidrolasa específica de cerebro conservada evolutivamente (Reiner O 1999; Gressens P 2000). *PAFAH1B1* es un gen involucrado en el desarrollo del córtex cerebral, la regulación de la migración de las neuronas a las capas corticales y el crecimiento axonal (Cardoso C *et al.* 2002; Gambello M *et al.* 2003). *PAFAH1B1* regula el desarrollo de la corteza cerebral actuando sobre dos procesos: la proliferación de progenitores neuronales y la migración de las neuronas a las capas corticales. Mutaciones del gen *PAFAH1B1*, así como deleciones de la región cromosómica en la que se encuentra, producen diferentes grados de alteración del desarrollo de la corteza cerebral, que se pueden manifestar como diferentes tipos de anomalías congénitas y enfermedades mentales, como la lisencefalia y el síndrome de Miller-Dieker, entre otras (Reiner O 1999). Varios estudios han relacionado altos niveles de expresión de *PAFAH1B1* con NB de pronóstico favorable (Ohira M *et al.* 2003; Oberthuer A *et al.* 2010).

En nuestro estudio, observamos niveles elevados de expresión de *CHD5* y *PAFAH1B1* en tumores de bajo riesgo clínico, por lo tanto, asociados con una supervivencia más prolongada de los pacientes.

Contrariamente, los niveles de expresión de *NME1*, el tercer gen del modelo, se han identificado elevados en NB de alto riesgo clínico. Diversos estudios de expresión génica han hallado niveles de expresión de *NME1* elevados en NB clínicamente agresivos (Hailat N *et al.* 1991; Leone A *et al.* 1993; Hiyama E *et al.* 2004; Takita J *et al.* 2004; Schramm A *et al.* 2005; Vermeulen J *et al.* 2009; De Preter K *et al.* 2010). *NME1* está localizado en 17q21.3, una región cromosómica caracterizada por ganancias recurrentes en los NB más agresivos (van Noesel MM y Versteeg R 2004; Maris JM *et al.* 2007; Ora I y Eggert A 2011). El nucleósido difosfato quinasa codificado por *NME1* está involucrado en el desarrollo embrionario normal, en la proliferación y la diferenciación celular (Lacombe ML *et al.* 2000; Lombardi D *et al.* 2000; Otero AS 2000; Ouatat T *et al.* 2003).

La estrecha asociación entre la expresión génica de *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1* y el comportamiento clínico del NB, nos ha llevado a profundizar en el conocimiento de los patrones de expresión de las proteínas codificadas por estos genes e investigar su potencial utilidad como marcadores inmunohistoquímicos de pronóstico en NB. En este proyecto, hemos realizado la caracterización inmunofenotípica de *CHD5* en tejido neural normal, en glándula suprarrenal y en 90 TN primarios.

La expresión génica de *CHD5* ha sido descrita como restringida a tejido neural normal y glándula suprarrenal (Thompson PM *et al.* 2003). Sin embargo, el patrón de expresión de la proteína *CHD5* no ha sido investigado. Nosotros hemos descrito por primera vez el perfil inmunofenotípico de esta proteína.

Observamos expresión nuclear de *CHD5* en células de estirpe neuronal, con inmunoreactividad variable dependiendo de la población neuronal del córtex cerebral. Publicaciones recientes sugieren que las diversas clases de neuronas tienen su origen en zonas germinales embrionarias distintas, y se caracterizan por la expresión de factores de transcripción y vías de señalización celular distintas (Anderson SA *et al.* 2002; Hevner RF *et al.* 2003; Gilbertson RJ y Ellison DW 2008; Rudy B *et al.* 2011). Consiguientemente, la distribución de las neuronas en las diversas capas cerebrales está determinada por su perfil de expresión molecular (Hevner RF *et al.* 2003; Rudy B *et al.* 2011). Aunque en nuestro estudio no observamos una distribución específica de la tinción de *CHD5* en relación a las distintas capas del córtex cerebral normal, sí que se identificó una asociación entre el patrón de expresión de *CHD5* y las características morfológicas, fisiológicas y neuroquímicas de las neuronas.

En los tejidos neurales normales, las células gliales mostraron ausencia de tinción para *CHD5*. En los tumores gliales, la deleción de la región cromosómica 1p es una anomalía genética frecuente, afectando aproximadamente un 20% de

los astrocitomas y un 60% de los oligodendrogliomas (Barbashina V *et al.* 2005; Assem M *et al.* 2012). En un estudio previo, se identificaron niveles bajos de expresión de *CHD5* en gliomas con delección de la región 1p, mientras que en gliomas que no mostraban esta alteración cromosómica, se observaron niveles de expresión similares a los hallados en el cerebro normal. Estos datos sugerían que la delección de *CHD5* podía ser un evento iniciador en la tumorigénesis de los gliomas (Bagchi A *et al.* 2007). Nuestros resultados sugieren que todavía no existen evidencias claras del papel de *CHD5* como GST en los tumores gliales.

Los NB son tumores embrionarios, diversas evidencias confirman que estos tumores tienen su origen en los agregados neuroblásticos primogénicos de los tejidos simpáticos fetales (Mora J y Gerald W 2004; De Preter K *et al.* 2006). El desenlace final de estos agregados en el desarrollo normal es todavía incierto, pese a que se postulan dos desenlaces; que involucionan y desaparecen o que maduran y dan lugar a células del sistema nervioso simpático (De Preter K *et al.* 2006). En nuestra experiencia, los agregados neuroblásticos fetales no mostraron inmunoreactividad para *CHD5*, únicamente en algunos agregados de mayor tamaño observamos neuroblastos dispersos con tinción difusa. Estos resultados sugieren que la expresión de *CHD5* podría iniciarse en agregados neuroblásticos en proceso de maduración o autoinvolución. No obstante, las células que mostraban una discreta tinción de *CHD5* no mostraban signos de diferenciación morfológica distintivos del resto de los neuroblastos inmunonegativos para *CHD5*.

Los TN, del mismo modo que el tejido normal neural, están constituidos principalmente por dos poblaciones celulares: neuroblastos y células estromales tipo Schwann. El potencial de malignidad de estos tumores está relacionado con el grado de maduración de los neuroblastos y con la proporción de ambas poblaciones celulares. La caracterización inmunofenotípica de *CHD5* en TN identificó la expresión proteica circunscrita al núcleo de las células neuroblásticas en diferenciación y de las células ganglionares. Las células neuroblásticas indiferenciadas y las células estromales tipo Schwann eran consistentemente negativas para *CHD5*. Sin embargo, la tinción más intensa para *CHD5* se observó en las células neuroblásticas indiferenciadas que constituyen los NB estadio 4S.

Los NB estadio 4S conforman un subgrupo raro de TN mestastásicos, histológicamente indiferenciados, altamente proliferantes, que afectan lactantes habitualmente menores de 1 año de edad. Estos tumores se caracterizan por una elevada tasa de regresión espontánea sin la necesidad de tratamiento citotóxico, (Kushner BH y Cohn SL 2005; Maris JM *et al.* 2007). Contrariamente, los NB estadio 4, tumores metastáticos, indiferenciados, con evolución clínica muy agresiva, que también pueden afectar lactantes, precisan de un tratamiento intensivo multimodal. Una distinción precisa entre estos dos subgrupos de NB con enfermedad diseminada en ocasiones puede ser difícil, sin embargo es crítica para la toma de decisiones terapéuticas. En nuestra experiencia, la tinción nuclear intensa de *CHD5* observada en los NB 4S permite una clara distinción de los estadio 4 consistentemente inmunonegativos. Estos resultados son consistentes con nuestro estudio previo de análisis de perfiles transcripcionales mediante microarray, donde la expresión diferencial de *CHD5* permitía distinguir entre los subgrupos de NB metastáticos de los lactantes (Lavarino C *et al.* 2009). Todo ello sugiere que la tinción inmunohistoquímica de *CHD5* podría contribuir a la distinción entre los NB diseminados y consiguientemente a mejorar el correspondiente manejo clínico de estos pacientes.

En NB, la tinción nuclear de *CHD5* mostró una correlación estadísticamente significativa con una evolución clínica más favorable. Estos resultados son consistentes con resultados publicados anteriormente sobre la asociación entre elevados niveles de expresión génica de *CHD5* y tumores de pronóstico favorable (Schramm A *et al.* 2005; Fujita T *et al.* 2008; Lavarino C *et al.* 2008; Vermeulen J *et al.* 2009). Además, mediante análisis multivariantes con modelos de regresión de Cox hemos demostrado como la capacidad predictiva del patrón inmunofenotípico de *CHD5* es independiente de marcadores de pronóstico ya establecidos para NB (edad del paciente al diagnóstico, estadiaje INSS, estado del oncogén *MYCN* y pérdida de la región cromosómica 1p).

A lo largo de los últimos años, numerosos estudios han asociado niveles de expresión de distintos genes (*Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1 (TrkA)*, *FYN oncogene related to SRC, FGR, YES (FYN)*, *Preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME)*, *Zinc finger protein 423 (ZNF423)*, *Heparanase (HPA)* y *Notch1* entre otros) con la evolución clínica del NB (Nakagawara A *et al.* 1993; Berwanger B *et al.* 2002; Oberthuer A *et al.* 2004; Brodeur GM *et al.* 2009; Huang S *et al.* 2009; Zheng LD *et al.* 2009; Chang HH *et al.* 2010). La expresión proteica de los receptores de la familia tirosina quinasa, quienes tienen un papel crucial en el desarrollo normal del sistema nervioso, han sido extensamente estudiados y caracterizados en NB (Nakagawara A *et al.* 1993; Brodeur GM *et al.* 2009; De Souza DRV *et al.* 2011). De esta familia, la expresión del gen *TrkA* es la que mejor correlación presenta con la evolución clínica del NB (Nakagawara A *et al.* 1993). Los resultados obtenidos en nuestro estudio de expresión de *CHD5* sugieren una similitud con el patrón de expresión de *TrkA*. En ambos casos, una expresión negativa se asocia con NB de evolución clínica desfavorable. Para *TrkA*, numerosos estudios han relacionado bajos niveles de expresión con características clínico-biológicas desfavorables como, por ejemplo, la amplificación de *MYCN* (Nakagawara A *et al.* 1992 y 1993; Schramm A *et al.* 2005; Hishiki T *et al.* 2010; Light JE *et al.* 2012). De manera claramente distinta, la tinción de *TrkA* positiva no siempre se asocia con NB de pronóstico favorable, ya que aunque se ha descrito una expresión elevada de *TrkA* en NB loco-regionales y en estadio 4S, un 34% de los NB estadio 4 también presentan inmunoreactividad positiva (Tanaka T *et al.* 1995 y 1998; Kramer K *et al.* 1996 y 1997). En cambio, en nuestro estudio la mayoría de pacientes estadio 4 analizados presentaron tinción negativa

o muy leve para CHD5 (>80%). Estos resultados, conjuntamente con la capacidad pronóstica independiente de CHD5, sugieren que la tinción inmunohistoquímica de CHD5 podría ser un marcador útil para refinar los actuales sistemas de clasificación pronóstica en NB.

El tratamiento con quimioterapia puede inducir variaciones en los niveles de expresión génica en los tumores debidos a cambios importantes en los procesos celulares como son, entre otros, la inducción de la diferenciación celular, la reparación del ADN, la apoptosis y la necrosis tisular. Estos cambios se asocian a la respuesta del tumor al tratamiento. Los NB indiferenciados pueden presentar maduración neuroblástica aberrante en respuesta a la quimioterapia. La expresión de CHD5, circunscrita a células de NB en diferenciación, en células ganglionares y ausente en neuroblastos indiferenciados, sugiere una posible participación de ésta en los procesos de diferenciación neuroblástica. Estas observaciones nos condujeron a estudiar el patrón de expresión de CHD5 en un conjunto de 12 muestras de NB apareadas obtenidas al diagnóstico y después de recibir quimioterapia de inducción. La evaluación de la expresión génica y proteica de *CHD5* en este conjunto de muestras identificó una reactivación de la expresión en aquellas muestras post-quimioterapia que presentaban signos morfológicos de maduración neuroblástica. Ninguno de estos tumores presentaba delección alélica de 1p. Mientras que los tumores en los que no se observaban cambios morfológicos los niveles de CHD5 persistían bajos. Es relevante destacar que la reactivación de *CHD5* se asoció significativamente con una respuesta objetiva a la terapia y con tiempos de supervivencia más largos de los pacientes. Actualmente no existen en NB marcadores moleculares de respuesta al tratamiento y ésta se evalúa clínicamente mediante la monitorización de catecolaminas y de sus metabolitos (ácido vanilmandélico y ácido homovanílico) en orina, la evaluación del tamaño de las lesiones medible con técnicas de imagen (TAC o RMN), y analizando la histología del tumor (grado de diferenciación de las células tumorales y grado de necrosis del tejido tumoral) en caso que se efectúe una cirugía "second-look" (Abramson SJ y Shulkin BL 2005; Maris JM et al. 2007). Nuestros resultados sugieren que la restauración de la expresión de *CHD5*, como efecto de la quimioterapia, podría ser un marcador subrogado de respuesta al tratamiento. Este marcador podría ser una herramienta clínicamente útil, ya que la detección de los niveles de CHD5 mediante técnicas de inmunohistoquímica convencionales permitiría detectar de forma rápida y precisa aquellos pacientes que no se benefician del tratamiento. Dado el bajo número de casos incluidos en el estudio, la valoración de la potencialidad de este marcador y, consecuentemente, su aplicación en la práctica clínica, precisa de una validación prospectiva exhaustiva.

En conclusión, hemos identificado CHD5 como una proteína específica de neurona. Su caracterización inmunofenotípica en TN sugiere que podría ser un marcador inmunohistoquímico útil para la clasificación del riesgo clínico de los pacientes afectados de NB. Asumiendo la necesidad de una validación prospectiva en cohortes independientes de NB tratados uniformemente, los resultados obtenidos sugieren que la restauración de la expresión de CHD5 podría ser un marcador subrogado de respuesta al tratamiento.

Durante la última década, numerosos estudios han demostrado la importancia de los procesos epigenéticos en el desarrollo, progresión y tratamiento del cáncer. Actualmente, se considera el cáncer como una enfermedad genética y epigenética, ya que es la combinación de ambas la que permite entender la biología de esta enfermedad (Baylin SB y Jones PA 2011).

La epigenética abarca una serie de alteraciones somáticas heredables que afectan la expresión génica pero que no están causadas directamente por la alteración de la secuencia nucleotídica del ADN (Esteller M 2008). La primera modificación epigenética descrita en cáncer fue la alteración del patrón de metilación del ADN. La alteración de la metilación del ADN en células neoplásicas se caracteriza por un estado de hipermetilación (hiperM) o ganancia de metilación en las regiones reguladoras de los genes supresores de tumores, conduciendo a su inactivación, y por una hipometilación (hipoM), pérdida de metilación del ADN generalizada que afecta principalmente regiones repetitivas del ADN provocando inestabilidad cromosómica (Esteller M 2008; Baylin SB y Jones PA 2011). Hasta ahora, gran parte de las investigaciones han focalizado sus esfuerzos principalmente en el estudio del mecanismo de origen y la consecuencia de la hiperM de la región promotora de los genes.

El NB es un tumor embrionario que se caracteriza por la presencia de numerosas alteraciones genéticas biológicamente relevantes que se asocian de forma significativa con la evolución clínica de los pacientes (ver apartado 1.5). No obstante los avances en el conocimiento del perfil genético del NB, aún se desconocen muchas de las alteraciones que afectan el patrón de metilación del genoma de esta enfermedad. Numerosos genes han sido descritos como metilados en NB (*Homeobox A9 (HOXA9)*, *PYD and CARD domain containing (TMS1)*, *Cyclin D2 (CCND2)*, *Retinoic acid receptor, beta 2 (RARβ2)*, *Caspase 8 (CASP8)*, *Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1 (RASSF1A)*, *TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (TIMP3)*, *Keratin 9 (KRT9)* o *POU class 2 homeobox 2 (POU2F2)*, entre otros) (Gonzalez-Gomez P et al. 2003; Alaminos M et al. 2004; Michalowski MB et al. 2008; Kamimatsuse A et al. 2009; Carén H et al. 2011; Grau E et al. 2011), sin embargo el patrón global de metilación del ADN de estos tumores es aún considerablemente desconocido.

Nuestro grupo ha realizado un análisis del estado de metilación del ADN utilizando tecnología de *microarrays* de metilación (*Illumina Infinium Human Methylation-27 BeadChip*) sobre 25 TN. Análisis no supervisados de PCA mostraron como los perfiles de metilación del ADN de los NB se distinguen claramente de los TN menos agresivos, como son los

GNB y GN, así como de las muestras de tejido normal incluidas en el estudio, cerebro fetal y glándula suprarrenal. Este resultado sugería la existencia de un patrón de metilación del ADN específico de los NB.

Mediante análisis supervisados, aplicando criterios restrictivos de selección, identificamos alteraciones en el patrón de metilación del ADN propias de los NB. El patrón de metilación identificado en NB se asoció mediante análisis de PCA a subgrupos clínicos y biológicamente relevantes en NB. En concreto, los genes identificados como hiperM eran capaces de discriminar entre los NB según el estado de amplificación del oncogén *MYCN* mientras que el conjunto de genes hipoM segregaba los casos en función de la edad del paciente al momento del diagnóstico, separando los pacientes con 5 o más años de edad de aquellos más pequeños. Este hallazgo nos condujo a estudiar, mediante análisis supervisados, los patrones de metilación del ADN propios de subgrupos de NB definidos por parámetros clínicos y biológicos ya establecidos. Los resultados corroboraron la existencia de patrones de metilación diferencial entre tumores de alto y bajo riesgo clínico, entre tumores con distinto estado de amplificación del oncogén *MYCN*, y entre NB estadios 4 y 4S. Estudios precedentes han identificado genes hiperM asociados con el estado de amplificación de *MYCN* en NB, confirmando la existencia de patrones de metilación específicos de subgrupos de NB (Gonzalez-Gomez P *et al.* 2003; Alaminos M *et al.* 2004; Banelli B *et al.* 2005; Grau E *et al.* 2011). Sin embargo, al comparar los tumores según la edad del paciente al diagnóstico, empleando como punto de corte 18 meses, no se observaron diferencias consistentes en el estado de metilación. En cambio, en los análisis supervisados de PCA, se observó que la pérdida de metilación del ADN permitía distinguir los pacientes menores de 5 años de los pacientes mayores. En NB, la edad del paciente es uno de los factores pronósticos más utilizados en la práctica clínica (Mora J *et al.* 2006; Sano H *et al.* 2006; Maris J *et al.* 2007). Tradicionalmente, la edad del paciente ha sido analizada como una función binaria, con un punto de corte establecido inicialmente a los 12 meses, pero en el año 2005 diversos estudios demostraron un aumento de la supervivencia en pacientes con edades comprendidas entre los 12 y 18 meses, sugiriendo que el punto de corte más apropiado podría estar en los 18 meses (London WB *et al.* 2005; Schimdt M *et al.* 2005; George RE *et al.* 2005; Sano H *et al.* 2006). Por otra parte, la Clasificación Histopatológica Internacional del NB (la clasificación de Shimada) (INPC, del inglés *International Neuroblastoma Pathology Classification, the Shimada System*) utiliza para la evaluación y estadificación del riesgo clínico de los NB dos cortes de edad: 18 meses y 5 años (Shimada H *et al.* 1999). Estos puntos de corte coinciden con los patrones de metilación del ADN específicos relacionados con la edad e identificados en nuestro estudio.

En conjunto, se observó que la alteración más prevalente en el patrón de metilación del ADN en NB es una disminución de los niveles de metilación (hipoM). Este resultado es consistente con los patrones de hipoM globales descritos en cáncer, generalmente asociados a regiones repetitivas o satélites de ADN que contribuyen a la inestabilidad cromosómica (Dunn BK 2003; Feinberg AP y Tycko B 2004; Mulero-Navarro S y Esteller M 2008; Baylin SB y Jones PA 2011). Sorprendentemente en nuestro estudio la hipoM que hemos observado es gen-específica y afecta a funciones biológicas relacionadas con cáncer así como a genes relevantes para la patogénesis del NB, como *Cyclin D1 (CCND1)*.

El gen *CCND1* se localiza en la región cromosómica 11q13, región perdida en un 35-45% de los NB y asociada a una evolución clínica desfavorable (Brodeur GM 2003; Ora I y Eggert A 2011). La función principal de *CCND1* es la regulación de la proliferación celular, activando *CDK4* y *CDK6* e induciendo la fosforilación de la proteína del retinoblastoma, que a su vez libera los factores de transcripción necesarios para la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular (Molenaar JJ *et al.* 2003; van Noesel MM y Versteeg R 2004). La sobreexpresión de *CCND1* se observa en más del 75% de los NB (Molenaar JJ *et al.* 2003), así como en otras neoplasias. En algunas neoplasias, como el carcinoma de cabeza y cuello o carcinoma de pulmón, la sobreexpresión de este gen es consecuencia de su amplificación (Donnellar R y Chetty R 1998); en cambio en el carcinoma de tiroides y el linfoma de células del manto se debe a un reordenamiento cromosómico (Rimokh R *et al.* 1994). En NB se desconoce cuál es la causa de la sobreexpresión de *CCND1*, ya que en sólo un 2% de los tumores se observa amplificación del gen y únicamente en 1/96 muestras se ha identificado un reordenamiento cromosómico (Molenaar JJ *et al.* 2003). Recientemente, se ha descrito que el factor de transcripción *GATA binding protein 3 (GATA3)* está implicado en el mecanismo de sobreexpresión de *CCND1* en NB (Molenaar JJ *et al.* 2010). En nuestro estudio hemos observado la pérdida de metilación de *CCND1* en más del 70% de las muestras de NB analizadas. Además, la hipoM de *CCND1* se asocia, en nuestras muestras, con elevados niveles de expresión génica a la vez que en ninguna de las muestras estudiadas se observó amplificación del gen. Cabe destacar que los dinucleótidos CG identificados como hipoM en *CCND1* se localizan en la región 3' no traducida (3'-UTR). Dicha región, según los datos obtenidos del *University of California Santa Cruz Genome Browser* (GRCh37/hg19), es una región conservada evolutivamente, hipersensible a la enzima DNAsaI y enriquecida con zonas de unión de microARN y a factores de transcripción, como *GATA3*, *MYC*, *FOXA1/2* y *JUND*, entre otros. En el linfoma de células del manto esta región es una región funcional, puesto que su pérdida o reordenamiento se traduce a una mayor capacidad proliferativa (Deshpande A *et al.* 2009). No obstante, en NB se han descrito muy pocos reordenamientos (1%) que conlleven la pérdida de dicha región (Molenaar JJ *et al.* 2003). Por otro lado, en nuestra cohorte, la hipoM de *CCND1* se observa conjuntamente con una hiperM de la región promotora del gen *RASSF1A*. La inactivación epigenética del GST *RASSF1A* es común en NB, más del 75% de estos tumores presentan elevados niveles de metilación en su región promotora (Michlowski MB *et al.* 2008). *RASSF1A* actúa regulando la proliferación celular mediante la inhibición de la proteína codificada por *CCND1* (Shivakumar L *et al.* 2002). En tumores endocrinos del intestino posterior se ha descrito que los niveles de metilación de *RASSF1A* son inversamente proporcionales a la expresión de *CCND1* (Pizzi S *et al.* 2005). El conjunto de nuestras

observaciones nos permiten sugerir que la pérdida de metilación en la región 3'-UTR de *CCND1* y una concomitante hiperM del promotor de *RASSF1*, podría representar un posible mecanismo involucrado en la sobreexpresión de *CCND1*.

La pérdida de metilación del ADN en NB también se identificó en otros genes con funciones relevantes para el desarrollo del cáncer. Por ejemplo, el gen *Small proline-rich protein 3 (SPRR3)*, cuya sobreexpresión induce a la proliferación celular en cáncer de mama y de colon a través de la degradación de p53 mediante la activación de las vías de señalización de *AKT* y *MAPK* (Cho DH *et al.* 2010; Kim JC *et al.* 2012). Recientemente *SPRR3* ha sido descrito como hipoM en carcinoma hepatocelular (Ammerphol O *et al.* 2012). La hipoM en NB también afecta a otros genes que estimulan la proliferación celular. Este es el caso del gen *Betacelluline (BTC)*, del gen *Epidermal growth factor (EGF)* o del gen *Fibroblast growth factor 6 (FGF6)*. La proteína codificada por el gen *BTC*, induce la proliferación e inhibe la capacidad de diferenciación de las células madre neurales *in vitro* (Gómez-Gaviro MV *et al.* 2012), mientras que *EGF* estimula la proliferación celular y la transformación neoplásica. En cambio la expresión de *FGF6* mantiene la pluripotencialidad de las células madre embrionarias y regula su autorenovación (Chen G *et al.* 2012).

Por su parte, la hiperM en NB afecta a regiones promotoras de genes implicados en el desarrollo, la diferenciación y la proliferación celular, como por ejemplo *RASSF1A* (discutido anteriormente), *POU class 2 homeobox2 (POU2F2)*, *Homeobox D3 (HOXD3)*, *Interferon regulatory factor 6 (IRF6)* y *Epithelial membrane protein-1 (EMP1)*, entre otros. Los genes *POU2F2* y *HOXD3*, son ejemplo de genes involucrados en el desarrollo celular. *POU2F2* codifica un factor de transcripción que regula la diferenciación neural (Theodorou E *et al.* 2009). Recientemente se ha descrito su estado de hiperM en líneas celulares y en tumores primarios de NB (Carén H *et al.* 2011). El gen *HOXD3* forma parte de la familia de genes *Hox*, la expresión de los cuales modula las propiedades de adhesión celular durante el desarrollo del tubo neural (Taniguchi Y *et al.* 2011). Hasta el momento no se han descrito en NB cambios en el estado de metilación de este gen, aunque recientemente la hiperM de *HOXD3* ha sido propuesta, conjuntamente con la ganancia de metilación en los genes *Transforming growth factor, beta 2 (TGFβ2)* y *Adenomatous polyposis coli (APC)*, como indicador epigenético de progresión clínica en el cáncer de próstata (Liu L *et al.* 2011). Por otro lado, los genes *IRF6* y *EMP1*, cuyo estado de metilación de sus regiones promotoras en NB no había sido descrita hasta el momento, desempeñan un papel clave en los procesos de diferenciación celular. El gen *IRF6* codifica para un factor de transcripción regulador del desarrollo craneo-facial y de la proliferación de los keratinocitos. Bajos niveles de expresión de *IRF6* se han relacionado con la metilación de su región promotora en carcinomas invasivos de células escamosas (Botti E *et al.* 2011). Mientras que *EMP1* tiene un papel crucial en la diferenciación de muchos linajes celulares, entre ellos el de células B, neuronas o podocitos (Wulf P y Suter U 1999; Liu ZY *et al.* 2011). Recientemente se ha sugerido que podría ser un GST en carcinoma de pulmón (Zhang J *et al.* 2011).

La caracterización biológica de los genes diferencialmente metilados en NB nos permitió observar que el estado de hiperM en NB ocurre en regiones promotoras con densidad intermedia de dinucleótidos CG mientras que la hipoM tiene lugar en genes enriquecidos por promotores con baja densidad de dinucleótidos CG. Por otra parte, los genes diferencialmente metilados en NB no son genes diana de los complejos represivos formados por proteínas de la familia *Polycomb* (PRC, del inglés *Polycomb Repressive Complex*). Estas observaciones difieren de los resultados obtenidos en estudios de otros tumores, principalmente realizados en cáncer de adultos, donde la metilación *de novo* afecta principalmente a genes densamente poblados de dinucleótidos CG (Martinez R *et al.* 2009; Martin-Subero JI *et al.* 2009 a y b; Richter J *et al.* 2009; Koga Y *et al.* 2009) y a genes diana de los PRC (Martin-Subero JI *et al.* 2009a; Hunkapiller J *et al.* 2012; Easwaran H *et al.* 2012). Consiguientemente, las características epigenéticas observadas en nuestro estudio podrían estar relacionadas con el origen embrionario de los NB, origen que difiere de los tumores propios del adulto.

Los genes identificados como diferencialmente metilados en NB se clasificaron según su localización cromosómica. Mediante análisis de probabilidades identificamos que los genes hiperM se distribuían a lo largo del genoma, por lo contrario los genes hipoM localizaban de forma significativa en los cromosomas 1, 17, 19 y 21. La pérdida y la ganancia de regiones cromosómicas es una de las alteraciones más caracterizadas en NB ya que se asocian al comportamiento clínico de estos tumores, como por ejemplo la pérdida alélica de la región 1p, la ganancia del segmento distal del brazo largo del cromosoma 17 o la pérdida de la región 19q23, todas ellas asociadas a pronóstico desfavorable (Brodeur GM 2003; van Noesel MM y Versteeg R 2004; Mora J 2006; Maris JM *et al.* 2007). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la pérdida de metilación del ADN en NB no se produce al azar, ya que afecta a cromosomas y regiones cromosómicas recurrentemente alteradas en NB.

En conclusión, hemos descrito un patrón de metilación del ADN propio del NB. Este se caracteriza por una elevada disminución de los niveles de metilación gen-específica que afecta a genes relacionados con funciones biológicas alteradas en cáncer así como genes relevantes para la patogénesis del NB, como *CCND1*, y por una ganancia de metilación en regiones promotoras de genes involucrados en el desarrollo, la diferenciación y la regulación de la proliferación celular. Así mismo, hemos identificado alteraciones en el estado de metilación del ADN en distintos subgrupos clínicos y biológicos de NB. Todo ello nos ha permitido identificar genes candidatos a ser biomarcadores epigenéticos asociados al NB, así como profundizar en el conocimiento de las bases moleculares de esta enfermedad.

Conclusiones

De los resultados presentados en esta tesis doctoral se extraen las **siguientes conclusiones**:

1. Nuestro grupo ha desarrollado un modelo estadístico de predicción de pronóstico con el objetivo de poder valorar el riesgo clínico de cada paciente afecto de neuroblastoma (NB) en función de una única variable que incorpora el perfil de expresión de tres genes, *Chromodomain, helicase DNA-binding protein 5 (CHD5)*, *Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoforma 1B (PAFAH1B1)* y *Nonmetastatic cells 1, protein expressed in (NME1)*, asociados de forma estadísticamente significativa con la supervivencia global y supervivencia libre de evento.
2. El modelo estadístico de predicción de pronóstico desarrollado está basado en una técnica convencional como es la qRT-PCR, una técnica utilizada en la práctica clínica de forma rutinaria.
3. En todas las cohortes de NB utilizadas para la validación del modelo estadístico de predicción de pronóstico, el modelo estadístico mostró la capacidad de clasificar de manera fiable a los pacientes en grupos de riesgo con evolución clínica distinta.
4. Análisis multivariantes mediante modelos de regresión de Cox mostraron como el modelo desarrollado es un marcador de predicción de pronóstico independiente de los factores pronósticos actualmente aceptados en NB (edad del paciente al diagnóstico, estado de amplificación del oncogén *MYCN*, estado alélico de la región cromosómica 1p y estadiaje INSS).
5. La capacidad predictiva del modelo de pronóstico propuesto es equiparable a la de los sistemas internacionales de estratificación de riesgo clínico en NB, basados en la combinación de diversas variables clínicas, morfológicas y biológicas.
6. El modelo de predicción de pronóstico ha demostrado capacidad predictiva y robustez en la clasificación de subgrupos clínica y biológicamente relevantes definidos por marcadores ya establecidos en NB. Entre ellos, se observó una elevada capacidad de clasificación de los pacientes con NB loco-regionales sin amplificación del oncogén *MYCN*.
7. El valor del modelo que proponemos viene dado por el número reducido de genes que lo componen, la viabilidad a nivel técnico (qRT-PCR), la aplicabilidad a biopsias de tejido tumoral pequeñas, la rapidez y fácil interpretación, además de la reproducibilidad de los resultados, y el bajo coste económico. Todo ello hace que sea potencialmente aplicable en la práctica clínica.
8. El modelo de predicción de pronóstico desarrollado por nuestro grupo podría ayudar a refinar los actuales sistemas de estratificación de riesgo clínico, mejorando así la clasificación y, consiguientemente, el tratamiento de los pacientes con NB.
9. La caracterización inmunofenotípica de CHD5 en tejido humano normal ha demostrado que es una proteína nuclear, con expresión restringida a células de estirpe neuronal. La totalidad de las células gliales y la mayoría de agregados neuroblásticos de la glándula suprarrenal en desarrollo son negativos para la expresión de CHD5.
10. El patrón de inmunoreactividad de CHD5 es variable y dependiente de la población neuronal. La expresión de CHD5 no tiene una distribución específica en las distintas capas del córtex cerebral normal, pero existe una asociación entre el patrón de expresión y las características morfológicas, fisiológicas y neuroquímicas de las neuronas.
11. En los tumores neuroblásticos (TN), la expresión de CHD5 aparece circunscrita al núcleo de las células neuroblásticas en diferenciación y de las células ganglionares. Los neuroblastos indiferenciados y las células estromales de tipo Schwann no expresan CHD5.
12. Los neuroblastos que constituyen los NB estadio 4S, se caracterizan por tener una inmunoreactividad para CHD5 intensamente positiva, en cambio, los NB estadio 4 diagnosticados antes de los 18 meses de edad, son consistentemente negativos. Por ello, la expresión de CHD5 podría representar un marcador inmunohistoquímico útil para la distinción entre estos dos subgrupos de tumores metastásicos con evolución clínica radicalmente distinta.
13. La expresión de CHD5 se asocia de forma estadísticamente significativa con la supervivencia global y la supervivencia libre de evento en pacientes afectados de NB.
14. Análisis multivariantes mediante modelos de regresión de Cox mostraron como la tinción inmunohistoquímica de CHD5 es un factor pronóstico independiente de los marcadores actualmente aceptados para NB (edad del paciente al diagnóstico, estado de amplificación del oncogén *MYCN*, estado alélico de la región cromosómica 1p y estadiaje INSS).
15. Nuestros resultados sugieren que el patrón de expresión de CHD5 podría representar un marcador inmunohistoquímico de predicción pronóstica en NB.

16. Los NB clínicamente agresivos, caracterizados por tener niveles de expresión de *CHD5* muy bajos o ausentes, pueden, en ocasiones, reactivar la expresión génica y proteica de *CHD5* en respuesta a la quimioterapia. La reactivación de *CHD5* post-tratamiento de inducción ha sido observada en tumores que muestran cambios morfológicos de maduración neuroblástica inducida por el tratamiento.
17. La reinstauración de la expresión de *CHD5* post-tratamiento de inducción se asocia de forma estadísticamente significativa con una respuesta objetiva del tumor a la terapia citotóxica y a tiempos de supervivencia más largos de los pacientes con NB.
18. Nuestros resultados sugieren que el patrón de expresión de *CHD5* post-tratamiento de inducción podría representar un marcador subrogado de respuesta al tratamiento, clínicamente útil para una identificación rápida y precisa de pacientes que no se benefician del tratamiento convencional.
19. El análisis del estado global de metilación del ADN en TN mediante tecnología de *microarrays* de metilación, ha identificado patrones de metilación diferencial propios del NB, así como alteraciones del estado de metilación del ADN en distintos subgrupos clínicos y biológicos de NB.
20. El ADN del NB se ve afectado por una elevada disminución de los niveles de metilación (hipometilación).
21. En NB, la hipometilación es gen-específica y afecta funciones biológicas relacionadas con cáncer así como a genes relevantes en la patología del NB como *Cyclin D1 (CCND1)*, entre otros.
22. La metilación diferencial de *CCND1* afecta principalmente a una región evolutivamente conservada y funcionalmente relevante localizada en la región 3'-UTR del gen. La pérdida del patrón de metilación del ADN en regiones no promotoras podría jugar un papel importante en el la patogénesis del NB.
23. El estado de hipometilación de *CCND1* y la concurrente hipermetilación de *Ras association (RaIGDS/AF-6) domain family member 1 (RASSF1A)*, podría representar uno de los mecanismos potencialmente involucrados en la sobreexpresión de *CCND1* en NB.
24. La hipometilación del ADN observada en NB afecta de forma significativa tanto cromosomas como regiones cromosómicas descritas como recurrentemente alteradas en NB.
25. La ganancia de metilación (hipermetilación) en NB, afecta mayoritariamente regiones promotoras de genes involucrados en el desarrollo, la diferenciación y la regulación de la proliferación celular.
26. La hipermetilación en NB ocurre preferencialmente en genes con regiones promotoras caracterizadas por una densidad intermedia de dinucleótidos CG, mientras que la hipometilación tiene lugar en regiones promotoras con baja densidad de dinucleótidos CG.
27. Los genes diferencialmente metilados en NB no son, generalmente, diana de los complejos represivos formados por proteínas de la familia *Polycomb*.
28. Los resultados obtenidos en el análisis del estado global de metilación del ADN en TN proporcionan genes candidatos a ser biomarcadores epigenéticos asociados con NB, así como un mayor conocimiento de las bases moleculares de esta enfermedad.

Bibliografía

Anexos

Abreviaciones

Bibliografía

Conclusiones

Discusión

Resultados

Hipótesis y Objetivos

Introducción

Abramson SJ y Shulken BL. *Anatomic and functional maging* pp 109-120; Cheung NK V y Cohn SL (ed.) *Neuroblastoma* Springer-Voleng, Berlin 2005.

Ahmadian A, Ehn M, Hober S. *Pyrosequencing: history, biochemistry and future*. Clin Chim Acta 2006; 363:83-94.

Affymetrix Data Sheet Part N° 700461 rev 5, GeneChip® Human Genome U95Set, 2003.

Allison DB, Cui X, Page GP, Sabripour M. *Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus*. Nat Rev Genetics 2006; 7:55-65.

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

Ambros PF, Ambros IM, Strehl S, Bauer S, Luegmayr A, Kovar H, Ladenstein R, Fink FM, Horcher E, Printz G, Mutz I, Schilling F, Urban C and Gadner H. *Regression and progression in neuroblastoma does genetic predict tumor behaviour?.* Eur J Cancer 1995; 31A:510-515.

Ambros PF, Mehes G, Ambros IM, Landesntein R. *Disseminated tumor cells in the bone marrow -changes and consequences of microscopical detection methods*. Cancer Lett 2003; 197:29-34.

Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Schleiermacher G, Speleman F, Spitz R, London WB, Cohn SL, Pearson AD, Maris JM. *International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee*. Br J Cancer 2009; 100:1471-1482.

Ammerpohl O, Pratschke J, Schafmayer C, Haake A, Faber W, von Kampen O, Brosch M, Sipos B, von Schönfels W, Balschun K, Röcken C, Arlt A, Schniewind B, Grauholm J, Kalthoff H, Neuhaus P, Stickle F, Schreiber S, Becker T, Siebert R, Hampe J. *Distinct DNA methylation patterns in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma*. Int J Cancer 2012; 130:1319-1328.

Anderson SA, Kaznowski CE, Horn C, Rubenstein JL, McConnell SK. *Distinct origins of neocortical projection neurons and interneurons in vivo*. Cereb Cortex 2002; 12:702-709.

Assem M, Sibenaller Z, Agarwal S, Al-Keilani MS, Alqudah MA, Ryken TC. *Enhancing diagnosis, prognosis, and therapeutic outcome prediction of gliomas using genomics*. OMICS 2012; 16:113-122.

Bagchi A, Papazoglu C, Wu Y, Capurso D, Brodt M, Francis D, Bredel M, Vogel H, Mills A. *CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36*. Cell 2007; 128:459-475.

Bagchi A y Mills AA. *The quest for the 1p36 tumor suppressor*. Cancer Res 2008; 68:2551-2556.

Bahnassy AA, Fawzy M, El-wakil M, Al-Bolkainy TMN, Kamel MM, El-Azim HA. *Telomerase expression as complementary prognostic factor in neuroblastoma*. J Egypt Natl Canc Inst 2010; 22:191-200.

Ballman VK. *Genetics and genomics: gene expression microarrays*. Circulation 2008; 118:1593-1597.

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

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

Barbashina V, Salazar P, Holland CE, Rosenblun MK, Ladanyi M. *Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor supressor gene*. Clin Cancer Res 2005; 11:1119-1128.

Beckwith JB y Perrin EV. *In situ neuroblastomas: a contribution to the natural history of neural crest tumors*. Am J Pathol 1963; 43:1089-1104.

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

Berger SL, Kouzarides T, Shiekhhattar R, Shilatifard A. *An operational definition of epigenetics*. *Genes Dev* 2009; 23:781-783.

Bernardi B y Cohn SL. *Risk-based treatment for children with neuroblastoma*. Education Book, International Society of Paediatric Oncology 2005, Section B, 62-66.

Berthold F y Simon T. *Clinical presentation* pp. 63-83; Cheung NK y Cohn SL (ed.) *Neuroblastoma*, Springer-Verlag, Berlin 2005.

Berwanger B, Hartmann O, Bergmann E, Bernard S, Nielsen D, Krause M, Kartal A, Flynn D, Wiedemeyer R, Schwab M, Schäfer H, Christiansen H, Eilers M. *Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma*. *Cancer Cell* 2002; 2:377-386.

Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, Doucet D, Thomas NJ, Wang Y, Vollmer E, Goldmann T, Seifart C, Jiang W, Barker DL, Chee MS, Floros J, Fan JB. *High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays*. *Genome Res* 2006; 16:383-393.

Bibikova M, Le J, Barnes B, Saedinia-Melnyk S, Zhou L, Shen R, Gunderson KL. *Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium® assay*. *Epigenomics* 2009; 1:177-200.

Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, Meddeb M, Danglot G, Brinkschmidt C, Christiansen H, Laureys G, Speleman F, Nicholson J, Bernheim A, Betts DR, Vandesompele J, Van Roy N. *Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma*. *N Engl J Med* 1999; 340:1954-1961.

Botti E, Spallone G, Moretti F, Marinari B, Pinetti V, Galanti S, De Meo PD, De Nicola F, Ganci F, Castrignanò T, Pesole G, Chimenti S, Guerrini L, Fanciulli M, Blandino G, Karin M, Costanzo A. *Developmental factor IRF6 exhibits tumor suppressor activity in squamous cell carcinomas*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:13710-13715.

Breslow N y McCann B. *Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma*. *Cancer Res* 1971; 31:2098-2103.

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

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

Brodeur GM. *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma*. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:203-216.

Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Varela CR, Light JE, Kolla V, Evans AE. *Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas*. *Clin Cancer Res* 2009; 15:3244-3250.

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

Cardoso C, Leventer RJ, Dowling JJ, Ward HL, Chung J, Petras KS, Roseberry JA, Weiss AM, Das S, Martin CL, Pilz DT, Dobyns WB, Ledbetter DH. *Clinical and molecular basis of classical lissencephaly: Mutations in the LIS1 gene (PAFAH1B1)*. *Hum Mutat* 2002; 19:4-15.

Carén H, Djos A, Nethander M, Sjöberg RM, Kogner P, Enström C, Nilsson S, Martinsson T. *Identification of epigenetically regulated genes that predict patient outcome in neuroblastoma*. *BMC Cancer* 2011; 11:66.

Cecchetto G, Mosseri V, Bernardi B, Helardot P, Monclair T, Costa E, Horcher E, Neuenschwander S, Tomà P, Rizzo A, Michon J, Holmes K. *Surgical risk factors in primary surgery for localized neuroblastoma: the LNESG1 study of the European International Society of Pediatric Oncology Neuroblastoma Group*. *J Clin Oncol* 2005; 23:8483-8489.

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

- Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, Krahe R. *Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites*. *Biotechniques* 2003; 35:146-150.
- Chang HH, Lee H, Hu MK, Tsao PN, Juan HF, Huang MC, Shih YY, Wang BJ, Jeng YM, Chang CL, Huang SF, Tsay YG, Hsieh FJ, Lin KH, Hsu WM, Liao YF. *Notch1 expression predicts an unfavorable prognosis and serves as a therapeutic target of patients with neuroblastoma*. *Clin Cancer Res* 2010; 16:4411-4420.
- Chen G, Gulbranson DR, Yu P, Hou Z, Thomson JA. *Thermal stability of fibroblast growth factor protein is a determinant factor in regulating self-renewal, differentiation, and reprogramming in human pluripotent stem cells*. *Stem Cells* 2012; 30:623-630.
- Chen HY, Yu SL, Chen CH, Chang GC, Chen CY, Yuan A, Cheng CL, Wang CH, Terng HJ, Kao SF, Chan WK, Li HN, Liu CC, Singh S, Chen WJ, Chen JJW, Yang PC. *A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer*. *N Engl J Med* 2007; 356:11-20.
- Cheung IY y Cheung NK V. *Quantification of marrow disease in neuroblastoma by real-time reverse transcription-PCR*. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1698-1705.
- Cheung IY, Feng Y, Vickers A, Gerald W, Cheung NK. *Cyclin D1, a novel molecular marker of minimal residual disease, in metastatic neuroblastoma*. *J Mol Diagn* 2007; 9:237-241.
- Cho DH, Jo YK, Roh SA, Na YS, Kim TW, Jang SJ, Kim YS, Kim JC. *Upregulation of SPRR3 promotes colorectal tumorigenesis*. *Mol Med* 2010; 16:271-277.
- David R, Lamki N, Fan S, Singleton EB, Eftekhari F, Shirkhoda A, Kumar R, Madewell JE. *The many faces of neuroblastoma*. *Radiographics* 1989; 9:859-882.
- D'Angio GJ, Evans AE, Koop CE. *Special pattern of widespread neuroblastoma with a favorable prognosis*. *Lancet* 1971; 1:1046-1049.
- Deaton AM y Bird A. *CpG islands and the regulation of transcription*. *Genes Dev* 2012; 26:1010-1022.
- Dedeurwaerder S, Defrance M, Calonne E, Denis H, Sotiriou C, Fuks F. *Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology*. *Epigenomics* 2011; 3:771-784.
- Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR. *Epigenetic control*. *J Cell Physiol* 2009; 219:243-250.
- De la Cruz X, Lois S, Sánchez-Molina S, Martínez-Balbás MA. *Do protein motifs read the histone code?* *Bioessays* 2005; 27:164-175.
- De la Monte SM, Moore GW, Hutchins GM. *Nonrandom distribution of metastases in neuroblastic tumors*. *Cancer* 1983; 52:915-925.
- De Preter K, Vandesompele J, Heimann P, Yigit N, Beckman S, Schramm A, Eggert A, Stallings RL, Benoit Y, Renard M, De Paepe A, Laureys G, Pählman S, Speleman F. *Human fetal neuroblast and neuroblastoma transcriptome analysis confirms neuroblast origin and highlights neuroblastoma candidate genes*. *Genome Biol* 2006; 7:R84.
- De Preter K, Vermeulen J, Brors B, Delattre O, Eggert A, Fischer M, Janoueix-Lerosey I, Lavarino C, Maris JM, Mora J, Nakagawara A, Oberthuer A, Ohira M, Schleiermacher G, Schramm A, Schulte JH, Wang Q, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. *Accurate outcome prediction in neuroblastoma across independent data sets using a multigene signature*. *Clin Cancer Res* 2010; 16:1532-1541.
- De Souza DR, Sanabani SS, de Souza AC, Filho Odone V, Epelman S, Bendit I. *Prognostic impact of MYCN, DDX1, TrkA, and TrkC gene transcripts expression in neuroblastoma*. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 56:749-756.
- Deshpande A, Pastore A, Deshpande AJ, Zimmermann Y, Hutter G, Weinkauff M, Buske C, Hiddemann W, Dreyling M. *3'UTR mediated regulation of the cyclin D1 proto-oncogene*. *Cell Cycle* 2009; 8:3584-3592.
- Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, Feinberg AP. *Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts*. *Nat Genet* 2009; 41:1350-1353.

- Donnellan R y Chetty R. *Cyclin D1 and human neoplasia*. Mol Pathol 1998; 51:1-7.
- Dufva M. *Introduction to microarray technology*. Methods Mol Biol 2009; 529:1-22.
- Dunn BK. *Hypomethylation: one side of a larger picture*. Ann N.Y. Acad Sci 2003; 983:28-42.
- Easwaran H, Johnstone SE, Van Neste L, Ohm J, Mosbrugger T, Wang Q, Aryee MJ, Joyce P, Ahuja N, Weisenberger D, Collisson E, Zhu J, Yegnasubramanian S, Matsui W, Baylin SB. *A DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer*. Genome Res 2012; 22:837-849.
- Esiashvili N, Anderson C, Katzenstein HM. *Neuroblastoma*. Curr Probl Cancer 2009; 33:333-360.
- Espada J y Esteller M. *DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment*. Semin Cell Dev Biol. 2010; 21:238-46.
- Esteller M. *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*. Nat Rev Genet. 2007; 8:286-298.
- Esteller M. *Epigenetics in cancer*. N Engl J Med 2008; 358:1148-1159.
- Evans AE, D'Angio GJ, Randolph J. *A proposed staging for children with neuroblastoma*. Children's cancer study group A. Cancer 1971; 27:374-378.
- Evans AE. *Staging and treatment of neuroblastoma*. Cancer 1980; 45:1799-1802.
- F**einberg AP y Vogelstein B. *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts*. Nature 1983; 301:89-92.
- Feinberg AP y Tycko B. *The history of cancer epigenetics*. Nat Rev Cancer 2004; 4:143-153.
- Flaus A y Owen-Hughes T. *Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling: the means to the end*. FEBS J 2011; 278: 3579-3595.
- Fujita T, Igarashi J, Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Kolla V, Kim J, Zhao H, Pawel BR, London WB, Maris JM, White PS, Brodeur GM. *CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas*. J Natl Cancer Inst 2008; 100:940-949.
- G**ambello MJ, Darling DL, Yingling J, Tanaka T, Gleeson JG, Wynshaw-Boris A. *Multiple dose-dependent effects of Lis1 on cerebral cortical development*. J Neurosci 2003; 23:1719-1729.
- Geli J, Kiss N, Kogner P, Larsson C. *Suppression of RIZ in biologically unfavourable neuroblastomas*. Int J Oncol 2010; 37:1323-1330.
- George RE, London WB, Cohn SL, Maris JM, Kretschmar C, Diller L, Brodeur GM, Castleberry RP, Look AT. *Favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study*. J Clin Oncol 2005; 23:6466-6473.
- Gerard WL. *Molecular pathology of neuroblastic tumors based on genomewide expression analysis* pp 97-106; Cheung NKV y Cohn SL (ed.), *Neuroblastoma*, Springer-Verlag, Berlin 2005.
- Gilbertson RJ y Ellison DW. *The origins of medulloblastoma subtypes*. Annu Rev Pathol 2008; 3:341-365.
- Gómez-Gaviro MV, Scott CE, Sesay AK, Matheu A, Booth S, Galichet C, Lovell-Badge R. *Betacellulin promotes cell proliferation in the neural stem cell niche and stimulates neurogenesis*. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109:1317-1322.
- Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Lomas J, Arjona D, Alonso ME, Amiñoso C, Lopez-Marin I, Anselmo NP, Sarasa JL, Gutierrez M, Casartelli C, Rey JA. *Aberrant methylation of multiple genes in neuroblastic tumours. Relationship with MYCN amplification and allelic status at 1p*. Eur J Cancer 2003; 39:1478-1485.
- Gordon DJ, Resio B, Pellman D. *Causes and consequences of aneuploidy in cancer*. Nat Rev Genetics 2012; 13:189-203.
- Grau E, Martinez F, Orellana C, Yañez Y, Oltra S, Noguera R, Hernandez M, Bermúdez JD, Castel V. *Hypermethylation of apoptotic genes as independent prognostic factor in neuroblastoma disease*. Mol Carcinog 2011; 50:153-162.

Gressens P. *Mechanisms and disturbances of neuronal migration*. *Pediatr Res* 2000; 48:725-730.

Guo QM. *DNA microarray and cancer*. *Curr Opin Oncol* 2003; 15:36-43.

Hailat N, Keim DR, Melhem RF, Zhu XX, Eckerskorn C, Brodeur GM, Reynolds CP, Seeger RC, Lottspeich F, Strahler JR. *High levels of p19/nm23 protein in neuroblastoma are associated with advanced stage disease and with N-myc gene amplification*. *J Clin Invest* 1991; 88:341-345.

Hall JA y Georgel PT. *CHD proteins: a diverse family with strong ties*. *Biochem Cell Biol* 2007; 85:463-476.

Hansen KD, Timp W, Bravo HC, Sabunciyan S, Langmead B, McDonald OG, Wen B, Wu H, Liu Y, Diep D, Briem E, Zhang K, Irizarry RA, Feinberg AP. *Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types*. *Nat Genet* 2011; 43:768-775.

Henrich KO, Bauer T, Schulte J, Ehemann V, Deubzer H, Gogolin S, Muth D, Fischer M, Benner A, König R, Scwab M, Westermann F. *CAMTA1, a 1p36 tumor suppressor candidate, inhibits growth and activates differentiation programs in neuroblastoma cells*. *Cancer Res* 2011; 71:3142-3151.

Hevner RF, Daza RA, Rubenstein JL, Stunnenberg H, Olavarria JF, Englund C. *Beyond laminar fate: toward a molecular classification of cortical projection/pyramidal neurons*. *Dev Neurosci* 2003; 25:139-151.

Hishiki T, Saito T, Terui K, Sato Y, Takenouchi A, Yahata E, Ono S, Nakagawara A, Kamijo T, Nakamura Y, Matsunaga T, Yoshida H. *Reevaluation of trKA expression as biological marker of neuroblastoma by high-sensitivity expression analysis – a study of 106 primary neuroblastomas treated in a single institute*. *J Pediatr Surg* 2010; 45:2293-2298.

Hiyama E, Hiyama K, Yamaoka H, Sueda T, Reynolds CP, Yokoyama T. *Expression profiling of favorable and unfavorable neuroblastomas*. *Pediatr Surg Int* 2004; 20:33-38.

Hoffmann AC, Danenberg KD, Taubert H, Danenberg PV, Wuerl P. *A three-gene signature for outcome in soft tissue sarcoma*. *Clin Cancer Res* 2009; 15:5191-5198.

Hopfner KP, Gerhold CB, Lakomek K, Wollmann P. *Swi2/Snf2 remodelers: hybrid views on hybrid molecular machines*. *Curr Opin Struct Biol* 2012; 22:225-233.

Huang S, Laoukili J, Epping MT, Koster J, Hölzel M, Westerman BA, Nijkamp W, Hata A, Asgharzadeh S, Seeger RC, Versteeg R, Beijersbergen RL, Bernards R. *ZNF423 is critically required for retinoic acid-induced differentiation and is a marker of neuroblastoma outcome*. *Cancer Cell* 2009; 15:328-340.

Hunkapiller J, Shen Y, Diaz A, Cagney G, McCleary D, Ramalho-Santos M, Krogan N, Ren B, Song JS, Reiter JF. *Polycomb-like 3 promotes polycomb repressive complex 2 binding to CpG islands and embryonic stem cell self-renewal*. *PLoS Genet* 2012; 8:e1002576.

Illumina Application Note, iCommunity Newsletter: *Genome-Wide Detection of DNA Methylation Changes in Lymphomas Using the Infinium® HumanMethylation27 BeadChip*. Pub N° 270-2008-004, May 2008.

Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabunciyan S, Feinberg AP. *The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores*. *Nat Genet* 2009; 41:178-186.

Jones PA y Baylin SB. *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. *Nat Rev Genetics* 2002; 3:415-418.

Kaatsch P. *Epidemiology of childhood cancer*. *Cancer Treat Rev* 2010; 36:277-285.

Kamimatsuse A, Matsuura K, Moriya S, Fukuba I, Yamaoka H, Fukuda E, Kamei N, Hiyama K, Sueda T, Hiyama E. *Detection of CpG island hypermethylation of caspase-8 in neuroblastoma using an oligonucleotide array*. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 52:777-783.

Kaneko M, Tsuchida Y, Uchino J, Takeda T, Iwafuchi M, Ohnuma N, Mugishima H, Yokoyama J, Nisihira H, Kawa K, Nagahara N, Suita S, Sawaguchi S. *Treatment results of advanced neuroblastoma with the first Japanese Study Group Protocol*. *J Pediatr Hematol Oncol* 1999; 21:190-197.

Khorasanizadeh S. *The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation*. *Cell* 2004; 116: 259-272.

- Kim JC, Yu JH, Cho YK, Jung CS, Ahn SH, Gong G, Kim YS, Cho DH. *Expression of SPRR3 is associated with tumor cell proliferation in less advanced stages of breast cancer.* Breast Cancer Res Treat 2012; 133:909-916.
- Koga Y, Pelizzola M, Cheng E, Krauthammer M, Szol M, Ariyan S, Narayan D, Molinaro AM, Halaban R, Weissman SM. *Genome-wide screen of promoter methylation identifies novel markers in melanoma.* Genome Res 2009; 19:1462-1470.
- Korkola JE, Blaveri E, DeVries S, Moore DH, Hwang ES, Chen YY, Estep A LH, Chew KC, Jensen RH, Waldman FM. *Identification of a robust gene signature that predicts breast cancer outcome in independent data sets.* BMC Cancer 2007; 7:61.
- Kouzarides T. *Chromatin modifications and their function.* Cell 2007; 128:693-705.
- Koyama H, Zhuang T, Light JE, Kolla V, Higashi M, McGrady PW, London WB, Brodeur GM. *Mechanisms of CHD5 Inactivation in neuroblastomas.* Clin Cancer Res 2012; 18:1588-1597.
- Kramer K, Gerald W, LeSauter L, Uri Saragovi H, Cheung NK. *Prognostic value of TrkA protein detection by monoclonal antibody 5C3 in neuroblastoma.* Clin Cancer Res 1996; 2:1361-1367.
- Kramer K, Gerald W, LeSauter L, Saragovi HU, Cheung NK. *Monoclonal antibody to human Trk-A: diagnostic and therapeutic potential in neuroblastoma.* Eur J Cancer 1997; 33:2090-2091.
- Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL. *Epigenetics and cancer treatment.* Eur J Pharmacol 2009; 625:131-142.
- Kron K, Pethe V, Briollais L, Sadikovic B, Ozcelik H, Sunderji A, Venkateswaran V, Pinthus J, Fleshner N, van der Kwast T, Bapat B. *Discovery of novel hypermethylated genes in prostate cancer using genomic CpG island microarrays.* PLoS One 2009; 4:e4830.
- Kushner BH. *Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies.* J Nucl Med 2004; 45:1172-1188.
- Kushner BH y Cohn SL. *Treatment of neuroblastoma* pp 124-137; Cheung NK y Cohn SL (ed.), *Neuroblastoma*, Springer-Verlag, Berlin 2005.
- Lacombe ML, Milon L, Munier A, Mehus JG, Lambeth DO. *The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases.* J Bioenerg Biomembr 2000; 32:247-258.
- Laird PW. *Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis.* Nat Rev Genet 2010;11:191-203.
- Lavarino C, Garcia I, Mackintosh C, Cheung NKV, Domenech G, Ríos J, Perez N, Rodríguez E, de Torres C, Gerald WL, Tuset E, Acosta S, Beleta H, de Álava E, Mora J. *Differential expression of gene mapping to recurrently abnormal chromosomal regions characterize neuroblastic tumors with distinct ploidy status.* BMC Med Genomics 2008; 1:36.
- Lavarino C, Cheung NK, Garcia I, Domenech G, de Torres C, Alaminos M, Rios J, Gerald WL, Kushner B, LaQuaglia M, Mora J. *Specific gene expression profiles and chromosomal abnormalities are associated with infant disseminated neuroblastoma.* BMC Cancer 2009; 9:44.
- Leone A, Seeger RC, Hong CM, Hu YY, Arboleda MJ, Brodeur GM, Stram D, Slamon DJ, Steeg PS. *Evidence for nm23 RNA overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas.* Oncogene 1993; 8:855-865.
- Light JE, Koyama H, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Mangino JL, Kolla V, London WB, Brodeur GM. *Clinical significance of NTRK family gene expression in neuroblastomas.* Pediatr Blood Cancer 2012; 59:226-232.
- Liu L, Kron KJ, Pethe VV, Demetrashvili N, Nesbitt ME, Trachtenberg J, Ozcelik H, Fleshner NE, Briollais L, van der Kwast TH, Bapat B. *Association of tissue promoter methylation levels of APC, TGFβ2, HOXD3 and RASSF1A with prostate cancer progression.* Int J Cancer 2011; 129:2454-2462.
- Liu Z, Yang X, Li Z, McMahon C, Sizer C, Barenboim-Stapleton L, Bliskovsky V, Mock B, Ried T, London WB, Maris J, Khan J, Thiele CJ. *CASZ1, a candidate tumor-suppressor gene, suppresses neuroblastoma tumor growth through reprogramming gene expression.* Cell Death and Differ 2011; 18:1174-1183.
- Li ZY, Xiong SH, Hu M, Zhang CS. *Epithelial membrane protein 1 inhibits human spinal chondrocyte differentiation.* Anat Rec 2011; 294:1015-1024.

Lombardi D, Lacombe ML, Paggi MG. *nm23: unraveling its biological function in cell differentiation*. J Cell Physiol 2000; 182:144-149.

London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Loot AT, Seeger RC, Shimada H, Thorner P, Brodeur G, Maris JM, Reynolds CP, Cohn SL. *Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology group*. J Clin Oncol 2005; 23:6559-6465.

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

López M, Mallorquín P, Vega M. *Microarrays y Biochips de ADN. Informe de Vigilancia Tecnológica*. Genoma España, Salud Humana. Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica / Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid, 2002.

Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, Wechsler MA, Tibshirani R, Botstein D, Levy R. *Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes*. N Engl J Med 2004; 350:1828-1837.

Lusser A y Kadonaga JT. *Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines*. Bioessays 2003; 25:1192-1200.

MacCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. *Cancer DNA methylation: Molecular mechanisms and clinical implications*. Clin Cancer Res 2009; 15:3927-3937.

Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, Johnson BE, Hong C, Nielsen C, Zhao Y, Turecki G, Delaney A, Varhol R, Thiessen N, Shchors K, Heine VM, Rowitch DH, Xing X, Fiore C, Schillebeeckx M, Jones SJ, Haussler D, Marra MA, Hirst M, Wang T, Costello JF. *Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters*. Nature 2010; 466:253-257.

Marfella CG y Imbalzano AN. *The Chd family of chromatin remodelers*. Mutat Res 2007; 618:30-40.

Maris JM. *The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification*. Curr Opin Pediatr 2005; 17:7-13.

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

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

Martín-Subero JI, Kreuz M, Bibikova M, Bentink S, Ammerpohl O, Wickham-Garcia E, Rosolowski M, Richter J, Lopez-Serra L, Ballestar E, Berger H, Agirre X, Bernd HW, Calvanese V, Cogliatti SB, Drexler HG, Fan JB, Fraga MF, Hansmann ML, Hummel M, Klapper W, Korn B, Küppers R, Macleod RA, Möller P, Ott G, Pott C, Prosper F, Rosenwald A, Schwaenen C, Schübeler D, Seifert M, Stürzenhofecker B, Weber M, Wessendorf S, Loeffler M, Trümper L, Stein H, Spang R, Esteller M, Barker D, Hasenclever D, Siebert R. *New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling*. Blood 2009; 113:2488-2497 (a).

Martin-Subero JI, Ammerpohl O, Bibikova M, Wickham-Garcia E, Agirre X, Alvarez S, Brüggemann M, Bug S, Calasanz MJ, Deckert M, Dreyling M, Du MQ, Dürig J, Dyer MJ, Fan JB, Gesk S, Hansmann ML, Harder L, Hartmann S, Klapper W, Küppers R, Montesinos-Rongen M, Nagel I, Pott C, Richter J, Román-Gómez J, Seifert M, Stein H, Suela J, Trümper L, Vater I, Prosper F, Haferlach C, Cruz Cigudosa J, Siebert R. *A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms*. PLoS One 2009; 4:e6986 (b).

Martinez R, Martin-Subero JI, Rohde V, Kirsch M, Alaminos M, Fernandez AF, Roperio S, Schackert G, Esteller M. *A microarray-based DNA methylation study of glioblastoma multiforme*. Epigenetics 2009; 4:255-264.

Maswelli RW y Marfil CF. *Variabilidad epigenética en plantas y evolución*. Journal of basic & applied genetics 2011; 22.

Matthay KK y Cheung NK V. *Treatment of neuroblastoma* pp 138-145; Cheung NK V y Cohn SL (ed.), *Neuroblastoma*, Springer-Verlag, Berlin 2005.

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

- Michiels S, Koscielny S, Hill C. *Interpretation of microarray data in cancer*. Br J Cancer 2007; 96:1155-1158.
- Miyajima Y, Kato K, Numata S, Kudo K and Horibe K. *Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood at diagnosis by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction for tyrosine hydroxylase mRNA*. Cancer 1995; 75:2758-2761.
- Modak S y Cheung NK V. *Neuroblastoma: Therapeutic strategies for a clinical enigma*. Cancer Treat Rev 2010; 36:307-317.
- Monclair T , Brodeur GM, Ambros PF, BrisseHJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, von Schweinitz D, Simon T, Cohn SL, Pearson DJ. *The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System: An INRG task force report*. J Clin Oncol 2009; 27:298-303.
- Molenaar JJ, van Sluis P, Boon K, Versteeg R, Caron HN. *Rearrangements and increased expression of cyclin D1 (CCND1) in neuroblastoma*. Genes Chromosomes Cancer 2003; 36:242-249.
- Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, Santo E, Geerts D, Versteeg R, Caron HN. *Cyclin D1 is a direct transcriptional target of GATA3 in neuroblastoma tumor cells*. Oncogene 2010; 29:2739-2745.
- Mora J, Cheung NK, Kushner BH, LaQuaglia MP, Kramer K, Fazzari M, Heller G, Chen L, Gerald W. *Clinical categories of neuroblastoma are associated with different patterns of loss of heterozygosity on chromosome arm 1p*. J Mol Diag 2000; 2:37-46.
- Mora J, Cheung NK, Juan G, Illei P, Cheung I, Akram M, Chi S, Ladanyi M, Cordon-Cardo C, Gerald WL. *Neuroblastic and Schwannian stromal cells of neuroblastoma are derived from a tumoral progenitor cell*. Cancer Res 2001; 61:6892-6898.
- Mora J y Gerald WL. *Origin of neuroblastic tumors: clues for future therapeutics*. Expert Rev Mol Diagn 2004; 4:293-302.
- Mora J, Cruz O, Morales L .*Tumores neuroblásticos. Neuroblastoma*. Ed M Cruz: Tratado de pediatría 9ª ed 2006 Ergon, Madrid.
- Mora J, Cruz O, De Torres C, Parareda A, Lavarino C, Rodríguez E. *To treat (with cytotoxics) or not to treat: the major challenge managing patients with neuroblastic tumors. Advances in neuroblastoma research meeting. Chiba, Japan, May 2008*.
- Mulero-Navarro S y Esteller M. *Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now*. Crit Rev Oncol Hematol 2008; 68:1-11.
- Murawska M y Brehm A. *CHD chromatin remodelers and the transcription cycle*. Transcription 2011; 2: 244-253.
- N**agahara N, Ohkawa H, Suzuki H, Tsuchida Y, Nakajou T. *Staging of neuroblastoma*. J Clin Oncol 1990; 8:179.
- Nakagawara A, Morita K, Okabe I, Uchino J, Ohi R, Iwafuchi M, Matsuyama S, Nagashima K, Takahashi H, Nakajo T, Hirai Y, Tsuchida Y, Saeki M, Yokoyama J, Nishi T, Okamoto E, Suita S. *Proposal and assessment of Japanese tumor node metastasis postsurgical histopathological staging system for neuroblastoma based on an analysis of 495 cases*. Jpn J Clin Oncol 1991; 21:1-7.
- Nakagawara A, Arima M, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. *Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas*. Cancer Res 1992; 52:1364-1368.
- Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM. *Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma*. N Engl J Med 1993; 328:847-854.
- O**berthuer A, Hero B, Spitz R, Berthold F, Fischer M. *The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome*. Clin Cancer Res 2004; 10:4307-4313.
- Oberthuer A, Berthold F, Warnat P, Hero B, Kahlert Y, Spitz R, Ernestus K, König R, Haas S, Eils R, Schwab M, Brors B, Westermann F, Fischer M. *Customized oligonucleotide microarray gene expression-based classification of neuroblastoma patients outperforms current clinical risk stratification*. J Clin Oncol 2006; 24:5070-5078.
- Oberthuer A, Theissen J, Westermann F, Hero B, Fischer M. *Molecular characterization and classification of neuroblastoma*.

Future Oncol 2009; 5:625-639.

Oberthuer A, Hero B, Berthold F, Juraeva D, Faldum A, Kahlert Y, Asgharzadeh S, Seeger R, Scaruffi P, Tonini GP, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G, Vandesompele J, Vermeulen J, Speleman F, Noguera R, Piqueras M, Bénard J, Valent A, Avigad S, Yaniv I, Weber A, Christiansen H, Grundy RG, Scharadt K, Schwab M, Eils R, Warnat P, Kaderali L, Simon T, Decarolis B, Theissen J, Westermann F, Brors B, Fischer M. *Prognostic impact of gene expression-based classification for neuroblastoma.* J Clin Oncol 2010; 28:3506-3515.

Ohira M, Morohashi A, Inuzuka H, Shishikura T, Kawamoto T, Kageyama H, Nakamura Y, Isogai E, Takayasu H, Sakiyama S, Suzuki Y, Sugano S, Goto T, Sato S, Nakagawara A. *Expression profiling and characterization of 4200 genes cloned from primary neuroblastomas: identification of 305 genes differentially expressed between favorable and unfavorable subsets.* Oncogene 2003; 22:5525-5536.

Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, Hirata T, Kubo H, Goto T, Yamada S, Yoshida Y, Fuchioka M, Ishii S, Nakagawara A. *Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate risk neuroblastomas.* Cancer Cell 2005; 7:337-350.

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

Otero AS. *NM23/nucleoside diphosphate kinase and signal transduction.* J Bioenerg Biomembr 2000; 32:269-275.

Ouatas T, Salerno M, Palmieri D, Steeg PS. *Basic and translational advances in cancer metastasis: Nm23.* J Bioenerg Biomembr 2003; 35:73-79.

Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Igarashi J, Fujita T, Silverman KA, Xhao H, Mosse YP, White PS, Brodeur GM. *Expression and sequence analysis of candidates for the 1p36.31 tumor suppressor gene deleted in neuroblastomas.* Oncogene 2008; 27:803-810.

Owens C y Irwin M. *Neuroblastoma: the impact of biology and cooperation leading to personalized treatments.* Crit Rev Clin Lab Sci 2012; 49:85-115.

Peris R, Felipe S, Fuentes G, Navarro R, Pardo E, Tamarit C. *Cáncer infantil en España. Estadísticas 1980-2009. Registro Nacional de Tumores Infantiles (RNTI-SEHOP).* Valencia: Universitat de València, 2010.

Pizzi S, Azzoni C, Bottarelli L, Campanini N, D'Adda T, Pasquali C, Rossi G, Rindi G, Bordi C. *RASSF1A promoter methylation and 3p21.3 loss of heterozygosity are features of foregut, but not midgut and hindgut, malignant endocrine tumours.* J Pathol 2005; 206:409-416.

Pogribny IP y Beland FA. *DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases.* Cell Mol Life Sci 2009; 66:2249-2261.

Quackenbush J. *Microarray analysis and tumor classification.* N Engl J Med 2006; 354:2463-2472.

Reiner O. *The unfolding story of two lissencephaly genes and brain development.* Mol Neurobiol 1999; 20:143-156.

Richardson B y Yung R. *Role of DNA methylation in the regulation of cell function.* J Lab Clin Med 1999; 134:333-340.

Richter J, Ammerpohl O, Martín-Subero JI, Montesinos-Rongen M, Bibikova M, Wickham-Garcia E, Wiestler OD, Deckert M, Siebert R. *Array-based DNA methylation profiling of primary lymphomas of the central nervous system.* BMC Cancer 2009; 9:455.

Rimokh R, Berger F, Bastard C, Klein B, French M, Archimbaud E, Rouault JP, Santa Lucia B, Duret L, Vuillaume M, Coiffier B, Bryon PA, Magaud JP. *Rearrangement of CCND1 (BCL1/PRAD1) 3' untranslated region in mantle-cell lymphomas and t(11q13)-associated leukemias.* Blood 1994; 83:3689-3696.

Rodríguez-Paredes M y Esteller M. *Cancer epigenetics reaches mainstream oncology.* Nat Med 2011; 17:330-339.

Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J. *Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons.* Dev Neurobiol 2011; 71:45-61.

Ryan DP y Owen-Hughes T. *Snf2-family proteins: chromatin remodellers for any occasion.* Curr Opin Chem Biol 2011;

Samarakoon PS. *Epigenomics and Genome Wide Methylation Profiling.* Sri Lanka Journal of Bio-Medical Informatics 2010; 1:53-62.

Sano H, Bonadio J, Gerbing RB, London WB, Matthay KK, Lukens JN, Shimada H. *International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age.* Eur J Cancer 2006; 42:1113-1119.

Savelyeva L, Corvi R, Schwab M. *Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells.* Am J Hum Genet 1994; 55:334-340.

Schimdt ML, Lal A, Seeger RC, Maris JM, Shimada H, O'Leary M, Gerbing RB, Matthay KK. *Favorable prognosis for patients 12 to 18 months of age with stage 4 nonamplified MYCN neuroblastoma: A Children's Cancer Group Study.* J Clin Oncol 2005; 23:6474-6480.

Schuster EF y Stöger R. *CHD5 defines a new subfamily of chromodomain-SWI2/SNF2-like helicases.* Mamm Genome 2002; 13:117-119.

Schramm A, Schulte JH, Klein-Hitpass L, Havers W, Sieverts H, Berwanger B, Christiansen H, Warnat P, Brors B, Eils J, Eils R, Eggert A. *Prediction of clinical outcome and biological characterization of neuroblastoma by expression profiling.* Oncogene 2005; 24:7902-7912.

Schwad M. *Molecular cytogenetics* pp 27-35; Cheung NK V y Cohn SL (ed.), *Neuroblastoma*, Springer-Verlag, Berlin 2005.

Shimada H, Chatten J, Newton WA Jr, Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, Marsden HB, Misugi K. *Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas.* J Natl Cancer Inst. 1984; 73:405-416.

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

Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA. *The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation.* Mol Cell Biol 2002; 22:4309-4318.

Simon T, Spitz R, Hero B, Berthold F, Faldum A. *Risk estimation in localized unresectable single copy MYCN neuroblastomas by the status of chromosomes 1p and 11q.* Cancer Lett 2006; 273:215-222.

Simon R, Radmacher MD, Dobbin K, McShane LM. *Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification.* J Natl Cancer Inst 2003; 95:14-18.

Speleman F, de Preter K, Vandesompele J. *Neuroblastoma genetics and phenotype: A tale of heterogeneity.* Semin Cancer Biol 2011; 21:238-244.

Staal FJ, van der Burg M, Wessels LF, Barendregt BH, Baert MR, van den Burg CM, van Huffel C, Langerak AW, van der Velden VH, Reinders MJ, van Dongen JJ. *DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor-B acute lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers.* Leukemia 2003; 17:1324-1332.

Strahl BD y Allis CD. *The language of covalent histone modifications.* Nature 2000; 403:41-45.

Stutterheim J, Gerritsen A, Zappeij-Kannegieter L, Kleijn I, Dee R, Hooft L, van Noesel MM, Bierings M, Berthold F, Versteeg R, Caron HN, van der Schoot CE, Tytgat GA. *PHOX2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma.* J Clin Oncol 2008; 26:5443-5449.

Takita J, Ishii M, Tsutsumi S, Tanaka Y, Kato K, Toyoda Y, Hanada R, Yamamoto K, Hayashi Y, Aburatani H. *Gene expression profiling and identification of novel prognostic marker genes in neuroblastoma.* Genes Chromosomes Cancer 2004; 40:120-132.

Tanaka T, Hiyama E, Sugimoto T, Sawada T, Tanabe M, Ida N. *trk A gene expression in neuroblastoma. The clinical significance of an immunohistochemical study.* Cancer 1995; 76:1086-1095.

Tanaka T, Sugimoto T, Sawada T. *Prognostic discrimination among neuroblastomas according to Ha-ras/trk A gene*

expression: a comparison of the profiles of neuroblastomas detected clinically and those detected through mass screening. *Cancer* 1998; 83:1626-1633.

Taniguchi Y, Tanaka O, Sekiguchi M, Takekoshi S, Tsukamoto H, Kimura M, Imai K, Inoko H. *Enforced expression of the transcription factor HOXD3 under the control of the Wnt1 regulatory element modulates cell adhesion properties in the developing mouse neural tube.* *J Anat* 2011; 219:589-600.

Tinker AV, Boussioutas A, Bowtell DDL. *The challenges of gene expression microarrays for the study of human cancer.* *Cancer Cell* 2006; 9:333-339.

Tiwari M. *Lymphomas: its gene expression profiling.* *J Cancer Res Ther* 2011; 7:393-398.

Theodorou E, Dalembert G, Heffelfinger C, White E, Weissman S, Corcoran L, Snyder M. *A high throughput embryonic stem cell screen identifies Oct-2 as a bifunctional regulator of neuronal differentiation.* *Genes Dev* 2009; 23:575-588.

Thompson PM, Gotoh T, Kok M, White PS, Brodeur GM. *CHD5, a new member of the chromodomain gene family, is preferentially expressed in the nervous system.* *Oncogene* 2003; 22:1002-1011.

Tost J y Gut IG. *Analysis of gene-specific DNA methylation patterns by pyrosequencing technology.* *Methods Mol Biol* 2007; 373:89-102.

Tsukiyama T. *The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors.* *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 422-429.

Turek-Plewa J y Jagodzinski PP. *The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression.* *Cell Mol Biol Lett* 2005; 10:631-647.

Van Noesel MM and Versteeg R. *Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic "Danse Macabre".* *Gene* 2004; 325:1-15.

Vermeulen J, De Preter K, Naranjo A, Vercruyse L, Van Roy N, Hellemans J, Swerts K, Bravo S, Scaruffi P, Tonini GP, De Bernardi B, Noguera R, Piqueras M, Cañete A, Castel V, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G, Michon J, Combaret V, Fischer M, Oberthuer A, Ambros PF, Beiske K, Bénard J, Marques B, Rubie H, Kohler J, Pötschger U, Ladenstein R, Hogarty MD, McGrady P, London WB, Laureys G, Speleman F, Vandesompele J. *Predicting outcomes for children with neuroblastoma using a multigene-expression signature: a retrospective SIOPEX/COG/GPOH study.* *Lancet Oncol* 2009; 10:663-671.

Virchow R. *Hyperplasie der Zirbel und der Nebennieren.* *Die Krankhaften Geschwulste* 1864; 11:149-150.

Wei JS, Greer BT, Westermann F, Steinberg SM, Son CG, Chen QR, Whiteford CC, Bilke S, Krasnoselsky AL, Cenacchi N, Catchpole D, Berthold F, Schwab M, Khan J. *Prediction of clinical outcome using gene expression profiling and artificial neural networks for patients with neuroblastoma.* *Cancer Res* 2004; 64:6883-6891.

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

Wood WG. *Screening for neuroblastoma* pp 7-18; Cheung NK V y Cohn SL (ed.), *Neuroblastoma*, Springer-Verlag, Berlin 2005.

Wright JH. *Neurocytoma or neuroblastoma, a kind of tumor not generally recognized.* *J Exp Med* 1910; 12:556-561.

Wulf P y Suter U. *Embryonic expression of epithelial membrane protein 1 in early neurons.* *Brain Res Dev Brain Res* 1999; 116:169-180.

Yao M, Huang Y, Shioi K, Hattori K, Murakami T, Sano F, Baba M, Kondo K, Nakaigawa N, Kishida T, Nagashima Y, Yamada-Okabe H, Kubota Y. *A three-gene expression signature model to predict clinical outcome of clear cell renal carcinoma.* *Int J Cancer* 2008; 123:1126-1132.

Zhang J, Cao W, Xu Q, Chen WT. *The expression of EMP1 is downregulated in oral squamous cell carcinoma and possibly associated with tumour metastasis.* *J Clin Pathol* 2011; 64:25-29.

Zheng LD, Tong QS, Tang ST, Du ZY, Liu Y, Jiang GS, Cai JB. *Expression and clinical significance of heparanase in neuroblastoma*. World J Pediatr 2009; 5:206-210.

Zilberman D y Henikoff S. *Genome-wide analysis of DNA methylation patterns*. Development 2007; 134:3959-3965.

Abreviaciones

ADN: ácido desoxiribonucleico
ADNc: ADN de cadena complementaria
ALK: *Anaplastic Lymphoma Kinase*
APC: *Adenomatous polyposis coli*
APS: adenosina-5'-fosfosulfato
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ATP: adenosina trifosfato sulforilasa, del inglés *Adenosine TriPhosphate*
Bcl2: *B-cell CLL/lymphoma 2*
BIRC5: *Baculoviral IAP repeat containing 5*
BRK: *Brahma and Kismet domains*
BTC: *Betacelluline*
C: citosina
CAMTA1: *Calmodulin binding transcription activator 1*
CASP8: *Caspase 8*
CASZ1: *Castor Zinc Finger 1*
CCND1: *Cyclin D1*
CCND2: *Cyclin D2*
CG: dinucleótido citosina-guanina
CH3: grupo metilo
CHD: *Chromodomain Helicase DNA binding*
CHD5: *Chromodomain Helicase DNA binding protein 5*
CHGA: *Chromogranin A*
COG: Grupo de Oncología Pediátrica de los Estados Unidos, del inglés *Children's Oncology Group*
DCX: *Doublecortin*
DDX53: *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 53*
DM: Cuerpos cromatínicos, del inglés *Double Minute*
DNMT: enzima ADN metil-transferasa, del inglés *Mammalian DNA methyltransferase*
dNTP: deoxi-nucleótido fosfato, del inglés *Deoxyribonucleotide triphosphate*
EFS: supervivencia libre de evento, del inglés *Event Free Survival*
EGF: *Epidermal growth factor*
EMP1: *Epithelial membrane protein-1*
ENO: *Enolase 2 (gamma, neuronal)*
ESIOP NB: Grupo de Estudio de NB Europeo dentro de la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica Europea, del inglés *European Society of International Paediatric Oncology NB*
FGF6: *Fibroblast growth factor 6*
FYN: *FYN oncogene related to SRC, FGR, YES (FYN)*
G: guanina
GATA3: *GATA binding protein 3*
GD2 synthase: *beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1*
GN: ganglioneuroma
GNB: ganglioneuroblastoma
GNBi: ganglioneuroblastoma intermedio
GNBn: ganglioneuroblastoma nodular
GPOH: Grupo de Oncología y Hematología Pediátrica Alemán, del inglés *German Pediatric Oncology and Hematology Group*
GST: gen supresor de tumor
hiperM: hipermetilación
hipoM: hipometilación
HOXA9: *Homeobox A9*
HOXD3: *Homeobox D3*
HPA: *Heparanase*
HPCE: electroforesis capilar de alta resolución, del inglés *High Performance Capillary Electrophoresis*
HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*
HRAS: *v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*
HSR: regiones cromosómicas de tinción homogénea, del inglés *Homogeneously Staining Regions*
iCpG: isla de dinucleótidos CG
IGF2: *Insulin-like growth factor 2*
INO80: *Inositol Auxotroph mutant 80*
INPC: Clasificación Histopatológica Internacional del NB: Clasificación de Shimada, del inglés *International Neuroblastoma Pathology Classification, the Shimada System*,
INRG: Grupo Internacional de Riesgo de Neuroblastoma, del inglés *International Neuroblastoma Risk Group*

INSS: Sistema Internacional de Estadificación del NB, del inglés *International Neuroblastoma Staging System*

IRF6: *Interferon regulatory factor 6*

ISWI: *Imitation SWItch*

JANB: Grupo Japonés de Estudios Avanzados en NB, del inglés *Japanese Advanced NB Study Group*

JINC: Grupo de Estudio Cooperativo Japonés de NB infantil, del inglés *Japanese Infantile Neuroblastoma Co-operative Study Group*

KCNB2: *potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2*

KRT9: *Keratin 9*

LINE: *Long Interspersed Nuclear Elements*

me5C: residuo 5-metilcitosina

MKI: Índice mitótico-cariorréxico, del inglés *Mitosis-Karyorrhexis Index*

MYCN: *v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived*

MRD: enfermedad mínima residual, del inglés *Minimal Residual Disease*

NB: neuroblastoma

NME1: *Nonmetastatic cells 1, protein expressed in*

NURD: *NUcleosome Remodeling and histone Deacetylase*

OS: supervivencia global, del inglés *Overall Survival*

PAFAH1 β 1: *Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoforma 1B*

pb: pares de bases

PCA: análisis de componentes principales, del inglés *Principal Component Analysis*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *Polymerase Chain Reaction*

PDH: *Plant Homeo Domain*

PHOX2B: *Paired-like Homeobox Domain 2B*

POU2F2: *POU class 2 homeobox2*

PPM1D: *Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1D*

PRAME: *Preferentially expressed antigen in melanoma*

PRC: complejos represivos de la familia Polycomb, del inglés *Polycomb Repressive Complex*

qRT-PCR: cuantificación en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*

RAR β 2: *Retinoic acid receptor, beta 2*

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

RIZ: *Retinoblastoma protein-Interacting Zinc finger gene*

RNM: resonancia magnética nuclear

RNTI: Registro Nacional de Tumores Infantiles

RPL22: *Ribosomal Protein 22*

SAM: S-adenosil-metionina

SANT: *Switching-defective protin 3, Adaptor 2, Nuclear receptor co-repressor, Transcription factor IIIB*

SDR: *Smallest Region of consistent Deletion*

SPRR3: *Small proline-rich protein 3*

SWI/SNF: *mating tipe SWItching/Sucrose Non Fermenting*

TAC: tomografía axial computarizada

TGF β 2: *Transforming growth factor, beta 2*

TH: *Tyrosine Hydroxylase*

TIMP3: *TIMP metallopeptidase inhibitor 3*

TMS1: *PYD and CARD domain containing*

TN: tumores neuroblásticos

TrkA: *Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1*

TSS: inicio de transición, del inglés *Transcription Start Site*

ZNF423: *Zinc finger protein 423*

Anexos

Anexo 1. Tabla resumen del Sistema de clasificación del riesgo clínico en NB del Grupo de Oncología Pediátrica de los Estados Unidos.

Estadio INSS	Edad	Estado de MYCN	Histología INPC	Índice de ADN	Grupo de Riesgo
1	0-21 años	Cualquiera	Cualquiera	Cualquiera	Bajo
2A/2B	<1 año	Cualquiera	Cualquiera	Cualquiera	Bajo
	>= 1 año - 21 años	NA	Cualquiera	-	Bajo
	>= 1 año - 21 años	A	Favorable	-	Bajo
	>= 1 año - 21 años	A	Desfavorable	-	Alto
3	<1 año	NA	Cualquiera	Cualquiera	Intermedio
	<1 año	A	Cualquiera	Cualquiera	Alto
	>= 1 año - 21 años	NA	Favorable	-	Intermedio
	>= 1 año - 21 años	NA	Desfavorable	-	Alto
	>= 1 año - 21 años	A	Cualquiera	-	Alto
4	<1 año	NA	Cualquiera	Cualquiera	Intermedio
	<1 año	A	Cualquiera	Cualquiera	Alto
	>= 1 año - 21 años	Cualquiera	Cualquiera	-	Alto
4S	<1 año	NA	Favorable	>1	Bajo
	<1 año	NA	Cualquiera	=1	Intermedio
	<1 año	NA	Desfavorable	Cualquiera	Intermedio
	<1 año	A	Cualquiera	Cualquiera	Alto

NA: No Amplificado

A: Amplificado

Anexo 2. Tabla resumen del Sistema de clasificación de riesgo clínico en NB del Ensayo Clínico NB2004, del Grupo de Oncología y Hematología Pediátrica Alemán.

Estadio INSS	Estado de MYCN	Edad	Alteración 1p	Grupo de Riesgo
1	NA	Cualquiera	-	Bajo
	A	Cualquiera	-	Alto
2	NA	Cualquiera	No	Bajo
	A	Cualquiera	Si	Intermedio
3	NA	<2 años	No	Bajo
	NA	>=2 años	No	Intermedio
	A	Cualquiera	-	Alto
4	NA	<1 año	-	Intermedio
	A	<1 año	-	Alto
	Cualquiera	>= 1 año	-	Alto
4S	NA	<1 año	-	Bajo
	A	<1 año	-	Alto

NA: No Amplificado

A: Amplificado

Anexo 3. Tabla resumen del Sistema de clasificación del riesgo clínico en NB del Grupo Japonés de Estudios Avanzados en NB.

Estadaje japonés	Edad	Estado de MYCN	Grupo de Riesgo
1	Cualquiera	NA	Bajo
2	Cualquiera	NA	Bajo
3	<1 año	NA	Bajo
	>1 año	NA	Intermedio
4A o 4B	<1 año	NA	Intermedio
	>1 año	NA	Alto
4S	<1 año	NA	Bajo
Cualquiera	Cualquiera	A	Alto

NA= No Amplificado

A= Amplificado

Anexo 4. Tabla resumen del Sistema de clasificación del riesgo clínico en NB del Grupo de Estudio de NB de la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica Europea.

Estadaje ESIOP	Edad	Estado de MYCN	Grupo de Riesgo
1	0-18 años	-	Bajo
2 o 3 extirpables	0-11 meses	NA	Bajo
		A	Alto
	>12 meses a 18 años	NA	Bajo
		A	Alto
2 o 3 no extirpables	0-11 meses	NA	Intermedio
		A	Alto
	>12 meses a 18 años	NA	Intermedio
		A	Alto
4	0-11 meses sin metastásis ósea	NA	Bajo
	0-11 meses con metastásis ósea	NA	Intermedio
	0-11 meses	A	Alto
	>12 meses a 18 años	A	Alto
4S	0-11 meses	NA	Bajo
		A	Alto

NA= No Amplificado

A= Amplificado



Identification of tumoral glial precursor cells in neuroblastoma

Sandra Acosta^a, Gemma Mayol^a, Eva Rodríguez^a, Cinzia Lavarino^a, Katleen de Preter^b, Candy Kumps^b, Idoia Garcia^a, Carmen de Torres^a, Jaume Mora^{a,*}

^a *Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain*

^b *Center for Medical Genetics, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium*

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 October 2010

Received in revised form 29 July 2011

Accepted 1 August 2011

Keywords:

Glial development

Neuroblastoma

Neural crest precursor cells

Neuroblasts differentiation

Tumor cell origin

ABSTRACT

Neuroblastic tumors (NBT) are composed by neuroblasts and Schwannian-like stroma. The origin of these two cell subtypes remains unclear. In this study, we describe, a neuroblastic-like subpopulation in neuroblastoma (NB) coexpressing GD2 and S100A6, neuroblastic and glial lineage markers respectively. The GD2⁺/S100A6⁺ neuroblastic subpopulation was found to be enriched in low risk NB, distributed around the perivascular niche. Some stromal bundles showed GD2⁺/S100A6 costaining. Metastatic bone marrow specimens also showed GD2⁺/S100A6⁺ cells. During *in vitro* retinoic acid induced differentiation of NB cell lines, rare GD2⁺/S100A6 neuroblastic cells appeared. We conclude that GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts may represent a tumoral glial precursor subpopulation in NBT.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Neuroblastoma (NB) is the most common pediatric extracranial tumor and its origin has been clearly associated to the development of the sympathetic nervous system [1,2]. Histologically, NB is mainly composed by neuroblasts at different stages of differentiation, and a variable amount of Schwannian-like stroma [3]. The ratio of both cell types varies according to the degree of tumor maturation and a correlation has been established between the degree of differentiation of the neuroblastic subtype, the proportion of the Schwannian-like stroma and the outcome of the patient, being the undifferentiated stroma-poor NB the most malignant and the stroma-rich ganglioneuroma (GN) a benign form [3,4].

The origin of the Schwannian-like stromal cell remains controversial, and the relationship between Schwannian-like stromal cells and neuroblastic cells has not yet been

clarified. Since the amount of the Schwannian-like stroma has been so clearly associated to better prognosis, it has been speculated that Schwannian-like cells in the tumor may influence tumor growth by secreting antiproliferative and/or antiangiogenic signals [5,6]. In this regard, experimental evidence shows that when co-cultured *in vitro*, neuroblasts derived from neuroblastoma tumors can enhance the proliferation of Schwann cells [7]. One hypothesis is that both the Schwannian-like stromal cells and the neuroblastic cells could arise from pluripotent neoplastic cells originating from the neural crest. Mora et al. showed that Schwannian-like stromal cells had the same genetic alterations as neuroblastic cells [8]. An alternative theory, proposed by Ambros and colleagues [9], stated that Schwannian-like stromal cells in neuroblastic tumors are likely to be reactive in nature and may have been recruited from normal tissues. Recent studies have provided evidence supporting both hypothesis, Du et al. [10] showed how human bone marrow stromal or mesenchymal stem cells differentiate into Schwannian stroma cells when injected into xenografted human NB tumors in a murine model and in co-culture with NB cells *in vitro*. Whereas, Coco et al. [11] identified loss of heterozygosity at 1p36 loci in both the Schwannian cell

* Corresponding author. Address: Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu, Edifici Docent, 4th Floor, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain. Tel.: +34 932804000; fax: +34 936006119.

E-mail address: jmora@hsjdbcn.org (J. Mora).

component and the whole ganglioneuroblastoma intermixed (Schwannian-rich) tumor specimen. Also, Delattre's group [12] suggested that Schwannian-like stromal do not derive from neuroblastic cells, but that nevertheless both cell populations share a common multipotential progenitor

In vitro, NB cell lines have been subjected to induced differentiation towards both neuronal and glial-like cells, suggesting that undifferentiated neuroblasts retain a multipotential state [13,14] and are able to recapitulate the differentiation process of the neural crest cells of the trunk [15]. In 1973 Biedler et al. [16] described for the first time three cell subtypes spontaneously arising in NB cell line cultures: the N (neuroblastic), S (substrate adherent) and I (intermediate) subtypes. These three cell line subtypes were isolated and characterized on the basis of the different cell morphology, cell culture behavior and protein expression pattern [16,17]. I-subtype cells have been proposed as NB stem cells [18,19]. These cells have morphological and culture growth characteristics that are "intermediate" between N- and S-type cells, and express marker proteins of both cell lineages. I-type cells have been reported to have a bipotential capacity to differentiate towards both neuronal and glial lineage when induced with retinoic acid and 5-bromo-2'-deoxyuridine, respectively. According to our previous studies *in vitro*, the cell membrane ganglioside GD2, and the calcium binding protein S100A6 were found to be reliable markers for the identification of neuroblastic and glial lineage cells, respectively [13]. Our results showed that N- and I-type cells possess a similar differentiation potential and represent an uncommitted stage between neuronal and glial fates, whereas S-type cells seem to be committed towards a glial lineage fate

The aim of the present study was to explore *in vivo* in NBT, the presence of cells that express simultaneously neuronal (GD2) and glial (S100A6) cell lineage marker proteins, bipotential cells, that could embody a potential NBT precursor or initiating cell. In this study, we have identified, in primary NB tumor samples, a morphologically undistinguishable tumoral subpopulation of neuroblasts that have features of both neuronal and glial features. *In vitro*, we were able to recapitulate the differentiation stages which give rise to these bipotential cells, and demonstrate how some neuroblastic tumor cells give rise to other cellular components of the tumor.

2. Material and methods

2.1. Patients and samples

Thirty-seven NBT (18 NB, 2 GNB and 2 GN at diagnosis and 15 NB post-treatment) snap frozen tumor specimens as well as 8 metastatic bone marrow biopsies were obtained from patients diagnosed and uniformly treated at Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona (HSJD). Tumor cell content and viability was evaluated by pathologist. This study was approved by the Institutional Review Boards and informed consent was obtained before collection of all samples.

2.2. Immunostaining

Tumor tissue cryosections (5 μ m) and bone marrow smears were fixed with paraformaldehyde (PFA) 4% pH 7.4 for 20 min., nonspecific sites were blocked with bovine serum albumin (BSA) 1% 30 min⁻¹ h. Primary antibodies specific for S100A6 (CACY-100 clone; 1:1000; Sigma, US), GD2 (14.G2a; 1:800; BD, US), CD34 (prediluted; Novocastra, UK) and PARP p85 (1:1500; Promega, US) were incubated for 1–3 h at room temperature or overnight (O/N) at 4 °C. DAB Novolink Polymer Detection System (Novocastra, UK) was used for immunohistochemical staining. For immunofluorescence analysis, secondary antibodies anti-mouse IgG labelled with Cy3 and FITC (Sigma, US) were incubated for 45 min. Nuclei counterstaining was performed with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) for immunofluorescence and hematoxylin for immunohistochemistry.

2.2.1. Double immunofluorescence

Cryosections were fixed and blocked as described above, anti-S100A6 (1:1000) was incubated O/N at 4 °C and then with anti-mouse IgG-Cy3 (1:400) for 45 min. Second blocking step was performed using FAB fragments (1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories, US) during 30 min. Anti-GD2 (1:800; BD, US) was incubated 30 min and then stained with anti-mouse IgG-FITC (1:700; Sigma, US). Nuclei were counterstained with DAPI (1:5000; Sigma, US).

Cryosections were mounted with anti-shade mounting media (Vector Laboratories, US). Slides were kept at -20 °C until analyzed with a Leica 5000B epifluorescence microscope.

The proportion of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts was assigned a score from 0 to 3: 0 = <1%; 1 = 1–10%; 2 = 10–25%; 3 = >25% of the totality of neuroblasts in the sample.

2.3. Differentiation induction

Neuronal differentiation was induced in three NMYC amplified neuroblastoma cell lines, SK-N-BE2C and SK-N-LP, both I-type and LAN-55 N, N-type cell line, by addition of 1 μ M of all-*trans* retinoic acid (ATRA) during 60 days, following the protocol described previously [13].

2.4. Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Nine snap-frozen tumor biopsies, collected and stored following our institution biobank advices, were used for FACS and subpopulations analysis. Tumor fragments were washed with HBSS (Sigma, US), dissected into small pieces of 1 mm³ and subsequently, enzymatically disaggregated with 1 mg/ml Collagenase IV (Sigma, US) and 2000 units DNase I (Sigma, US) in 4 ml of HBSS during 30 min–1 h (h) at 37 °C in a shaking bath. Cells were washed and centrifuged 1.5g for 5 min. Disaggregated tumor cells were fixed in 0.5% PFA during 2 h. Cells were incubated with anti-S100A6 antibody (1:50) O/N at 4 °C and the secondary antibody anti-mouse IgG1-Hilyte647 (1:300; Anaspec, US) during 45 min. The second antibody staining was performed by incubating anti-GD2 (3:100) during 1 h and the secondary antibody anti-mouse IgG-FITC (1:400)

during 45 min. After each step cells were washed twice in 1.5 ml PBS and finally resuspended in 0.5–1 ml PBS and kept at 4 °C in darkness until analyzed. All the antibodies were diluted in 1% BSA. Cell sorting was performed using the BD FACSAria cell sorter (Beckton Dickinson, US).

As positive control of the double staining procedure, GD2⁺/S100A6⁻ SK-N-ER cell line and GD2⁻/S100A6⁺ LA1-5S (S-type) cells were mixed in a 1:1 proportion and analyzed as mentioned above.

DNA staining was performed with Hoeschst 33342 (Ho342) (Sigma, US).

CD133 staining analysis was performed as follows: 10⁶ fixed disaggregated tumor cells were incubated with anti-CD133-PE O/N at 4 °C (AC133; 1:10; Miltenyi Biotech, Germany) and negative control staining was performed by incubating fixed disaggregated tumor cells with IgG-PE (1:300; Sigma, US).

2.5. NMYC copy number determination

Sorted cell subpopulations were centrifuged 5000g 5 min and DNA extraction was performed using QiaAMP DNA Micro kit (Qiagen) following manufacturer's protocol. DNA was quantified using Nanodrop N-1000. NMYC gene copy number was determined by Q-PCR as described elsewhere [20].

3. Results

3.1. GD2⁺/S100A6⁺ cell subpopulation in neuroblastic tumor samples

In our previous studies *in vitro*, GD2 and S100A6 proteins were found to be reliable markers for the identification of neuroblastic and glial lineage cells, respectively [13]. Here, both markers were used to study primary neuroblastoma tumor samples.

In all primary neuroblastic tumor samples analyzed ($n = 22$), intense cell membrane GD2 expression was observed in all the cells morphologically identified as neuroblastic (Fig. 1). Conversely, no GD2 specific staining was detected in primary ganglioneuroma ($n = 2$) or ganglioneuroblastoma ($n = 2$) tumors, showing specific expression only in the morphologically undifferentiated neuroblasts (data not shown). S100A6 expression was detected in the nuclear membrane of all the cells constituting the Schwannian stroma and also in cells morphologically assessed as blood vessels. Moreover, S100A6 nuclear expression was observed in isolated, sparse undifferentiated neuroblasts (Fig. 1).

On the basis of these results, GD2 and S100A6 double immunostaining was performed in 18 primary non-treated diagnostic NB samples and 15 post-treatment specimens. Concomitant expression of both markers was observed in a subpopulation of neuroblasts (<25% of the total) in 16 (89%) of the 18 samples obtained at diagnosis. In those tumors, the majority of the GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts within the tumor were found isolated and surrounded by GD2⁺/S100A6⁻ neuroblasts. In primary tumors, besides the GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts, also some morphologically Schwannian-like double stained cells were identified in the stromal bundles and in some of the blood vessels (Fig. 1, arrows). In 7 out of 15 (46%) post-treatment cases analyzed, GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts were found, showing a scattered distribution amongst the GD2⁺/S100A6⁻ neuroblasts and, in some cases, also some blood vessels were GD2⁺/S100A6⁺.

Altogether, a small subpopulation of neuroblasts is double stained with both GD2/S100A6, neuroblastic and stromal markers respectively. The co-expression of GD2 and S100A6 in non neuroblastic cells might enlighten their potential tumorigenic origin.

3.2. GD2⁺/S100A6⁺ cells in clinically relevant subgroups of NBTs

Since a broad range (0–25%) of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts was detected amongst the different NBTs analyzed, we investigated the relationship between the number of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts and the

clinico-pathological features of the tumors. The proportion of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts was analyzed with respect to recognized clinico-pathological risk factors. High risk tumors were defined as those tumors with NMYC amplification or stage four disease, and low risk tumors defined as tumors with stages 1, 2, 3, 4s and NMYC not amplified.

No differences were identified in the proportion of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts among histologically defined undifferentiated/poorly differentiated and differentiating neuroblastoma tumors. A statistically significant ($p = 0.0081$) difference was detected when low risk and high risk tumors were compared, being the low risk tumors those with a higher number of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts. A mean proportion average proportion of 20% GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts of the total neuroblastic population was identified for low-risk cases, whilst only an average of 9% GD2⁺/S100A6⁺ was identified in the high risk cases (Fig. 2A).

Seven (46%) out of 15 post-treatment NB samples analyzed contained undifferentiated/poorly differentiated neuroblasts. In all of these samples a highly variable percentage (ranged from 0% to 45%) of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblastic cells was seen. The presence of co-stained cells was restricted to the non-necrotic/fibrotic areas where blood vessels could be identified (Fig. 2B). When the high-risk tumors at diagnosis were compared with the post-treatment samples the proportion of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts were higher in the post-treatment samples, however, the variability amongst these cases was too high to be statistically significant (Fig. 2A).

Taken together, these data suggest that in NB the proportion of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts is associated with the clinical risk of the tumor and not with the histopathological features.

3.3. Perivascular distribution of GD2⁺/S100A6⁺ cells

In brain tumors, the distribution of cancer stem cells has been described to be perivascular [21]. In this study, we have analyzed the perivascular distribution of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts, in order to see if they follow a specific distribution. To this purpose, serial cryosections of 6 tumors (4 pre and 2 post-treatment) were stained with GD2/S100A6 and CD34/S100A6. The GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts showed a tendency to lay close to the stromal areas, where the blood vessels can be found too (Fig. 2B). The perivascular distribution of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts was quantified in the cell layers surrounding the blood vessels. An enrichment of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts was found in the cell layers closest to the blood vessels (Fig. 2C) ($p < 0.01$). These results suggest that GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts are not distributed randomly, but either arise from or tend to populate the near stromal regions.

3.4. GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts in bone marrow metastasis

To determine whether the GD2⁺/S100A6⁺ neuroblastic subpopulation is present in the metastatic sites, bone marrow (BM) specimens from 8 NB patients with diffuse BM disease were analyzed by double immunofluorescence.

To assess the GD2/calcyclin specificity in the BM tissue, BM aspirates from 1 non-tumoral and 4 non-neuroblastoma tumor (Ewing sarcoma, retinoblastoma, Langherhans cell histiocytosis, and esthesioneuroblastoma) patients were also analyzed as negative controls. In these samples, no GD2 staining was detected in the BM cell subpopulations, while S100A6 nuclear membrane staining was observed in immature lymphocytes as previously reported [22]. Conversely, all the NB bone marrow samples analyzed ($n = 8$), showed cell membrane GD2 staining in the neuroblastic aggregates. In all of these clusters, one or two morphologically neuroblastic cells (never representing more than 10% of the total cells of the aggregate) were concomitantly positive for GD2 in the cell membrane and for S100A6 in the nuclear membrane (Fig. 2D). Thus, the GD2⁺/S100A6⁺ subpopulation of neuroblasts was also present in the BM metastatic site.

3.5. Cell apoptosis

Recently, upregulation of S100A6 expression has been related with cell growth inhibition and apoptosis [23,24]. We found an increase in the amount of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts in post-treatment specimens showing areas of cell differentiation as well as necrosis. In order to investigate a potential association of S100A6 immunostaining with apoptosis processes, GD2/S100A6 double staining was performed in parallel with

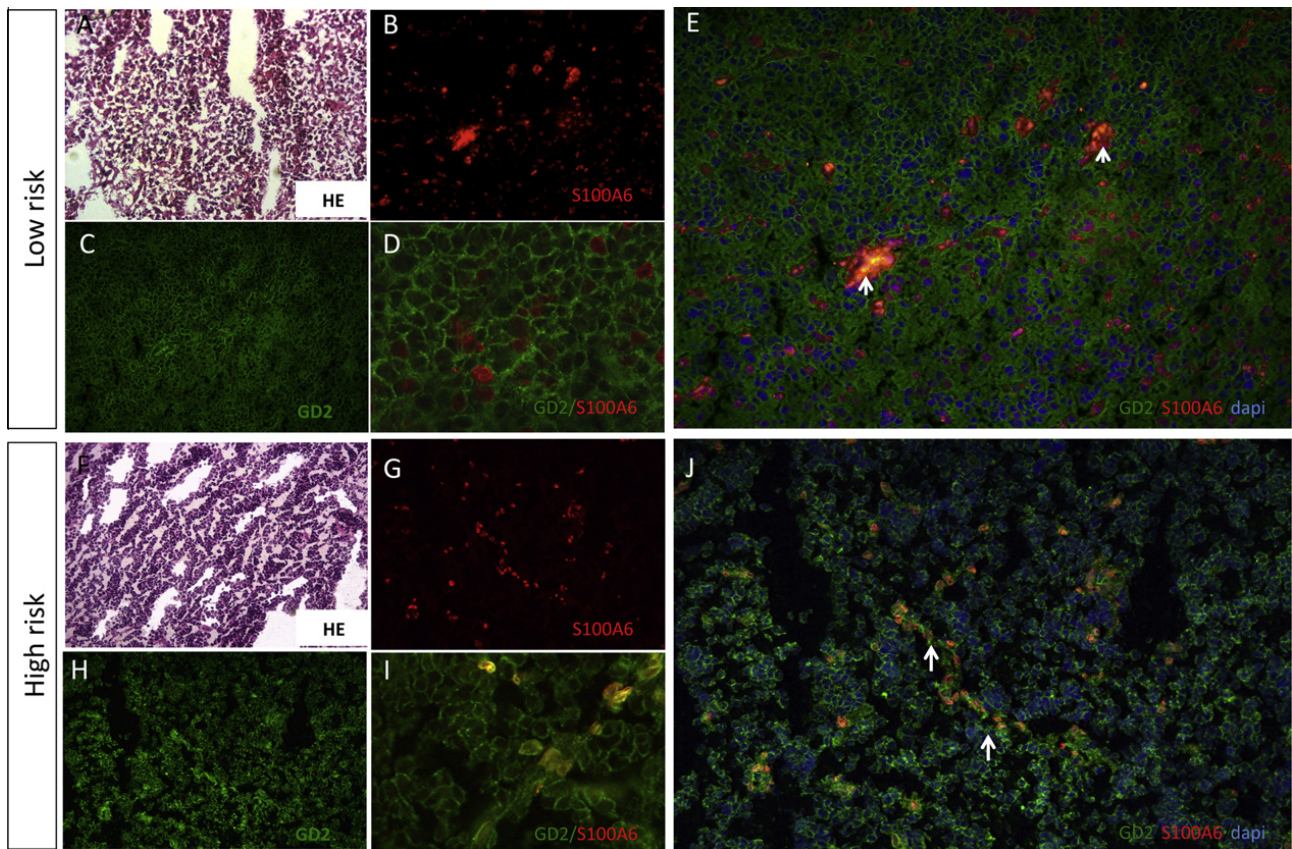


Fig. 1. Identification of the GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts in low and high risk neuroblastoma. The majority of tumor cells are GD2⁺/S100A6⁻ neuroblastic cells; a variable proportion of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts and stromal regions were both GD2⁻/S100A6⁻ and GD2⁺/S100A6⁺. (A–E) Stainings in low risk neuroblastoma. (F–J) High risk neuroblastoma. (A and F) Control section of hematoxylin-eosin (HE) is shown (10× magnification). (B and G) S100A6 staining. (C and H) GD2 staining (D and I) High magnification (63×) showing GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts. (E and J) Different amount of GD2⁺/S100A6⁺ can be identified in the low risk versus the high risk tumor (20× magnification). White arrows show the blood vessels.

caspase-cleaved fraction of the Poly (ADP-ribose) polymerase (p85 PARP) in serial tumor cryosections ($n = 6$). Both the localization and the percentage of p85 PARP positive cells within the analyzed tumors sections showed no correspondence with GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts (Fig. 3). These results suggest that GD2⁺/S100A6⁺ expression is not related to apoptotic processes in NB.

3.6. GD2⁺/S100A6⁺ neuroblast cells isolation

In order to further characterize the GD2⁺/S100A6⁺ NB tumor cell subpopulations, we proceeded to the isolation of these cells by Fluorescence activated cell sorting (FACS).

FACS analysis was performed in 9 snap-frozen enzymatically disaggregated tumor specimens (6 pre-treatment, 1 post-treatment and 2 tumor relapse) from 8 different patients. All tissue samples taken at diagnosis and relapse were composed of >70% of viable tumor cells. Cell viability ranged between 30% and 90% of the total cell population for all the samples analyzed (Fig. 4A). The only case that showed 30% viability was the post-treatment sample with a high percentage of tissue necrosis. Cellular debris and red blood cell contamination were discarded from the analysis by Ho342 DNA staining. Forward and side scatter (FSC_SSC) analysis also showed two different subpopulations, one bigger and more complex, and another smaller and less complex. The small cell subpopulation showed significant GD2 staining, suggesting the neuroblastic identity.

The percentage of GD2⁺ cells ranged from 15% to 89% of the totality of nucleated cells, and thus are potentially tumor cells. On the other hand, 3–53% of these cells were S100A6 positive. GD2⁺/S100A6⁺ double stained cells represented percentages ranging from 11% to 53% of cells, distributed both in the large and small identified subpopulations identified (Fig. 4). In most of the tumors, the small size subpopulation showed the highest

number of GD2⁺/S100A6⁺ cells (Fig. 4C). The large cell subpopulation was composed of cells expressing different patterns and intensities of GD2 and S100A6 markers, suggesting that it may include heterogeneous cell subpopulations like glial cells, endothelial cells as well as more differentiated neuroblasts. (Fig. 4D).

As described above, the low risk tumors contained a higher proportion of GD2⁺/S100A6⁺ cells. Confirming the immunostaining results, different subpopulations have been identified according to the GD2/S100A6 staining.

To assess if the GD2⁺/S100A6⁺ cells could represent a potential cancer stem cell subpopulation fraction, CD133 staining was performed in 4 samples in parallel with GD2/S100A6 staining. A small percentage of CD133⁺ cells was identified; 0.1–0.7% of the total viable population (Fig. 4E and F). The difference in the proportion of CD133⁺ cells and GD2⁺/S100A6⁺, suggests that these 2 populations are not equivalent, and that the GD2⁺/S100A6⁺ cell fraction is not enriched with tumor initiating cells.

3.7. Common tumor cell origin

In our study, we have identified NB intratumoral cell clones with differential GD2/S100A6 staining. We have thus investigated if these different cell populations could derive from a potential common precursor cell. NMYC amplification was used as a molecular marker amongst the sorted cell subpopulation isolated from three NMYC amplified NB tumor.

As expected, the neuroblastic subpopulation, stained only against the GD2 ganglioside (the whole neuroblastic subpopulation) showed NMYC gene amplification levels comparable to the original tumor. Moreover, in all the analyzed tumors, the Schwannian-like subpopulation, here identified by S100A6 nuclear staining, displayed a similar level of NMYC

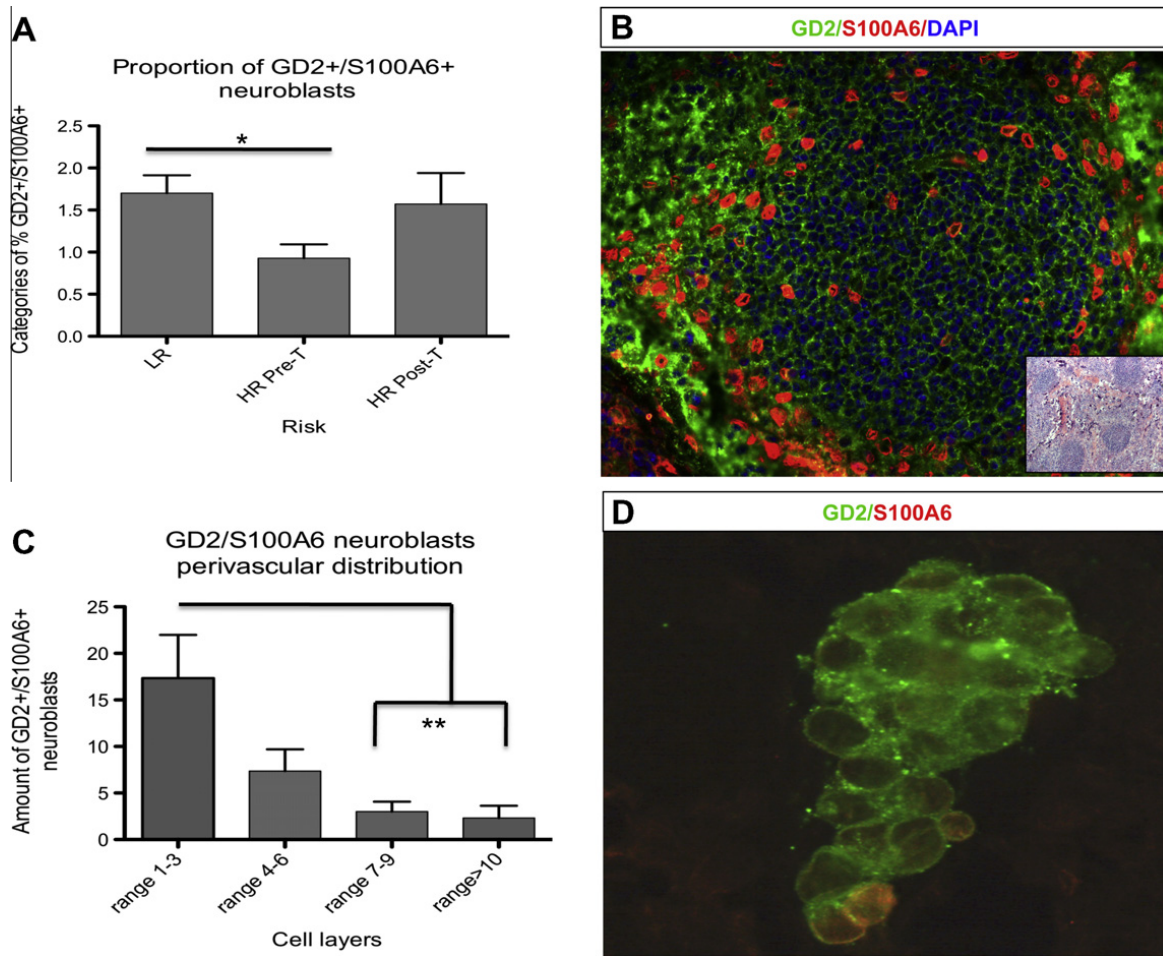


Fig. 2. GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts distribution. (A) Chart showing the average proportion of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts in all the tumors analyzed according to risk groups: low risk (LR) and high risk (HR) pre (Pre-T) and post (post-T) treatment tumors were analyzed separately. * (*t*-test value *p* = 0.0081); Proportion of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts by categories: 0 = <1%; 1 = 1–10%; 2 = 10–25%; 3 = >25%. (B) Peristromal distribution of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts in a high risk tumor (20× magnification), HE staining in the inner panel shows the distribution of blood vessels in the tumor (10× magnification). (C) Chart showing the proportion of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts in relation to the cellular layers surrounding the blood vessels. The amount are calculated clustering the 7–9: layers 7, 8, and 9 and >10 layers: layers 10–15.). The distribution of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts was statistically significant in range 1–3 when compared with all the other ranges (One-way ANOVA *p* < 0.01). (D) GD2⁺/S100A6 co-staining of a neuroblastic aggregate from a BM metastasis (63× magnification).

amplification. Interestingly, the double stained GD2⁺/S100A6⁺ subpopulation also showed NMYC amplification (Fig. 5). Taken together, these results suggest the existence of a common tumor precursor cell for all the isolated subpopulations that composed the bulk of these primary tumors.

3.8. GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts in neuronal induced differentiation

In our previous study, we report the appearance in N- and I-type cell cultures, exclusively GD2⁺/S100A6[–] cells, of a small percentage of morphologically glial-like cells that acquire nuclear S100A6 staining upon 2–3 weeks of neuronal induced differentiation with ATRA [13].

In order to recapitulate *in vitro* the differentiation process involved in the development of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts *in vivo*, we induced neuronal differentiation with ATRA in 2 I- and 1N-type cell lines. In the representative I-type cell line, SK-N-Be2C, during the first week of treatment, few GD2⁺ neuroblasts, located in the surroundings of the neuroblastic clusters, acquired positive nuclear membrane S100A6 staining (Fig. 6A). After 2 weeks, the GD2⁺/S100A6⁺ round neuroblasts clearly changed their morphology displaying flat and enlarged cytoplasm, increasing their adherence to the flask surface, all of them distinctive features of the S-like type cell phenotype (Fig. 6B). Similar results were observed in N-type (LAN-55 N) and another I-type cell line (SK-N-LP), even though the amount of GD2⁺/S100A6⁺ cells neuroblasts was smaller, as previously documented in Acosta et al. [13].

These results suggest that upon induction of neuronal differentiation, both I- and N-type NB cell lines give rise to GD2⁺/S100A6⁺ cells with S-like phenotype, that could represent a subpopulation of cells committed towards a glial-like phenotype. These changes can be tracked by GD2/S100A6 expression. These findings provide a model of differentiation and acquisition of glial fates in the most undifferentiated NBTs.

4. Discussion

Neural crest cells (NCC) possess the competency to differentiate into many different cell types: sympathetic neurons, Schwannian cells and melanocytes, amongst others [15]. Specifically, it has been described that NCC restrict their multipotential capacity until they reach a bipotential state which will give rise to the last two different cell subtypes, glial and neuronal cells [15,25]. Physiologically, the differentiation status at each stage can be tracked by the pattern of protein expression and the concomitant expression of neuronal and glial proteins has been reported in bipotential precursors of NCC [26].

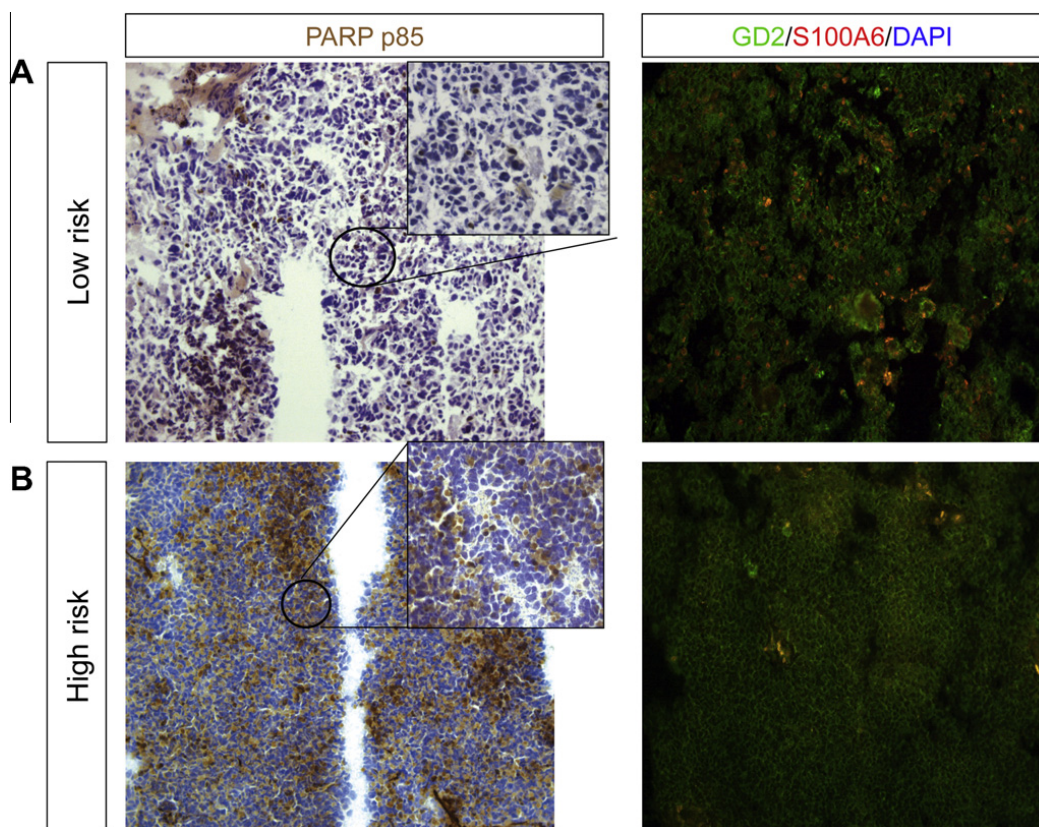


Fig. 3. The GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts are not apoptotic. Left panels show PARP p85 staining in low (A) and high risk (B) tumors respectively. Right panels show GD2/S100A6 staining in serial cryosections of the same tumors. The number and localization of the GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts do not correlate with the staining of the PARP p85 apoptosis marker (10× magnification). Inner squares show a 63× magnification of the delimited area.

Since NB is a tumor of the sympathetic nervous system originating from NCC, the origin from a putative multipotential NCC has been hypothesized [1,2]. *In vitro*, NB cells have shown the capacity to differentiate into different cell lineages; neurons, Schwannian glia and muscle [13,14,27]. Previous work from Ross and Spengler [19], have suggested that a bipotential (glial/neuronal) stage could be tracked in tumors by the concomitant expression of neurofilaments (NF68) and the glial marker S100A6. In our hands, however, the expression of the neurofilament NF68 was not restricted to the neuronal lineage since positive staining was documented in glial tumors like Schwannomas (data not shown). According to our previous screening for lineage-specific markers in neuroblastoma *in vitro*, only the expression of the GD2 ganglioside was restricted to the neuronal-lineage component of the tumor [13].

In this study, we looked for the existence of cells in the bipotential stage of differentiation in primary NBTs by using the coexpression of the lineage-specific markers GD2 and S100A6. Our results demonstrate that most NB contain a neuroblastic subpopulation of cells, ranging from 1% to 25%, co-staining for both markers. Moreover, this subpopulation seems to be widespread in the low risk category of NBTs and increased in specimens after cytotoxic therapy. These results suggest that, although morphologically unrecognized, the GD2⁺/S100A6⁺ neuroblastic subpopulation appears to be in a different state of

differentiation, likely towards glial commitment, which in turn, might explain the relationship with the better prognosis of the low-risk tumors. Our results are in line with recent reports showing that neural progenitor cells are intimately related to the glial lineage, which diverges from the view of the separation of neuronal and glial lineages. Classically, neurons were proposed to derive from neuronal committed progenitors (neuroblasts), whereas spongioblasts (radial glial cells) were thought to be precursors of the astroglial cells. Recent studies, however, have shown that cells considered part of the glial lineage are in fact the neural stem cells that give rise to differentiated neurons and glial cells [28]. The tumoral origin of the different NB subpopulations identified using the co-staining with GD2 and S100A6 was in three NMYC amplified tumors and *in vitro*. Notably, all the subpopulations having diverse GD2 and S100A6 staining features, isolated from the tumors showed the amplification of the NMYC proto-oncogene suggesting that all of them derived from a common tumoral precursor cell. *In vitro*, we observed that neuronal differentiation gave rise to a subpopulation of GD2⁺/S100A6⁺ neuroblasts some of which subsequently acquired a S-like morphology.

There is significant evidence that angiogenesis contributes to the aggressive behavior of NB tumors. In retrospective studies, high vascular density has been correlated with poor clinical outcome [29,30]. Furthermore, high levels of angiogenesis activators have been detected in clinically

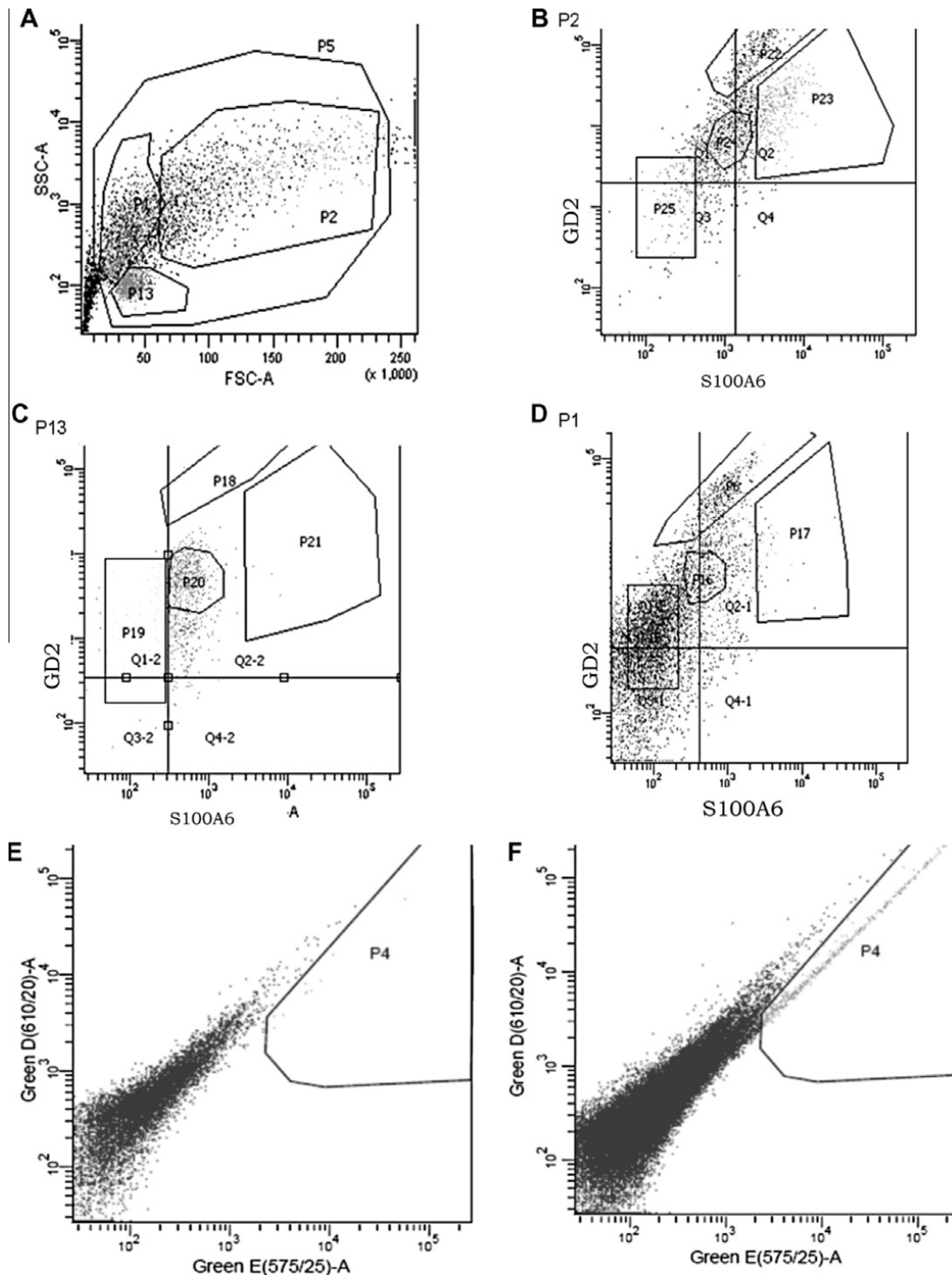


Fig. 4. GD2/S100A6 cell sorting. (A) FSC-SSC graph showing different subpopulations identified by FSC-SSC. (B–D) GD2/S100A6 staining in each subpopulation identified by FSC-SSC. (B) Subpopulation of largest size: p2. (C) Subpopulation of smallest size: p13. (D) Subpopulation of an intermediate size: P1. (E and F) Analysis with CD133 staining: (E) Negative control; (F) CD133 stained subpopulation (p4) representing 0.3% of the totality of cells analyzed.

aggressive NB tumors [31]. Conversely, increased levels of endogenous inhibitors of angiogenesis are present in Schwannian stroma-rich tumors that are associated with favorable outcome [32]. Besides, the presence of Schwann cells has been associated to the secretion of angiogenesis

inhibitors like SPARC [5]. Most recent studies [33] have shown the tumoral origin of approximately 30% of blood vessels in NMYC amplified NB, showing that vascular mimicry is another aberrant tumor-related phenomenon occurring in high-risk NB. We observed GD2⁺/S100A6⁺

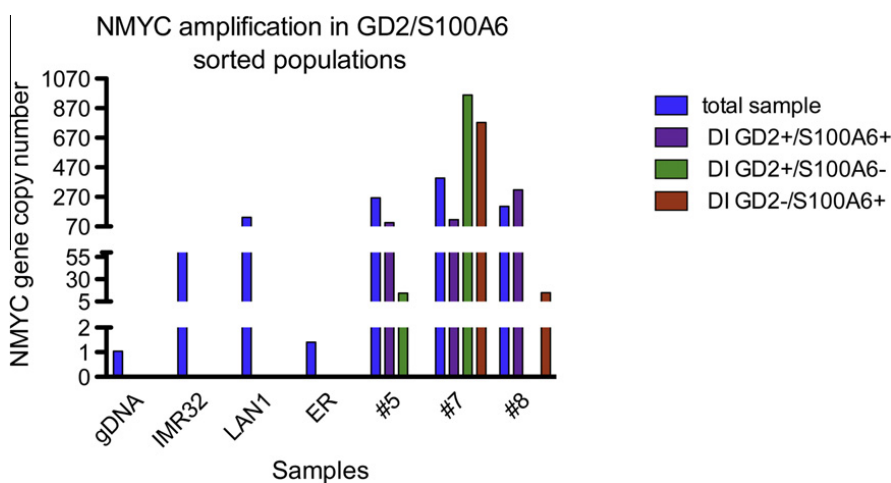


Fig. 5. NMYC amplification in GD2/S100A6 co-stained subpopulations. Chart showing the haploid NMYC content for each of the FACS isolated subpopulation following GD2/S100A6 staining. All samples were normalized with disomic reference genes SDC4 and BCMA (only BCMA normalized is shown) and calibrated to human genomic DNA (gDNA). The NMYC amplified NB cell line IMR32 and LAN1 were used as positive control samples, and normal blood gDNA and the SK-N-ER cell line were used as not amplified NMYC controls. DI: Double Immunostained GD2/S100A6.

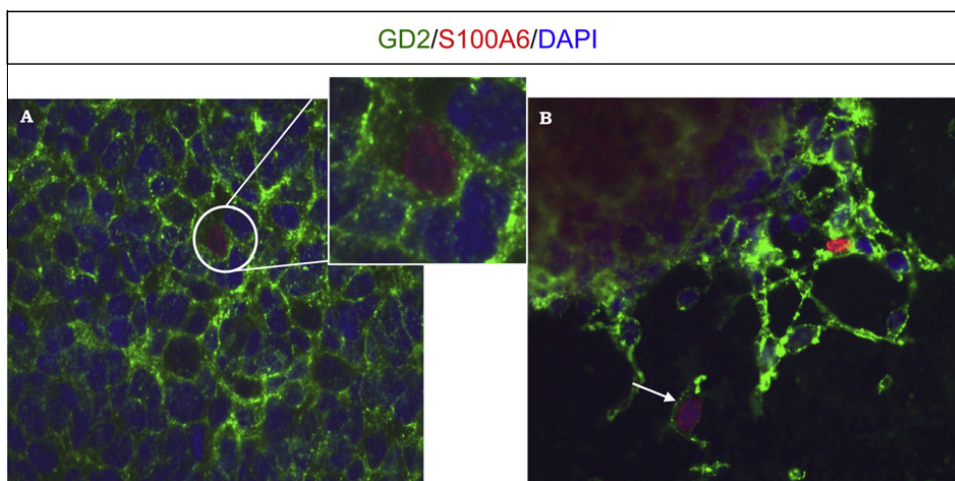


Fig. 6. GD2+/S100A6+ cells in the *in vitro* differentiation. Differentiation induction with ATRA in SK-N-Be2C: panel A. 5 days after drug-induced differentiation few neuroblasts show GD2+/S100A6+ staining. B. 15 days after drug-induced differentiation the GD2+/S100A6+ neuroblasts had changed their morphology to an S-like subtype (arrow). The majority of the tumor cells remain GD2+/S100A6– in both cases. (40× magnification) Inner panel shows a digitalized zoom.

neuroblasts close to the stromal areas, where the blood vessels can be found. Here, the GD2+/S100A6+ neuroblasts were found to be distributed mostly in the cell layers closest to the blood vessels. These results suggest that GD2+/S100A6+ neuroblasts are not distributed randomly, but either arise from or tend to populate the perivascular niche. The implication of the GD2+/S100A6+ neuroblasts in the perivascular niche should be further analyzed.

Altogether, these results suggest the existence of a common tumor precursor cell for all the subpopulations identified using our neuronal and glial-lineage marker and constitute the first set of data recapitulating the differentiation process of the tumoral stroma in NB.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgements

We thank to the Spanish Ministry of Health (RETIC-G03/089 and PI041259), Spanish Society against Cancer (Asociación Española Contra el Cáncer, AECC 2007), the Catalan government (2005SGR00605; 2006FI00404), and the generous donations from Margarita del Pozo and Alicia Pueyo Foundations. We thank also to Service of Flow Citometry of the University of Barcelona.

References

[1] K. De Preter, J. Vandesompele, P. Heimann, N. Yigit, S. Beckman, A. Schramm, A. Eggert, R.L. Stallings, Y. Benoit, M. Renard, A. De Paepe, G. Laureys, S. Pählman, F. Speleman, Human fetal neuroblast and neuroblastoma transcriptome analysis confirms neuroblast origin and highlights neuroblastoma candidate genes, *Genome Biol.* 7 (2006) R84.
 [2] J. Mora, W.L. Gerald, Origin of neuroblastic tumors: clues for future therapeutics, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4 (2004) 293–302.

- [3] H. Shimada, S. Umehara, Y. Monobe, Y. Hachitanda, A. Nakagawa, S. Goto, R.B. Gerbing, D.O. Stram, J.N. Lukens, K.K. Matthay, International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group, *Cancer* 92 (2001) 2451–2461.
- [4] J.M. Maris, M.D. Hogarty, R. Bagatell, S.L. Cohn, Neuroblastoma, *Lancet* 369 (2007) 2106–2120.
- [5] A. Chlenski, S. Liu, S.E. Crawford, O.V. Volpert, G.H. DeVries, A. Evangelista, Q. Yang, H.R. Salwen, R. Farrer, J. Bray, S.L. Cohn, SPARC is a key Schwannian-derived inhibitor controlling neuroblastoma tumor angiogenesis, *Cancer Res.* 62 (2002) 7357–7363.
- [6] J.L. Kwiatkowski, J.L. Rutkowski, D.J. Yamashiro, G.I. Tennekoon, G.M. Brodeur, Schwann cell-conditioned medium promotes neuroblastoma survival and differentiation, *Cancer Res.* 58 (1998) 4602–4606.
- [7] I.M. Ambros, A. Attarbaschi, S. Rumpler, A. Luegmayr, E. Turkof, H. Gadner, P.F. Ambros, Neuroblastoma cells provoke Schwann cell proliferation in vitro, *Med. Pediatr. Oncol.* 36 (2001) 163–168.
- [8] J. Mora, N.K. Cheung, G. Juan, P. Illei, I. Cheung, M. Akram, S. Chi, M. Ladanyi, C. Cordon-Cardo, W.L. Gerald, Schwannian. Neuroblastic, Neuroblastic and Schwannian stromal cells of neuroblastoma are derived from a tumoral progenitor cell, *Cancer Res.* 61 (2001) 6892–6898.
- [9] I.M. Ambros, A. Zellner, B. Roald, G. Amann, R. Ladenstein, D. Printz, H. Gadner, P.F. Ambros, Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma, *N. Engl. J. Med.* 334 (1996) 1505–1511.
- [10] W. Du, N. Hozumi, M. Sakamoto, J. Hata, T. Yamada, Reconstitution of Schwannian stroma in neuroblastomas using human bone marrow stromal cells, *Am. J. Pathol.* 173 (2008) 1153–1164.
- [11] S. Coco, R. Defferrari, P. Scaruffi, A. Cavazzana, C. Di Cristofano, L. Longo, K. Mazzocco, P. Perri, C. Gambini, S. Moretti, S. Bonassi, G.P. Tonini, Genome analysis and gene expression profiling of neuroblastoma and ganglioneuroblastoma reveal differences between neuroblastic and Schwannian stromal cells, *J. Pathol.* 207 (2005) 346–357.
- [12] F. Bourdeaut, A. Ribeiro, R. Paris, G. Pierron, J. Couturier, M. Peuchmaur, O. Delattre, In neuroblastic tumours, Schwann cells do not harbour the genetic alterations of neuroblasts but may nevertheless share the same clonal origin, *Oncogene* 27 (2008) 3066–3071.
- [13] S. Acosta, C. Lavarino, R. Paris, I. Garcia, C. de Torres, E. Rodríguez, H. Beleta, J. Mora, Comprehensive characterization of neuroblastoma cell line subtypes reveals bilineage potential similar to neural crest stem cells, *BMC Dev. Biol.* 9 (2009) 12.
- [14] J.D. Walton, D.R. Kattan, S.K. Thomas, B.A. Spengler, H.F. Guo, J.L. Biedler, N.K. Cheung, R.A. Ross, Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors, *Neoplasia* 6 (2004) 838–845.
- [15] N.M. Le Douarin, S. Creuzet, G. Couly, E. Dupin, Neural crest cell plasticity and its limits, *Development* 131 (2004) 4637–4650.
- [16] J.L. Biedler, L. Helson, B.A. Spengler, Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture, *Cancer Res.* 33 (1973) 2643–2652.
- [17] V. Ciccarone, B.A. Spengler, M.B. Meyers, J.L. Biedler, R.A. Ross, Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages, *Cancer Res.* 49 (1989) 219–225.
- [18] R.A. Ross, B.A. Spengler, C. Domènech, M. Porubcin, W.J. Rettig, J.L. Biedler, Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells, *Cell Growth Differ.* 6 (1995) 449–456.
- [19] R.A. Ross, B.A. Spengler, Human neuroblastoma stem cells, *Semin. Cancer Biol.* 17 (2007) 241–247.
- [20] K. De Preter, F. Speleman, V. Combaret, J. Lunec, G. Laureys, B.H. Eussen, N. Francotte, J. Board, A.D. Pearson, A. De Paepe, N. Van Roy, J. Vandesompele, Quantification of MYCN, DDX1, and NAG gene copy number in neuroblastoma using a real-time quantitative PCR assay, *Mod. Pathol.* 15 (2002) 159.
- [21] C. Calabrese, H. Poppleton, M. Kocak, T.L. Hogg, C. Fuller, B. Hamner, E.Y. Oh, M.W. Gaber, D. Finklestein, M. Allen, A. Frank, I.T. Bayazitov, S.S. Zakharenko, A. Gajjar, A. Davidoff, R.J. Gilbertson, A perivascular niche for brain tumor stem cells, *Cancer Cell.* 11 (2007) 69–82.
- [22] S. Ferrari, E. Tagliafico, R. Manfredini, A. Grande, E. Rossi, P. Zucchini, G. Torelli, U. Torelli, Abundance of the primary transcript and its processed product of growth-related genes in normal and leukemic cells during proliferation and differentiation, *Cancer Res.* 52 (1992) 11–16.
- [23] E. Leclerc, G. Fritz, M. Weibel, C.W. Heizmann, A. Galichet, S100B and S100A6 differentially modulate cell survival by interacting with distinct RAGE (receptor for advanced glycation end products) immunoglobulin domains, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 31317–31331.
- [24] J.H. Joo, S.Y. Yoon, J.H. Kim, S.G. Paik, S.R. Min, J.S. Lim, I.S. Choe, I. Choi, J.W. Kim, S100A6 (calcylin) enhances the sensitivity to apoptosis via the upregulation of caspase-3 activity in Hep3B cells, *J. Cell Biochem.* 103 (2008) 1183–1197.
- [25] S.J. Morrison, P.M. White, C. Zock, D.J. Anderson, Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells, *Cell* 5 (1999) 737–749.
- [26] E. Dráberová, L. Del Valle, J. Gordon, V. Marková, B. Smejkalová, L. Bertrand, J.P. de Chadarevian, D.P. Agamanolis, A. Legido, K. Khalili, P. Dráber, C.D. Katsetos, Class III beta-tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: implications for phenotypic identity, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67 (2008) 341–354.
- [27] S. Pahlman, A.I. Ruusala, L. Abrahamsson, M.E. Mattsson, T. Esscher, Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation, *Cell Differ.* 14 (1984) 135–144.
- [28] A. Kriegstein, A. Alvarez-Buylla, The glial nature of embryonic and adult neural stem cells, *Annu. Rev. Neurosci.* 32 (2009) 149–184.
- [29] E. Drozyska, E. Izycka-Swieszewska, M. Niedzwiecki, A. Balcerska, D. Perek, J. Wachowiak, A correlation of microvascular density and proliferative activity to clinical and histological characteristics in neuroblastoma, *Neoplasma* 53 (2006) 247–252.
- [30] A. Chlenski, S. Liu, S.L. Cohn, The regulation of angiogenesis in neuroblastoma, *Cancer Lett.* 197 (2003) 47–52.
- [31] E. Hatzl, C. Murphy, A. Zoephel, H. Rasmussen, L. Morbidelli, H. Ahorn, K. Kunisada, U. Tontsch, M. Klenk, K. Yamauchi-Takihara, M. Ziche, E.K. Rofstad, L. Schweigerer, T. Fotsis, N-myc oncogene overexpression down-regulates IL-6; evidence that IL-6 inhibits angiogenesis and suppresses neuroblastoma tumor growth, *Oncogene* 21 (2002) 3552–3561.
- [32] S. Liu, Y. Tian, A. Chlenski, Q. Yang, P. Zage, H.R. Salwen, S.E. Crawford, S.L. Cohn, Cross-talk between Schwann cells and neuroblasts influences the biology of neuroblastoma xenografts, *Am. J. Pathol.* 166 (2005) 891–900.
- [33] A. Pezzolo, F. Parodi, M.V. Corrias, R. Cinti, C. Gambini, V. Pistoia, Tumor origin of endothelial cells in human neuroblastoma, *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 376–383.

Anexo 6. Informe de los directores de tesis acreditando la contribución de la doctoranda a los artículos que sustentan la tesis.

La Dra Cinzia Lavarino y el Dr Jaume Mora, como directores de la tesis doctoral de GEMMA MAYOL RICART, titulada: Patrón de expresión de tres genes como marcador de predicción pronóstica en neuroblastoma. Mecanismos de regulación transcripcional y función de los genes seleccionados, hacen constar que la doctoranda ha participado activamente en el diseño y realización experimental de los trabajos de investigación incluidos en esta tesis, en el análisis e interpretación de los datos, en la discusión y obtención de conclusiones y en la preparación de los manuscritos. A continuación se especifica la contribución concreta en cada trabajo.

Artículo 1: **A three-gene expression signature model for risk stratification of patients with neuroblastoma.** *Clinical Cancer Research* 2012; 18:2012. (Factor de impacto: 7.338, Q1)

Idoia Garcia*, **Gemma Mayol***, José Ríos*, Gema Domenech, Nai-Kong V Cheung, André Oberthuer, Matthias Fischer, John M Maris, Garrett M. Brodeur, Barbara Hero, Eva Rodríguez, Mariona Suñol, Patricia Galván, Carmen de Torres, Jaume Mora, Cinzia Lavarino.

*Autores que han contribuido por igual en el estudio.

Contribución de la doctoranda:

La doctoranda ha contribuido en el desarrollo y validación de la versión final del modelo estadístico de predicción de pronóstico presentado en este artículo. Inicialmente, ha participado en la recolección, extracción, cuantificación y control de la calidad del ARN de una parte de las muestras utilizadas para desarrollar y testar la versión preliminar del modelo. Posteriormente ha participado en la definición de la versión definitiva del modelo. Asimismo ha realizado la totalidad de los experimentos dirigidos a la validación del modelo final mediante qRT-PCR utilizando una cohorte independiente de muestras de neuroblastoma (n=120) obtenidas del Departamento de Oncología Pediátrica del Hospital Pediátrico de Colonia (Alemania). Para ello ha realizado una breve estancia en el laboratorio de Oncología Pediátrica del Dr. M. Fischer, del mismo Hospital Pediátrico de Colonia. A continuación, ha participado activamente en la validación del modelo mediante meta-análisis utilizando bases de datos de expresión públicas de *microarrays* (preparación de las bases de datos de expresión, y de datos clínicos y biológicos de los pacientes analizados). Con el fin de determinar el potencial de predicción del modelo desarrollado, ha realizado análisis comparativos con sistemas de clasificación utilizados actualmente en ensayos clínicos internacionales de neuroblastoma. Ha participado en el análisis e interpretación de los resultados, en el análisis de la capacidad de predicción mediante la estimación de la supervivencia de los pacientes con el método de Kaplan-Meier (SPSS versión 15.0, Inc, Chicago, IL). Finalmente, ha participado activamente en la preparación del manuscrito final.

Artículo 2: **Expression of the neuron- specific protein marker CHD5 is an independent marker of outcome in neuroblastoma.** *Molecular Cancer* 2010; 9:277. (Factor de impacto: 4.160, Q1).

Idoia Garcia, **Gemma Mayol**, Eva Rodríguez, Mariona Suñol, Timothy R Gershon, Jose Ríos, Nai-Kong V Cheung, Mark W Kieran, Rani E George, Antonio R Pérez-Atayde, Carla Casala, Patricia Galván, Carmen de Torres, Jaume Mora, Cinzia Lavarino.

Contribución de la doctoranda:

La doctoranda ha estado involucrada en una parte importante del trabajo experimental descrito en este artículo. En concreto, ha participado en la recolección de las muestras, extracción de ADN y ARN, cuantificación de los niveles de expresión génica (qRT-PCR) y proteica (Western-blot). También ha realizado experimentos aplicando técnicas de cultivo celular utilizando líneas celulares de neuroblastoma (tratamientos para la inducción de diferenciación celular, determinación índice de proliferación, y viabilidad celular). Ha inducido la formación de tumores neuroblasticos en ratones inmunodeprimidos mediante inoculación de líneas celulares de neuroblastoma con el fin de generar tejido tumoral que ha sido utilizado, en este caso, para la puesta a punto de diversos anticuerpos y ensayos moleculares. Ha participado activamente en el diseño de los experimentos, la interpretación de los resultados y la escritura del manuscrito.

Artículo 3: **DNA hypomethylation affects cancer-related biological functions and genes relevant in neuroblastoma pathogenesis.** *PLoS ONE* 2012; e48401. (Factor de impacto: 4.092, Q1).

Gemma Mayol, José I. Martín-Subero, José Ríos, Ana Queiros, Marta Kulis, Mariona Suñol, Manel Esteller, Soledad Gómez, Idoia García, Carmen de Torres, Eva Rodríguez, Patricia Galván, Jaume Mora y Cinzia Lavarino.

Contribución de la doctoranda:

La doctoranda ha realizado la mayoría del trabajo experimental desarrollado para este artículo. La labor realizada incluye la recolección de las muestras, extracción, cuantificación y control de calidad del ADN, y preparación de las muestras para el análisis del patrón de metilación global del ADN mediante *arrays* (Illumina Infinium Human Methylation-27 BeadChip). Ha realizado el análisis de los datos generados por el *microarray* mediante programas bioinformáticos específicos (BeadStudio software, versión 3, Illumina Inc, USA). Ha puesto a punto el método de análisis para la identificación de un patrón de metilación específico en neuroblastomas y subgrupos de tumores neuroblasticos clínico y biológicamente relevantes. Ha participado activamente en la validación de estado del estado metilación de genes específicos mediante pirosecuenciación (preparación de las muestras, diseño de los primers, conversión del ADN metilado con bisulfito de sodio, interpretación datos). Ha realizado un estudio comparativo del estado de metilación y expresión génica diferencial con el fin de determinar el impacto de las alteraciones epigenéticas en el perfil transcripcional de estos tumores. Ha procedido con la validación de los datos de interés mediante qRT-PCR. Ha realizado la caracterización biológica de las listas de genes halladas diferencialmente metiladas (localización cromosómica, análisis de la densidad de dinucleotidos CG en regiones promotoras, identificación de genes diana de los complejos represivos de la familia de *Polycomb*). Finalmente, ha participado activamente en la preparación del manuscrito final.

Artículos publicados donde también ha participado la doctoranda:

Identification of tumoral glial precursor cells in neuroblastoma.

Acosta S, **Mayol G**, Rodríguez E, Lavarino C, de Preter K, García I, de Torres C, Mora J. *Cancer Lett.* 2011;312(1):73-81 (IF: 4.86)

Por todo ello, certificamos la contribución y responsabilidad de la doctoranda en cada uno de los trabajos presentados, como queda reflejado en su autoría.

Atentamente,

Dra. Cinzia Lavarino
Developmental Tumor Biology Laboratory
Department of Oncology
Hospital Sant Joan de Déu
Passeig Sant Joan de Déu, 2
08950 Esplugues de Llobregat.
Barcelona. SPAIN.
Tel: (34) 93 280 40 00 (office) x2823
E-mail: clavarino@fsjd.org

Dr. Jaume Mora
Head Department of Oncology
Hospital Sant Joan de Deu de Barcelona
Passeig de Sant Joan de Deu num 2
08950. Esplugues del Llobregat
Barcelona. SPAIN.
Tel: (34) 93 280 40 00 (office) x2361 (lab) x4398
Fax: (34) 93 600 6119
E-mail: Jmora@hsjdbcn.org

Agradecimientos

Les paraules no són el meu fort i menys quan es tracta de donar les gràcies. Si ja tenim una paraula que descriu aquest sentiment d'agraïment...per que en calen més? Per una vegada me'n calen més per que no només vull aprofitar aquest espai per donar-vos les gràcies a la vostra contribució per tal que aquest treball sigui una realitat, sinó que vull que sigui un petit espai de reconeixement.

A la Cinzia, qui sense pensar-ho em va oferir formar part del seu petit equip. Formar parte de tu equipo a sido lo más valioso de todo este tiempo, más que la misma tesis. De tu mano he aprendido a querer este trabajo, con lo bueno y lo menos bueno que conlleva. A buscar entre números y a no desfallecer hasta entender y dar sentido a los resultados. A aprender de los errores sin miedo. A no resignarse. A auto-exigirse pero a la vez creer en uno mismo. Pero sobretodo, gracias por tu calidad humana, por estar siempre allí. Seguramente mi crecimiento como “investigadora” no hubiera sido el que es sin ti.

A en Jaume, per fer-nos tocar de peus a terra i ensenyar-nos cada dia que la recerca té sentit. Que tantes hores, tants experiments fallits, tants articles que s'acumulen per llegir... tenen sentit quan un pacient somriu.

A la Carmen, per fer-me valorar la constància i la feina de formigueta, aquella que no es veu però que al final té resultat.

A la Idoia, qui va ser la meva mestra de “poyata”. Por tantos y tantos momentos compartidos. Eskerrik asko zenekien gutzia erakusteagatik. Ez dakit zer gertatu zen, agian gaizki ulertu bat gertatu zen, ez batak eta ez besteak ulertu ez genuena, eta konpontzeko gai izan ez ginena. Hala ere, zuri buruzko oroitzapen bikaina izango dut beti.

Al José. Al José... perquè? Per fer-me entendre una miqueta millor l'estadística... i es que ja saps que d'on no n'hi ha, no en raja! Però has aconseguit que parli amb termes estadístics amb propietat i sabent de que parlo! Que ho sàpiga tothom: és un estadístic que parla un llenguatge comprensible per a la resta de mortals! Però també per fer-me posar vermella tantes i tantes vegades, per que amb tu he après que queixar-se no serveix de gaire, que és més útil respirar fons i... intentar posar-hi remei.

A l'Iñaki. Entraste en nuestro proyecto por azar o tal vez por imposición, y aún así creíste en él des de el primer momento. No solo me dedicaste horas para enseñarme a jugar con los datos y a manejar el Excel de miles de filas con soltura y colores sino que en cada minuto compartido ganaba conocimiento en el fenómeno de la metilación. Sin quererlo te convertiste en un mentor más en mi camino profesional. ¡Muchísimas gracias!

A la Sole, la nueva compi! Llegaste en un momento especial para mí... y des de entonces has aprendido con una velocidad! Uff... ¡ya no sé quién enseña a quien! Gracias por las sonrisas, el chocolate, el “micu-micu”, por las charlas filosóficas de ciencia, de la vida, del respeto, los miRNAs, las qRT-PCRs... Ya sabes que espero que tu carrera investigadora sea un exitazo! Y tenemos pendiente una visita a esa isla que te tiene el corazón robado... aunque te tocará hacer de “tietia”.

A l'Eva, per trobar sempre un moment per fer una criosecció, per buscar un vial, per pintar unes cèl·lules. I com no per fer les fotos més boniques! Però sobretot per deixar-me “amagar” sempre que ho he necessitat al “zulo” d'AP.

A la Laia, fins hi tot des de la distancia a procura't per aquesta tesi. Gràcies!

A tots els que han estat els meus companys de lab, des de la Sandra i l'Helena quan vaig arribar, passant per la Solange, la Carla i la Patri, als que heu arribat darrers; l'Àngel, la Nerea, els Carlos/es, l'Estel i l'Glòria. De tots/es he après alguna cosa.

A les noies de la tercera: la Thais, la Judith, la Dèbora, la Sonia, la Cecilia i en Josep; a l'equip de Salut Mental: la Raquel, la Nuria i la Belen; a l'equip de genètica: en Jordi, la Montse, la Loreto, la Judith i l'Edgar; i a l'equip d'endocrí: especialment a la Marta i en David. Per haver compartit amb mi la vostra experiència, els vostres coneixements així com els vostres protocols. Gràcies per deixar-me sempre la porta oberta per parlar de ciència.

A tot l'equip mèdic “de l'altre costat”: oncòlegs, patòlegs, cirurgians, neurocirurgians, fisios, radiòlegs... Especialment a l'Ofelia, l'Andreu i l'Héctor, que treballeu en el dia a dia dels nostres petits pacients. Estar al vostre costat es fantàstic, aprendre de vosaltres es tot un privilegi. Gracies per la vostra qualitat humana i professional.

A la Mariona, per que mai has tingut un no per resposta. Gracies per dedicar-me sempre uns minuts a mirar pel microscopi i valorar un teixit, per ensenyar-me a reconèixer les cèl·lules petites i blaves.

A la Glòria, la Mercè i l'Oriol, la vostra tasca ens permet gaudir de la nostra passió: la ciència. Gracies per recolzar els nostres projectes, però sobretot per fer que tinguin nom i cognoms.

A totes les noies de la Fundació, sempre m'heu tractat amb un somriure i m'heu proveït de tot allò que he necessitat.

Als informàtics: en Jordi i en Juanma, per les solucions immediates; als Carlos d'audiovisuals per les figures i els pòsters exprés; a l'Àngel i al Mikel, pels cafès amb somriure; tots feu que sigui més fàcil treballar.

A la meva família, pares i germans, per que sóc com sóc per culpa vostra.

Gracies pares per voler que la meva única herència fos l'educació que rebia, ha estat veritablement un tresor.

Als "nens" (en Litus, l'Annuska i el Peque) i la Laura, ...no us puc dir gaire més, tal vegada amb tres paraules ni haurà prou: "xurruasca`t", "adenovirus" i "cul-lunuts". Menció especial per l'Anna, que ha donat forma a tots els textos per fer-los editables.

A la meva segona família: la de Taradell. A en Xevi i la Maria, per obrir-me els braços com una filla més. A la Dolça, la Pau, en David i l'Oriol, per deixar que el seu germà cada dia parli una miqueta més "xava". A tots gracies per fer-me sentir una més de la família! I a l'Amèlia... per que és la millor neboda que podia tenir!

A "Les Gordes" i a la "Societat Gastronòmica Joan de Canyamars". Per tantes "menjades" acompanyades de tertúlies, de somriures, d'anècdotes, d'excursions, de política, per les nits de futbol,... per que sempre heu preguntat i heu mostrat interès pel meu projecte de recerca malgrat poséssiu cares rares cada vegada que en parlava. No deixeu mai de ser com sou! (ni de ser on sou!).

I finalment, a tu Arnau.

Saps com em costa dir les coses... i si arribo aquí es que me n'he sortit prou bé. Aquesta tesi a estat i és tan meva com teva. Des del primer dia vas decidir compartir-la amb mi, com tantes i tantes altres coses. L'has odiat i estimat tant o més que jo, gracies per ajudar-me a arribar fins aquí amb un somriure.

Gracies per ser la meva llum i el meu camí, la fi del meu destí.

I a en Pere, que encara no ha arribat, però que també a la seva manera ha contribuït a ajudar-me a tancar aquesta carpeta dolçament.