

Estudio de expresión de marcadores de células madre neurales en neuroblastoma y correlación con factores pronóstico

Y. Martínez-Criado¹, R. Cabello¹, I. Fernández-Pineda¹, C. Márquez², G. Ramírez², E. Rivas³, M.J. Robles³, R. Pardal⁴, F.M. Vega⁴

¹Servicio de Cirugía Pediátrica, ²Servicio de Oncología Pediátrica. Hospital Infantil Virgen del Rocío. Sevilla. ³Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla. ⁴Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Hospital Universitario Virgen del Rocío/ CSIC/ Universidad de Sevilla. Dpto. de Fisiología Médica y Biofísica. Sevilla.

RESUMEN

Introducción. En el neuroblastoma (NB), la existencia de células madre cancerosas (CMC) se ha relacionado con la presencia de metástasis, resistencia al tratamiento quimioterápico y recidiva. Nuestro objetivo es analizar la expresión de marcadores relacionados con proliferación y diferenciación de células progenitoras neurales en muestras de NB, y correlacionarlo con parámetros clínicos, histología, genética y respuesta al tratamiento.

Material y métodos. Realizamos un estudio experimental retrospectivo con muestras de neuroblastoma obtenidas mediante biopsia o exéresis tumoral entre 2010 y 2012 en nuestro hospital. Mediante inmunohistoquímica de fluorescencia analizamos la expresión de los marcadores: CD44, CD74, CD133, tirosina hidroxilasa, receptor de endotelina A (REA) y endotelina B (REB), p75, nestina y Phox2b, todos relacionados con la biología de células madre neurales. Posteriormente, relacionamos los niveles de expresión con variables clínicas.

Resultados. La expresión de nestina fue positiva en el 72,2% de las muestras y el REA en el 66,7%. Phox2b y CD74 fueron de menor expresión, siendo positiva en menos del 30%. Los marcadores CD44, REB y Phox2b se expresaban en tumores más agresivos. La expresión de REA se correlacionó de forma significativa con tumores de histología desfavorable ($p=0,01$), amplificación del N-myc ($p=0,05$) y recidiva/progresión ($p=0,05$).

Conclusión. La expresión de CD44, REB y REA se asoció con tumores más agresivos y factores de mal pronóstico. Estos marcadores están presentes en la membrana de células madre neurales, pudiendo ser útiles para identificar y aislar por citometría de flujo las CMCs del NB y para el estudio de nuevas dianas terapéuticas.

PALABRAS CLAVE: Neuroblastoma; Células madre cancerosas neurales; Factores pronóstico.

STUDY OF THE EXPRESSION OF NEURAL STEM CELL MARKERS IN NEUROBLASTOMA TUMOR SAMPLES AND CORRELATION WITH PROGNOSTIC FACTORS

ABSTRACT

Introduction. The existence of cancer stem cells (CSC) in neuroblastoma (NB) has been associated with the development of metastasis, resistance to chemotherapy and recurrence. Our objective is to analyze the expression of proliferation and differentiation markers of neural progenitor cells in NB samples, and to correlate this expression with clinical variables such as histology, genetics and response to conventional therapy.

Material and methods. We performed a retrospective-experimental study with neuroblastoma samples obtained from biopsies or tumor resections between 2010-2012 in our Hospital. Fluorescence immunohistochemistry was used to analyze the expression of the different markers: CD44, CD74, CD133, tyrosine hydroxylase, endothelin receptors type A (ETA) and B (ETB), p75, nestina and Phox2b, all of them related to neural stem cell biology. The level of expression of the markers was then correlated with clinical variables.

Results. Nestin expression was positive in 72.2% of samples and ETA in 66.7%. PHOX2B and CD74 expression were lower, being positive in less than 30%. The markers CD44, ETB and PHOX2B were expressed in more aggressive tumors. ETA expression correlated significantly with unfavorable histology tumors ($p=0.01$), N-myc amplification ($p=0.05$) and recurrence/progression ($p=0.05$).

Conclusion. The expression of CD44, ETB and ETA was associated with more aggressive tumors and poor prognostic factors. These markers are in the membrane of neural stem cells and may be useful to identify and isolate by flow cytometry CSCs of NB for the study of new therapeutic targets.

KEY WORDS: Neuroblastoma; Neural cancer stem cells; Prognostic factors.

Correspondencia: Dra. Yolanda Martínez Criado. Servicio de Cirugía Pediátrica. Hospital Infantil Virgen del Rocío. Avda. Manuel Siurot, s/n. 41013 Sevilla.
E-mail: yoli84mc@hotmail.com

Recibido: Mayo 2013

Aceptado: Noviembre 2013

INTRODUCCIÓN

El neuroblastoma (NB) constituye el tumor sólido extracraneal más frecuente en niños, representando hasta un 8-10% de las neoplasias malignas pediátricas. Este tumor de-

riva de células progenitoras de la cresta neural, originándose con más frecuencia en la glándula suprarrenal o en cualquier ganglio simpático^(1,2). El NB es más frecuente en lactantes y preescolares, con una edad de diagnóstico media de 22 meses⁽³⁾. La histología desfavorable con un alto índice de mitosis cariorrexis (IMK), la amplificación del proto-oncogen n-myc, las metástasis al diagnóstico y la edad superior a los 18 meses⁽⁴⁾ se consideran los principales factores con pronóstico desfavorable.

La agresividad biológica del NB, su resistencia al tratamiento oncológico convencional y la ocurrencia de maduración espontánea hacia formas más benignas lo hace un reto para los investigadores^(5,6). A pesar de los avances en el tratamiento de diversos tumores pediátricos, los NB representan el 15% de la mortalidad por tumores infantiles⁽¹⁾.

Estos tumores parecen depender de la presencia de células progenitoras transformadas, también llamadas células madre cancerosas (CMCs). La biología de estas células, incluyendo su comportamiento proliferativo y de diferenciación, parece determinar la evolución del tumor, su resistencia al tratamiento y la aparición de recidivas⁽⁷⁾. Existe gran interés por conocer mejor las características de las CMCs y la expresión de marcadores específicos que permitan identificarlas, para facilitar el diagnóstico, el tratamiento y el pronóstico en los pacientes con NB.

Nuestro objetivo es encontrar marcadores que nos ayuden a identificar a las CMCs de NBs pediátricos y comprobar si estos marcadores de CMCs se correlacionan con la clínica de la enfermedad, lo que confirmaría el papel principal de estas células en el desarrollo de los tumores. Para ello, analizaremos la expresión de varios de estos marcadores mediante inmunohistoquímica (IHQ) en muestras de NBs. Seguidamente, estableceremos una correlación entre el grado de expresión de los marcadores y otros factores pronóstico: clínicos, histológicos, genéticos y de respuesta al tratamiento quimioterápico convencional. El objetivo final es estudiar la importancia de la existencia de estas CMCs en las muestras de NB a la hora de determinar el comportamiento clínico del tumor.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos realizado un estudio experimental con el objetivo de analizar la expresión de marcadores de células madre neurales en muestras de NB. Retrospectivamente, correlacionamos la expresión con aspectos demográficos, clínicos, histopatológicos y genéticos.

Para ello, seleccionamos muestras histológicas remitidas al Servicio de Anatomía Patológica de pacientes intervenidos de NB entre 2010 y 2012 en nuestro centro. Las muestras se obtuvieron mediante biopsia pretratamiento o durante la exéresis tumoral tras el tratamiento quimioterápico. Se incluyeron las piezas en parafina y se almacenaron en el banco de tumores tras el estudio histológico y genético. Posteriormente, se procedió a la selección de un área tumoral representativa de cada

muestra por un anatomopatólogo especializado, de donde se sacó un cilindro de tejido que se utilizó para la obtención de portas con matrices de tejidos (TA, del inglés 'tissue arrays'), siguiendo el siguiente protocolo.

Se elaboraron dos TAs que contenían muestras por duplicado: el primero para la puesta a punto del protocolo de IHQ (TA de prueba) y el segundo con las muestras de todos los NBs seleccionados (TA definitivo). El TA de prueba contenía muestras control de amígdala, tumor renal, un NB indiferenciado y un NB diferenciado. El TA definitivo contenía 18 muestras de NB correspondientes a 15 pacientes y como control cuatro muestras de cerebelo, cerebro, glomus carotídeo y glándula suprarrenal.

Los marcadores seleccionados para analizar su expresión fueron: CD 44, CD 74, CD 133, DDC, TH, receptor de endotelina tipo A (REA), receptor de endotelina tipo B (REB), ALK, p75, SOX10, nestina y Phox2b. Se seleccionaron anticuerpos primarios producidos en ratón o en conejo. Para detectar la señal de los anticuerpos 'anti-mouse', usamos un secundario con un fluorocromo verde, y para los anticuerpos 'anti-rabbit' uno que emite en rojo. Los núcleos se tiñeron con DAPI, detectado con un filtro azul. La tinción nuclear sirve para corroborar la adecuada localización de cada marcador (de membrana, intracitoplásmico o nuclear). La doble IHQ permite detectar si el marcaje es positivo o si ambos marcadores dan una señal inespecífica coincidente, lo cual sería indicativo de inespecificidad. Por ejemplo, los eritrocitos y ciertas fibras suelen ser positivos para la mayoría de los marcadores de manera inespecífica, considerándose expresión negativa.

El protocolo IHQ empleado lo detallamos en la Tabla I.

Con un microscopio de epifluorescencia Olympus® se determinó el funcionamiento del anticuerpo en nuestras condiciones y se analizó semicuantitativamente el nivel de fluorescencia emitido (negativo= 0, bajo= 1, positivo= 2, muy positivo= 3). El objetivo utilizado fue de 20x, tomándose dos fotografías de distintas áreas por muestra.

Una vez obtenidos los datos de expresión, realizamos un estudio retrospectivo a partir de las historias clínicas hospitalarias para correlacionar la expresión de nuestros marcadores con las variables clínicas, histológica y genéticas.

Las variables clínicas son:

- Edad de presentación (menor o mayor de 18 meses).
- Localización (abdominal, torácico u otras).
- Estadio, siguiendo la clasificación del INSS (1, 2, 3 y 4).
- Metástasis al diagnóstico e infiltración de médula ósea (MO + o –).
- Respuesta al tratamiento quimioterápico (regresión, recidiva/progresión).
- Mortalidad.

Las variables histológicas analizadas son:

- Grado de diferenciación (indiferenciado, pobremente diferenciado, en diferenciación y maduro).
- Índice de mitosis cariorrexis (IMK alto o bajo).
- Porcentaje de necrosis tumoral (alto o bajo).
- Presencia o ausencia de calcificaciones.

Tabla I. Protocolo de inmunohistoquímica con fluorescencia

1. Desparafinación
2. Lavar con PBS (6 veces)
3. Rescate de antígeno: calentar a 96° con solución de citrato 20 min
Inmunofluorescencia
4. Bloquear con PBS+1% BSA, 2 horas
5. Lavar con PBS (6 veces)
6. Incubación con Ac 1° a 4°C toda la noche en solución de bloqueo
7. Lavar Ac 1° con PBS (4 x10 min)
(En oscuridad desde aquí)
8. Incubación de 1 hora con Ac 2° a 1:400 en solución de bloqueo
9. Lavar Ac 2° con PBS en oscuridad (6 x 5 min)
10. Tinción nuclear con DAPI durante 10 min (1:1.000)
11. Montaje con cubreobjetos con medio de montaje
12. Dejar secar
13. Visualización al microscopio
*Doble Inmunofluorescencia:
6'. Incubación con los dos Ac 1° a 4°C durante toda la noche en solución de bloqueo
8'. Incubación de 1 hora con ambos Ac 2° a 1:400 cada uno, en solución de bloqueo
Solución de citrato: 10 mM, pH= 6: ácido cítrico 10 mM + Citrato sódico 10 mM, en 100 ml de agua destilada
Solución de bloqueo: PBS + 1% BSA (100 ml de PBS + 1g de BSA)

- Márgenes (afectación focal, ganglionar o de estructuras adyacentes).
- Histología (favorable, desfavorable).
Las variables genéticas recogidas son:
- Amplificación del proto-oncogen n-myc.
- Delección del 1p36.

Para llevar a cabo el análisis estadístico se usó el programa SPSS 20, y para establecer las correlaciones se aplicó el test exacto de Fisher para las variables cualitativas. Se consideró significativamente estadístico una $p < 0,05$, aunque como partimos de un tamaño muestral reducido, la obtención de significación es difícil, por lo que comentaremos también aquellos parámetros que con un mayor número de muestras podrían llegar a serlo.

RESULTADOS

Seleccionamos 18 muestras de NB de pacientes intervenidos en 2011 y 2012 en el Hospital Virgen del Rocío. El 77,8% de las muestras de NB correspondían a tumores abdominales, siendo la localización más habitual retroperitoneales, y en concreto dependientes de la glándula suprarrenal. El 22,2% restante correspondía a NB de mediastino posterior. En 10

casos las muestras fueron obtenidas mediante exéresis tumoral tras tratamiento quimioterápico según el protocolo de la SIOP, siendo las 8 restantes obtenidas por biopsia previa al tratamiento de quimioterapia (QT).

El estadio tumoral fue de grado 4 en el 61,1%, grado 1 en el 22,2% y grado 2 en el 10,7% de los casos. Tras el tratamiento completo del NB en el 33,3% de los casos presentó progresión y/o recidiva tumoral. La edad mediana de los pacientes de las muestras fue de 24 meses, con un rango de 10,75 meses (percentil 25) a 60 meses (percentil 75).

En el estudio histológico se analizó el grado de diferenciación de las muestras, siendo 2 indiferenciadas, 6 pobremente diferenciadas, 8 en diferenciación y 2 diferenciadas. El 50% presentó algún grado de necrosis tumoral y un 77,8% de las muestras tenía calcificaciones. La histología fue favorable en 8 muestras y desfavorable en las 10 restantes. Respecto al IMK, resultó ser bajo en el 66,7%, intermedio en el 5,6% y alto en el 27,8% de las muestras.

En cuanto a los factores genéticos, la amplificación del gen n-myc estaba presente en el 33,3% de las muestras, y la delección del fragmento cromosómico 1p36 en el 33,3%, siendo ambas alteraciones de mal pronóstico, pero no siempre asociadas en una misma muestra.

Durante la primera parte de nuestro trabajo experimental se realizó la puesta a punto de nuestro protocolo. En la segunda parte se analizó la expresión de los marcadores en los TA definitivos. Los anticuerpos que finalmente se utilizaron fueron: CD133, REB, CD44, TH, CD74, REA, Nestina y Phox2b. En la figura 1 se exponen las 18 muestras de NB del TA definitivo teñidas con hematoxilina-eosina, lo que nos permite observar la estructura histológica de las mismas.

Se llevó a cabo un análisis de la expresión de los marcadores indicados. Los resultados de expresión para cada muestra se encuentran representados en el figura 2.

El anticuerpo para CD133 y el anticuerpo para TH no dieron señal positiva ni en las muestras de NB ni en los controles, lo cual creemos que es debido a un inadecuado funcionamiento de los mismos con nuestro protocolo.

En la correlación de la expresión del resto de marcadores con las diferentes variables clínicas analizadas, nos encontramos con la limitación del número pequeño de muestras ($n = 18$), lo que hizo que la mayoría de los resultados no fueran estadísticamente significativos. En la tabla II, mostramos los resultados obtenidos de esta correlación.

En la correlación de la expresión con la variable edad no obtuvimos ningún resultado significativo.

La expresión de marcadores y su correlación con las variables clínicas, histológicas y genéticas se resumen a continuación. Hemos observado que la histología desfavorable se correlaciona con la expresión de algunos marcadores, tal y como observamos en la figura 3.

El REB tenía una expresión positiva y muy positiva en el 38,9% de las muestras (7 casos), y asociándose a delección del 1p36 en el 85,7% de esos casos positivos ($p = 0,316$). Además, la expresión de REB parecía correlacionar con afectación de

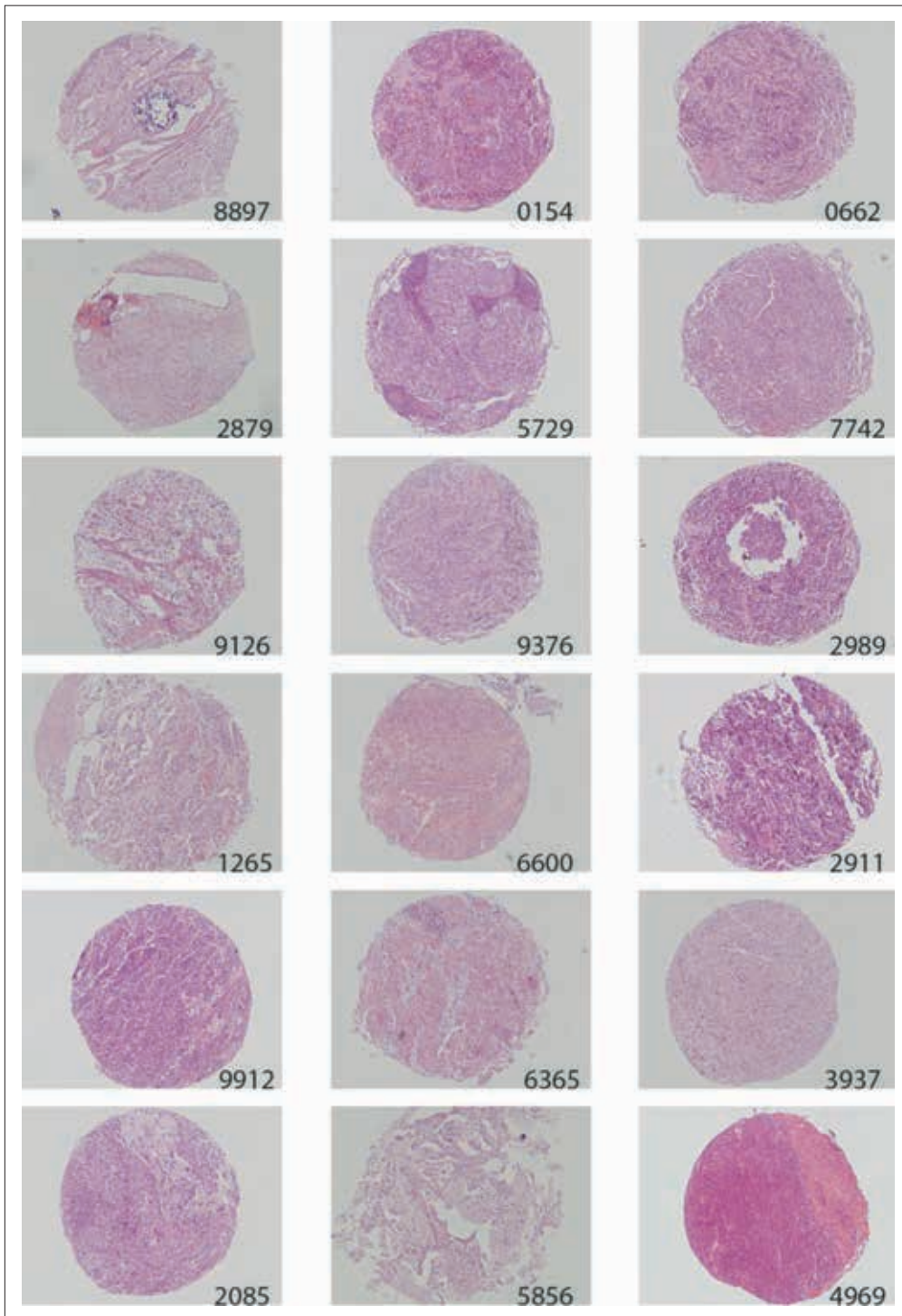


Figura 1. Muestras de NBs del TA definitivo teñidas con hematoxilina-eosina. Se indica el número de biopsia.

márgenes en el 71,4% ($p=0,146$) de los casos y con presencia de metástasis en el 71,4%.

La proteína de adhesión CD44 tuvo una expresión positiva o muy positiva en el 33,3% de muestras (6 casos), siendo todas ellas pertenecientes a NB abdominales ($p=0,21$). En cuanto al grado de diferenciación, un 50% de los que expresan este marcador eran tumores pobremente diferenciados y un 16,7% indiferenciados,

siendo de histología desfavorable el 66,7% ($p=0,321$) de los mismos. El 83,7% de los NB CD44 positivos pertenecían a un estadio IV con metástasis al diagnóstico ($p=0,31$). Sin embargo, en los casos en los que el paciente había fallecido (2 casos) ninguno presentaba este marcador. A su vez, cuando la expresión de CD44 fue negativa, el 75% no tenía amplificación de n-myc ($p=0,344$), y el 58,6% tampoco delección del 1p36 ($p=0,6$).

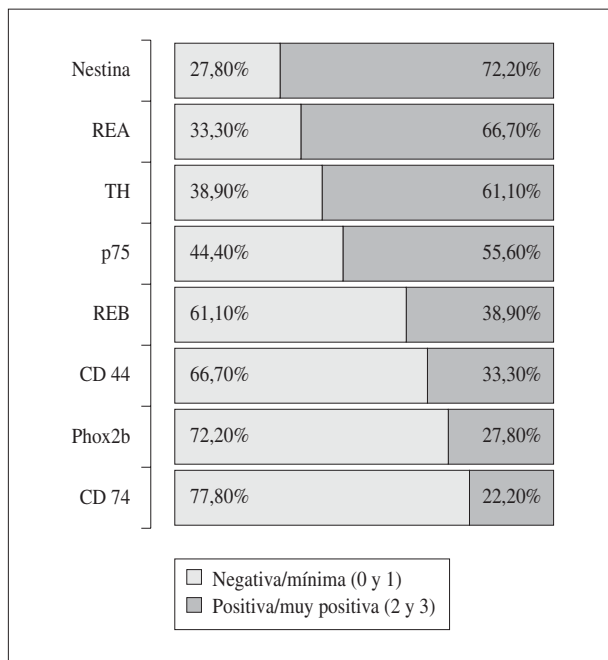


Figura 2. Nivel de expresión de los marcadores de diferenciación seleccionados.

La expresión de CD74 fue positiva o muy positiva en el 22,2% de las muestras (4 casos), siendo todas pertenecientes a tumores abdominales. Además, la histología de las mismas fue desfavorable en el 75% de los casos ($p=0,275$), las cuales presentaron recidiva y progresión de la enfermedad ($p=0,083$).

La expresión de REA fue positiva o muy positiva en el 66,7% (12 casos) de las muestras. En 6 muestras fue negativa, siendo todas ellas muestras con histología favorable ($p=0,013$) y un IMK bajo ($p=0,054$), con n-myc no amplificado ($p=0,054$), y en el 83,3% de ellas (5 casos) con ausencia de delección del 1p36. Además, la ausencia de expresión se asoció en todos los casos con ausencia de progresión y recidiva, no generando mortalidad. De las muestras positivas para REA, solo el 33,3% (2 casos) presentaba un estadio avanzado con metástasis al diagnóstico ($p=0,141$). Este marcador fue el único que presentó una correlación positiva estadísticamente significativa con indicadores de pronóstico desfavorable.

El factor Phox2b se detectó débilmente positivo en el 27,8% de las muestras (5 casos), siendo el 80% de las mismas con histología desfavorable ($p=0,118$).

El marcador de diferenciación TH fue negativo en el 38,9% (7 casos), de las cuales el 85,7% presentaba una histología favorable ($p=0,066$) y todas ellas un IMK bajo. Solo el 14,3% de estas presentaba amplificación del n-myc ($p=0,316$).

La proteína p75 se expresaba en el 55,6% de las muestras (10 casos), siendo el 90% también de localización abdominal ($p=0,275$).

DISCUSIÓN

El NB es el tumor sólido extracranial más frecuente en niños y su tratamiento sigue siendo un reto para los oncólogos pediátricos, existiendo una necesidad imperiosa de disponer de nuevos tratamientos más efectivos^(7,8). En la actualidad, no

Tabla II. Correlación de cada marcador con variables pronóstico, seleccionando aquellas con una p menor o igual a 0,4.

Marca	Localización	Pobre diferenciación	Necrosis presente	Calcificaciones presentes	Histología desfavorable	Márgenes afectos	IMK alto	n-myc amplificado	Delección 1P36	Metástasis o estadio IV	Recidiva/Progresión	Mortalidad
REB	NS	NS	NS	NS	NS	0,145	NS	NS	0,316	NS	NS	0,137
CD 44	0,245	NS	NS	NS	0,321	<u>0,321</u>	NS	0,34	NS	0,316	0,34	0,09
CD 74	0,524	NS	NS	NS	0,275	NS	NS	NS	NS	NS	0,083	0,4
REA	0,569	NS	NS	NS	0,01	NS	NS	0,05	NS	0,14	0,05	0,529
Nestina	NS	NS	NS	<u>0,278</u>	NS	NS	NS	NS	<u>0,268</u>	NS	NS	NS
Phox2b	NS	NS	NS	NS	0,118	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TH	NS	NS	NS	NS	0,066	NS	NS	0,316	NS	0,33	0,316	NS
p75	0,27	NS	NS	NS	NS	<u>0,18</u>	NS	NS	NS	NS	NS	NS

En negrita destacamos las que tiene significación estadística. En gris oscuro se representa correlación positiva, y subrayadas las correlaciones negativas. NS= no significativo

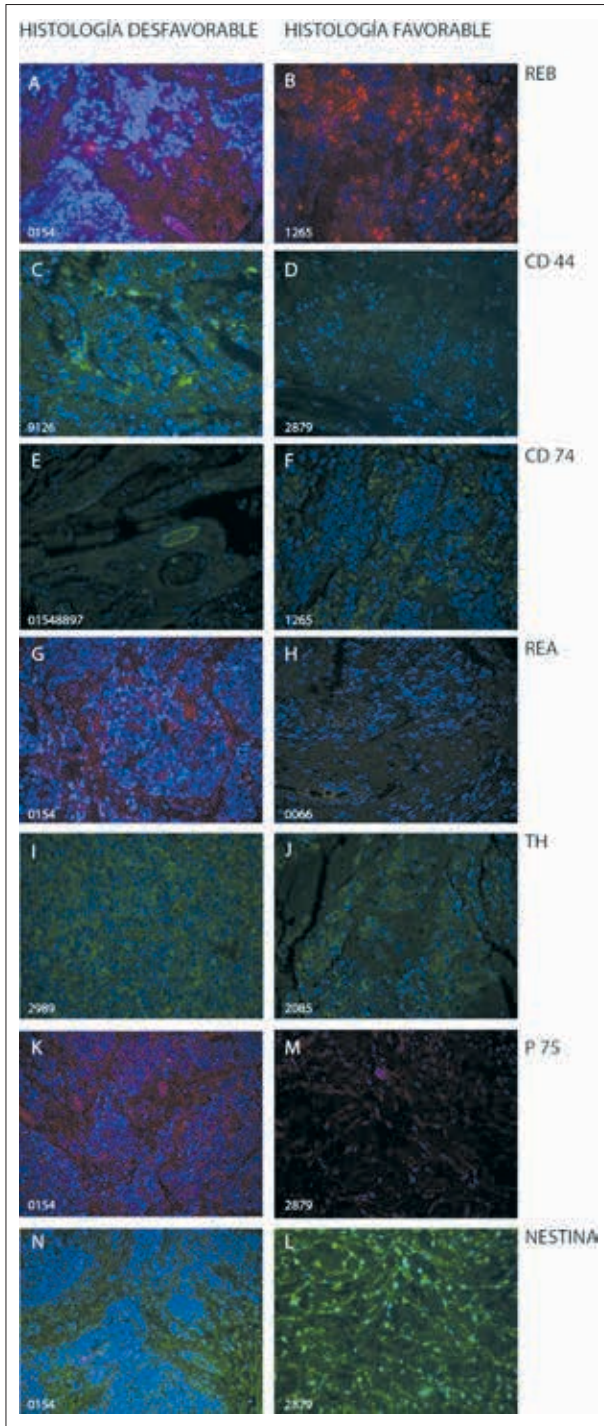


Figura 3. Expresión de marcadores en función de la histología. A y B) REB. C y D) CD44. E) CD74+ en una estructura vascular. F) CD 74 negativo. G) REA muy +. H) REA – en tumor rico en matriz. I y J) TH. K) p75 + en estructuras vasculares y de membrana. M) p75 con escasa expresión en una agrupación celular. N y L) Nestina + en todos los tumores.

se conoce la existencia de una causa única desencadenante de estos tumores, estando implicados muchos factores en el desarrollo y agresividad de los mismos. Se cree que la exis-

tencia de metástasis al diagnóstico, que está presente hasta en un 70% de los casos, es un factor pronóstico decisivo en el desarrollo de estos tumores. El 61,1% de las muestras de NB de nuestro estudio corresponden a un estadio 4, con existencia de metástasis al diagnóstico, lo cual se acerca a lo descrito en la literatura. La progresión de la enfermedad y la recidiva tras un periodo libre de tumor se relaciona con la presencia de enfermedad diseminada al diagnóstico, así como con otros factores de mal pronóstico (edad mayor de 18 meses, amplificación de N-myc, diploidía o hiperdiploidía, histología desfavorable y otros de menor relevancia).

Recientemente, se está estudiando el papel que juega la existencia de CMC en este tipo de tumores derivados de la cresta neural, y se está analizando la posibilidad de la diferenciación de estas células como nueva terapia contra el NB. Se cree que las CMC son responsables del desarrollo y crecimiento tumoral, estando implicadas en la progresión y recidiva tumoral, así como en la presencia de metástasis⁽⁹⁾. Además, estas células podrían estar implicadas en la resistencia al tratamiento quimioterápico convencional que presentan algunos de estos tumores, ya que las células madre en general son especialmente resistentes a este tipo de tratamientos⁽¹⁰⁾.

En nuestro trabajo, tratamos de identificar y estudiar la expresión de marcadores de células madre que pudieran ayudarnos a identificar la existencia de CMC y a distinguirlas del resto de células tumorales. De este modo, podríamos contribuir a la identificación y aislamiento de estas células, lo que facilitaría el estudio de su comportamiento y la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

Del análisis de la expresión de los marcadores en nuestro estudio y su correlación con factores pronóstico se deduce que la expresión positiva de REB, CD44, y Phox2b, se asocia con tumores más agresivos, pudiendo constituir nuevos marcadores de mal pronóstico en NB. Estos marcadores están presentes en células progenitoras de la cresta neural⁽¹¹⁻¹³⁾, por lo que podrían ser útiles en la identificación de las CMC de NB.

La expresión positiva de CD44 en tumores gastrointestinales y de cavidad oral en adultos se ha relacionado con un pronóstico desfavorable, tal y como ocurre en nuestro estudio con muestras de NB pediátrico. Sin embargo, el papel de este marcador en NB es controvertido, puesto que está descrito en la literatura que la expresión de CD44 en NB estaría relacionada con la no amplificación de n-myc, es decir, con buen pronóstico⁽¹³⁻¹⁵⁾. Nuestra asociación de CD44 con mal pronóstico podría deberse a problemas con el tamaño muestral, puesto que no llega a ser en ningún caso una correlación estadísticamente significativa.

El marcador que nos ha dado el resultado más interesante ha sido el receptor de endotelina tipo A (REA). En nuestro trabajo, hemos encontrado que aquellos tumores que lo expresan presentan una histología desfavorable, resultando estadísticamente significativo ($p=0,013$); con un IMK alto y n-myc amplificado, obteniéndose unos resultados en estos parámetros muy cercanos a la significación estadística ($p=0,054$), a pesar del limitado número de muestras de nuestro

estudio. Además, según nuestro análisis, cuando REA se expresa, parece correlacionarse con la existencia de metástasis en el momento del diagnóstico, así como con la progresión tumoral y la recidiva. Según nuestros resultados, por tanto, es un marcador altamente asociado a la malignidad del tumor. REA está descrito como importante para la migración y especificación de ciertas poblaciones de células madre de la cresta neural⁽¹⁶⁾. Además, su relación con proliferación tumoral está muy bien documentada^(17,18). Estamos por tanto ante un posible marcador de CMC de NB, que podría utilizarse para pronóstico, pero que además, al ser un marcador de membrana, podría utilizarse para la separación de estas células por citometría de flujo. Esto facilitaría su estudio y permitiría la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para combatir la enfermedad.

Las principales limitaciones de nuestro estudio han sido el número limitado de muestras⁽¹⁷⁾, que hace que la obtención de unos resultados estadísticamente significativos sea difícil. Además, las variables de progresión, recidiva y mortalidad, no han podido ser evaluadas a más largo plazo, debido al corto periodo de seguimiento de los pacientes del estudio.

El REB es un típico ejemplo de marcador que muy probablemente correlacionaría con el mal pronóstico del tumor si la muestra fuera más amplia. Por lo que en un futuro, cuando dispongamos de un mayor número de muestras sería interesante realizar de nuevo el estudio de expresión por IHQ de estos marcadores, ya que muchas de las correlaciones podrían llegar a ser estadísticamente significativas.

BIBLIOGRAFÍA

- Jiang M, Stanke J, Lahti JM. The connections between neural crest development and neuroblastoma. *Curr Top Dev Biol.* 2011; 94: 77-127.
- Carlsen NL. Neuroblastoma: epidemiology and pattern of regression. Problems in interpreting results of mass screening. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1992; 14: 103-10.
- Schmidt ML, Lal A, Seeger RC, Maris JM, Shimada H, O'Leary M, et al. 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: 6474-80.
- London WB, Castel V, Monclair T, Ambros PF, Pearson AD, Cohn SL, et al. Clinical and biologic features predictive of survival after relapse of neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 3286-92.
- Vaquero M. Criterios pronósticos y análisis anatomopatológico de los tumores neuroblásticos. *Rev Esp Patol.* 2008; 41: 261-6.
- Mattahay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cisretinoic acid. *N Engl J Med.* 1999; 341: 1165-73
- Ross RA, Spengler BA. Human neuroblastoma stem cells. *Semin Cancer Biol.* 2007; 17: 241-7
- Bielle F, Fréneaux P, Jeanne-Pasquier C, Maran-Gonzalez A, Rousseau A, Lamant L, et al. PHOX2B immunolabeling: a novel tool for the diagnosis of undifferentiated neuroblastomas among childhood small round blue-cell tumors. *Am J Surg Pathol.* 2012; 36: 1141-9.
- Gustafson William Clay MKK. Progress towards personalized therapeutics: biologic- and risk-directed therapy for neuroblastoma. *Expert Rev Neurother.* 2011; 11: 1411-23.
- Castelo-Branco P, Tabori U. Promises and challenges of exhausting pediatric neural cancer stem cells. *Pediatr Res.* 2012; 71: 523-8.
- Druckenbrod NR, Powers PA, Bartley CR, Walker JW, Epstein ML. Targeting of endothelin receptor-B to the neural crest. *Genesis.* 2008; 46: 396-400.
- Corbel C, Lehmann A, Davison F. Expression of CD44 during early development of the chick embryo. *Mech Dev.* 2000; 96: 111-4.
- Lo L, Morin X, Brunet JF, Anderson DJ. Specification of neurotransmitter identity by Phox2 proteins in neural crest stem cells. *Neuron.* 1999; 22: 693-705.
- Taran K, Kobos J, Sitkiewicz A, Sporny S. Estimation of prognostic value of CD44 expression in neuroblastic tumours in children. *Folia Neuropathol.* 2007; 45: 126-32.
- Terpe HJ, Christiansen H, Gonzalez M, Berthold F, Lampert F. Differentiation and prognosis of neuroblastoma in correlation to the expression of CD44s. *Eur J Cancer.* 1995; 31A: 549-52.
- Munchar MJ, Sharifah NA, Jamal R, Looi LM. CD44s expression correlated with the International Neuroblastoma Pathology Classification (Shimada system) for neuroblastic tumours. *Pathology.* 2003; 35: 125-9.
- Ruest LB, Clouthier DE. Elucidating timing and function of endothelin-A receptor signaling during craniofacial development using neural crest cell-specific gene deletion and receptor antagonism. *Dev Biol.* 2009; 328: 94-108.
- Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 110-6.