

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA



**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES
GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS EN LA
DIFERENCIACIÓN Y LA REGRESIÓN
NEUROBLÁSTICA**

TESIS DOCTORAL

MARÍA SOLEDAD ALAMINOS MINGORANCE

2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Soledad Alaminos Mingorance
D.L.: GR. 2224-2008
ISBN: 978-84-691-6781-6



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Histología

Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular CTS - 115

**“IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS Y
EPIGENÉTICOS EN LA DIFERENCIACIÓN Y LA REGRESIÓN
NEUROBLÁSTICA”**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada por el Proyecto de Investigación “La hipermetilación de islas CpG a nivel del promotor del gen EMP3 en líneas y tumores gliales humanos como indicador diagnóstico de supervivencia” – SAS 135/2007 de la Junta de Andalucía

Granada, 1 de septiembre de 2008.

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS EN LA
DIFERENCIACIÓN Y LA REGRESIÓN NEUROBLÁSTICA**

Memoria que presenta la Licenciada en Farmacia
María Soledad Alaminos Mingorance
para aspirar al título de Doctor

Fdo.: María Soledad Alaminos Mingorance

VºBº El Director de Tesis

VºBº El Director de Tesis

Fdo.: Miguel Alaminos Mingorance
Doctor en Medicina y Cirugía
Doctor en Ciencias Biológicas
Universidad de Granada

Fdo.: María del Carmen Sánchez Quevedo
Doctora en Ciencias Químicas
Universidad de Granada

VºBº El Director de la Tesis

Fdo.: Pascual Vicente Crespo Ferrer
Doctor en Medicina y Cirugía
Universidad de Granada

Departamento de Histología
Universidad de Granada
2008

AGRADECIMIENTOS

Terminada esta Tesis Doctoral, me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado y me han animado para la realización de este trabajo.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis tres directores de Tesis. Al Profesor Pascual Vicente Crespo, Catedrático de Histología de la Facultad de Medicina de Granada y que desde que comencé la aventura del programa de Doctorado de Ingeniería Tisular en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada me animó para la realización de esta Tesis Doctoral.

En segundo lugar, a la Profesora María del Carmen Sánchez Quevedo, Catedrática de Histología de la Facultad de Medicina de Granada por haberme animado en todo momento y por transmitir alegría y buen humor a todo el que le rodea.

En tercer lugar, a mi hermano, el Doctor Miguel Alaminos, por su ayuda en todo momento, por haberme introducido al apasionante mundo del neuroblastoma y de la Ingeniería Tisular, y por haber guiado mis pasos en el mundo de la investigación de laboratorio.

Al Profesor D. Antonio Campos, Catedrático de Histología de la Facultad de Medicina de Granada y Director del Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular, por haberme transmitido su enorme entusiasmo y su capacidad de

trabajo. Gracias por todo el apoyo y toda la ayuda que he recibido desde el principio.

A todo el personal del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada, por haberme acogido como una más y por toda la ayuda y el ánimo recibidos en todo momento.

A todos los integrantes del programa de Doctorado de Ingeniería Tisular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, en especial al Profesor José Manuel García, por el trato humano y abrirnos las puertas a una disciplina desconocida para muchos de nosotros como es la Ingeniería Tisular.

Finalmente, un gran abrazo para toda mi familia y amigos por tener paciencia conmigo durante todo este tiempo. Gracias a mi madre por confiar en mí en todo momento y por apoyarme sin condiciones. Gracias a mi padre por servirme de ejemplo y por animarme a la consecución de esta Tesis Doctoral. Gracias también a mis otras dos hermanas, Carolina y Raquel, por el cariño que siempre me dais.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.- LOS TUMORES NEUROBLÁSTICOS	2
1.1. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LOS TUMORES NEUROBLÁSTICOS	4
1.2. COMPORTAMIENTO CLÍNICO	8
1.3. ALTERACIONES GENÉTICAS Y MOLECULARES DE LOS TUMORES NEUROBLÁSTICOS.....	13
1.4. ESTADIAJE Y CLASIFICACIÓN PRONÓSTICA DE LOS PACIENTES CON NEUROBLASTOMA.....	22
2. LAS LÍNEAS CELULARES DE NEUROBLASTOMA.....	25
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. MUESTRAS TUMORALES Y LÍNEAS CELULARES DE ORIGEN HUMANO	30
2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE <i>MICROARRAY</i>	39
3. ANÁLISIS DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN OBTENIDOS MEDIANTE <i>MICROARRAY</i>	40
4. ANÁLISIS EPIGENÉTICO DEL GEN <i>RASSF1</i>	41
5. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA	44
RESULTADOS	45
1. IDENTIFICACIÓN DE MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS DEL GEN <i>RASSF1</i> EN TUMORES NEUROBLÁSTICOS HUMANOS	46
1.1. PCR ESPECÍFICA DE METILACIÓN (MSP) PARA EL GEN <i>RASSF1</i>	46
1.2. VALOR PRONÓSTICO DE LA HIPERMETILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN <i>RASSF1</i> EN NEUROBLASTOMA Y SU ASOCIACIÓN CON REGRESIÓN Y DIFERENCIACIÓN TUMORAL ESPONTÁNEA.....	50
1.3. EXPRESIÓN DEL GEN <i>RASSF1</i> EN TUMORES NEUROBLÁSTICOS	53

1.4. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LÍNEAS CELULARES DE NEUROBLASTOMA MEDIANTE TRATAMIENTO CON 5-AZA-2'-DESOXI-CITIDINA.....	56
2. EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL SISTEMA INMUNITARIO EN TUMORES NEUROBLÁSTICOS HUMANOS	57
2.1. GENES DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC O HLA).....	58
2.2. GENES RELACIONADOS CON MARCADORES LEUCOCITARIOS.....	61
2.3. GENES RELACIONADOS CON LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS Y QUIMIOCIAS.....	65
2.4. GENES QUE CODIFICAN PARA INTERFERONES Y RECEPTORES DE INTERFERONES	68
2.5. GENES RELACIONADOS CON LA EXPRESIÓN DE INTERLEUCINAS Y RECEPTORES DE INTERLEUCINAS.....	71
DISCUSIÓN	73
CONCLUSIONES.....	89
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
TABLA SUPLEMENTARIA.....	100

INTRODUCCIÓN

1.- LOS TUMORES NEUROBLÁSTICOS

Los tumores malignos de la infancia constituyen un importante problema de salud en nuestro medio. En la actualidad, se estima que el cáncer infantil representa alrededor del 2% del total de tumores malignos del ser humano, presentando una enorme relevancia derivada, sobre todo, de la trascendencia social de este tipo de patología. Algunos estudios sugieren que los tumores malignos son la segunda causa de mortalidad infantil en los países desarrollados, superados tan solo por los accidentes y los traumatismos, calculándose una incidencia de alrededor de un tumor maligno por cada 10.000 niños menores de 15 años (Vela, 2000).

En general, los tumores malignos más frecuentes en la infancia son los de origen hematopoyético. Sin embargo, existe un gran número de tumores sólidos malignos pediátricos de distinto origen, siendo muchos de ellos exclusivos de la edad pediátrica. De todos ellos, el neuroblastoma constituye el tumor sólido maligno más frecuente en la infancia, representando aproximadamente el 40% de todos los tumores sólidos durante los 4 primeros años de la vida (Castleberry, 1997; Schwab *et al.*, 2003). La prevalencia de esta enfermedad se sitúa en torno a un caso por cada 7000 recién nacidos, lo cual corresponde a aproximadamente 700 casos nuevos al año en Estados Unidos (Brodeur y Maris, 2002) y alrededor de 1200 en Europa. El neuroblastoma es considerado un tumor de origen embrionario que se desarrolla durante la vida fetal o postnatal temprana a partir de células inmaduras de la cresta neural ya comprometidas hacia la línea de diferenciación neuronal pero que, por motivos aún desconocidos, sufren una

alteración durante el proceso de diferenciación neuronal normal. El neuroblastoma es un tumor sólido maligno derivado de las células inmaduras de la cresta neural pertenecientes al sistema nervioso simpático. Por este motivo, la localización más frecuente de este tipo de tumores es la médula suprarrenal (Figura 1), seguida, en segundo lugar, por los ganglios nerviosos paravertebrales simpáticos. Como en la mayoría de los cánceres, su etiología es desconocida, aunque la mayoría de los especialistas coinciden en considerar que el neuroblastoma surge como consecuencia de una alteración del proceso de diferenciación neuronal normal. De este modo, los neuroblastos pertenecientes a los órganos simpáticos en desarrollo, interrumpen su proceso de maduración celular y permanecen como células embrionarias de tipo neuroblástico indiferenciado, responsables en último término de la aparición del neuroblastoma.



Figura 1. Tomografía computarizada abdominal con contraste intravenoso en la que se aprecia una masa retroperitoneal suprarrenal derecha correspondiente a un tumor neuroblástico maligno (neuroblastoma).

1.1. Características histológicas de los tumores neuroblásticos

Histológicamente, el neuroblastoma está constituido en su mayor parte por una abundante población celular correspondiente a *neuroblastos* indiferenciados (Figura 2). Por este motivo, los neuroblastomas forman parte de los denominados “tumores de células pequeñas redondas”, de difícil diagnóstico diferencial y mal pronóstico clínico, siendo difícil diferenciarlos histológicamente de otros tumores similares. Además de estos neuroblastos, suelen existir células denominadas *estromales*, constituidas en su mayoría por células de Schwann. Cuando el tumor está compuesto mayoritariamente por células estromales, siendo escasas las células neuroblásticas, nos encontramos ante un tumor denominado “rico en estroma”, cuyo pronóstico suele ser favorable.

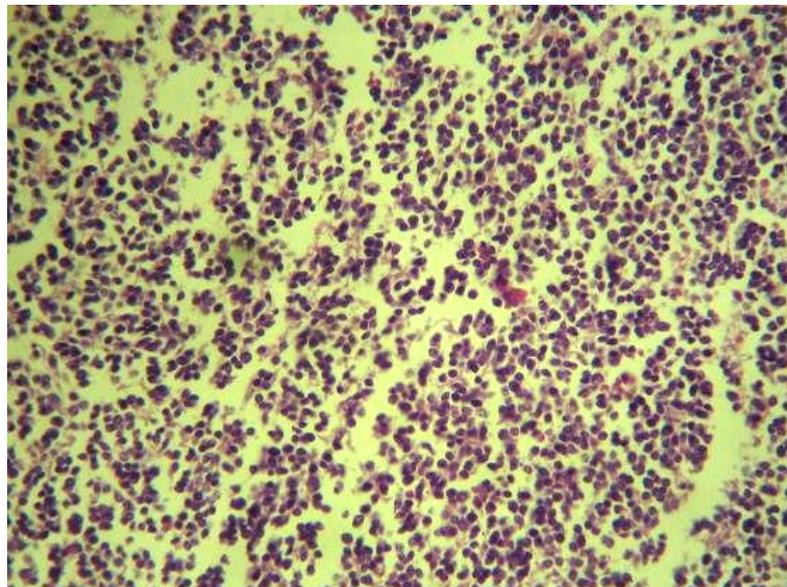


Figura 2. Imagen microscópica correspondiente a un tumor neuroblástico en la que se pueden apreciar numerosos neuroblastos indiferenciados.

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

El diagnóstico histológico del neuroblastoma requiere la participación de patólogos que estén familiarizados con el diagnóstico de los tumores infantiles. Al microscopio óptico, algunos neuroblastomas son muy difíciles de distinguir de otros tumores de células redondas y pequeñas de la infancia (como linfomas, tumores neuroectodérmicos primitivos, rabdomiosarcomas, tumores de Ewing, etc.). Por ello, en muchos casos es necesario demostrar la naturaleza neuronal simpática del tumor mediante inmunohistoquímica, microscopía electrónica o demostrando la existencia de niveles elevados de catecolaminas séricas (dopamina, noradrenalina), o sus metabolitos en la orina

(ácido vainillilmandélico -VMA- o ácido homovainílico -HVA-). El criterio mínimo establecido por acuerdo internacional para diagnosticar un neuroblastoma se basa en una de las características siguientes: 1) un diagnóstico patológico inequívoco realizado por análisis del tejido tumoral mediante microscopía óptica (con o sin inmunohistoquímica, microscopía electrónica o niveles elevados de catecolaminas séricas o de sus metabolitos en orina). 2) La combinación de una muestra de médula ósea por aspiración o biopsia que contenga células tumorales inequívocas (sincitios o racimos de células inmunocitológicamente positivas) y niveles elevados de catecolaminas séricas o de sus metabolitos en orina (Brodeur *et al.*, 1993).

Histológicamente, los tumores neuroblásticos se manifiestan en tres categorías morfológicas: el neuroblastoma indiferenciado (constituido principalmente por neuroblastos inmaduros), el ganglioneuroblastoma (nivel intermedio de diferenciación neuronal/ganglionar) y el ganglioneuroma (la forma madura de neuroblastoma, rica en células estromales) (Shimada, 1993) (Figura 3). En la mayor parte de los casos, el neuroblastoma de estadio avanzado y mal pronóstico está constituido por una abundante población celular correspondiente a los neuroblastos indiferenciados, los cuales forman rosetas de células pequeñas y redondeadas denominadas rosetas de Homer-Wright (Figura 3A). Por el contrario, muchos tumores de buen pronóstico están mayoritariamente compuestos por células estromales, siendo muy escasas las células neuroblásticas (Figura 3B). Este tipo de tumores ricos en estroma tienden a un crecimiento autolimitado y suelen asociarse a un pronóstico favorable.

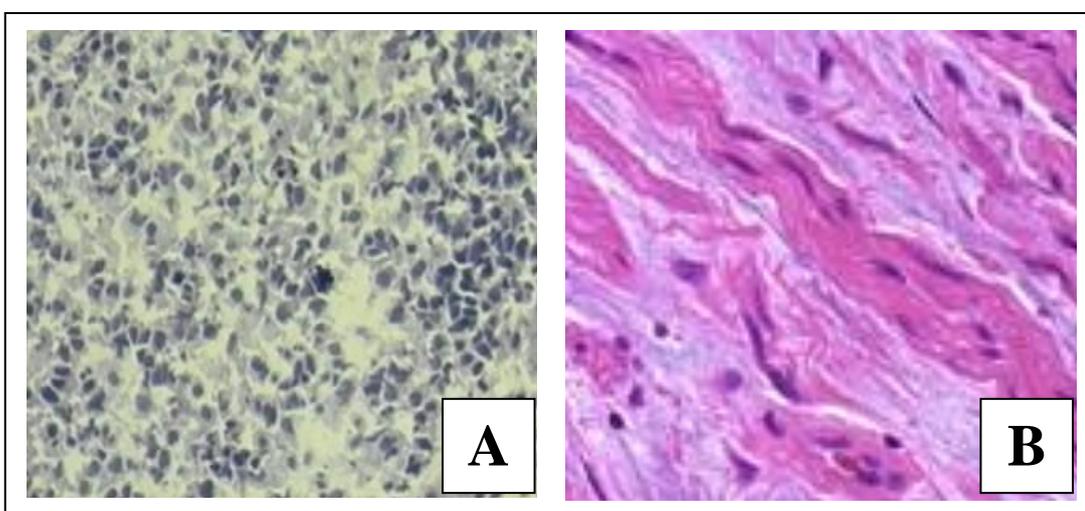


Figura 3. Imagen histológica correspondiente a un neuroblastoma rico en células neuroblásticas (A) y a un ganglioneuroma rico en células estromales (B).

1.2. Comportamiento clínico

La presentación clínica del neuroblastoma es muy variable, pues, en conjunto, los neuroblastomas constituyen un grupo muy heterogéneo de tumores en cuanto a sus características morfológicas, genéticas, biológicas y clínicas. Aunque depende fuertemente de numerosos factores y del tipo de tratamiento aplicado, la mortalidad global de esta enfermedad continúa siendo muy elevada, oscilando entre el 30% y el 60%, a pesar de los avances terapéuticos y los últimos protocolos de quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia (Evans *et al.*, 1976; Brodeur y Maris, 2002; Schilling *et al.*, 2002). En este sentido, el comportamiento clínico de los neuroblastomas es muy variable, existiendo un amplio espectro que abarca desde la involución o regresión espontánea, hasta la proliferación maligna agresiva, existiendo casos en los que ocurre una maduración espontánea exenta de progresión tumoral.

Curiosamente, algunos neuroblastomas de características clínicas intermedias (que pueden incluso afectar los ganglios linfáticos locoregionales, aunque sin presentar metástasis a distancia), pueden experimentar un proceso de maduración y regresión espontánea. En la actualidad no es posible determinar con toda precisión qué casos de neuroblastoma evolucionarán como enfermedad loco-regional y cuáles desarrollarán metástasis, por lo que muchos casos de neuroblastoma que podrían madurar y regresar por sí mismos, acaban siendo sometidos a quimio- y/o radioterapia.

Las bases biológicas implicadas en la existencia de esta diversidad tumoral aún no se conocen, lo cual dificulta enormemente la comprensión de los fenómenos biológicos implicados en el comportamiento clínico de estos tumores. A pesar de su elevada mortalidad global, el pronóstico es sumamente variable, y depende de diversos factores biológicos y genéticos, entre los que destacan la edad del paciente en el momento del diagnóstico, el estadio clínico en que se encuentre la enfermedad y algunas características biológicas del tumor tales como la amplificación del oncogén *MYCN* (Brodeur y Maris, 2002) o la presencia de mutaciones o aberraciones cromosómicas.

Aunque más adelante se discutirán los distintos grupos clínicos en los que se puede clasificar el neuroblastoma, podemos afirmar que, en general, los pacientes con neuroblastomas de estadio 4 (esto es, tumor extendido a órganos distantes, sobre todo al hueso) que tienen más de un año de edad en el momento del diagnóstico, así como los tumores de estadio 3 (importante extensión local, pero no existen metástasis a distancia) con amplificación del gen *MYCN* (Figura 4), presentan un riesgo muy elevado de mortalidad (superior al 60% a pesar del tratamiento). Por el contrario, los niños con tumores de estadios 1, 2, y 3 (correspondientes a tumores loco-regionales, esto es, sin extensión a distancia) sin amplificación del gen *MYCN*, así como los lactantes (pacientes con menos de 12 meses de edad al diagnóstico) con neuroblastoma de estadio 4S -un estadio especial en el que las metástasis están localizadas únicamente en médula ósea, piel o hígado (Castleberry, 1997; Brodeur y Maris, 2002; Herman y Baylin, 2003; Schwab *et al.*, 2003)-,

presentan el riesgo más bajo de mortalidad (menor del 10%). Finalmente, los pacientes lactantes con neuroblastoma estadio 4 y los niños mayores de un año con la enfermedad en estadio 3 pero sin amplificación del gen *MYCN*, constituyen un grupo de riesgo intermedio.

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

La existencia de neuroblastomas clínicamente aparentes que experimentan una regresión espontánea es un fenómeno biológico de enorme trascendencia clínica (D'Angio *et al.*, 1971). Un dato fundamental que avala este fenómeno de la regresión espontánea es el hecho de que el porcentaje de

neuroblastomas localizados en la médula suprarrenal de neonatos fallecidos por causas no tumorales es muy elevado, superando claramente la incidencia de estos tumores en la población general (Beckwith y Perrin, 1963; Hasegawa et al, 1982). El hallazgo frecuente de agregados microscópicos de células inmaduras de la cresta neural (denominados neuroblastomas *in situ*) en autopsias, implica que las lesiones *in situ* evolucionan mayoritariamente hacia la regresión y la maduración de manera espontánea. No se ha determinado todavía si el neuroblastoma que involuciona y el neuroblastoma *in situ* son restos embrionarios persistentes, hiperplasias o neoplasias, pero las evidencias sugieren que existen prerequisites genéticos para que la regresión tenga lugar (Ambros *et al.*, 1995; Hiyama *et al.*, 1995; Mora *et al.*, 2000).

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

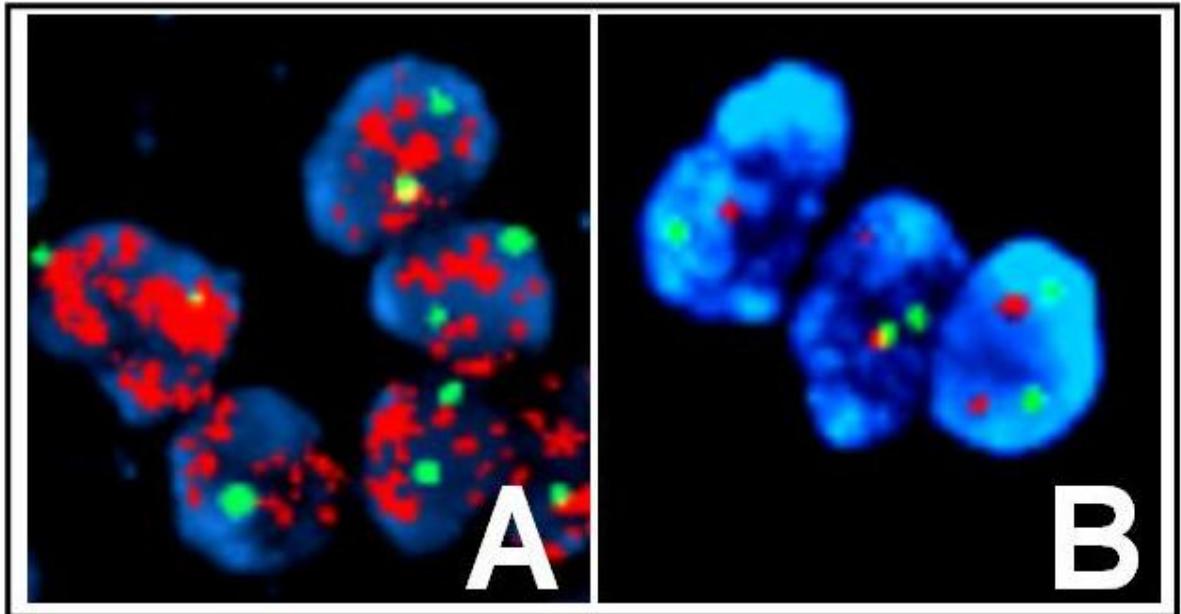


Figura 4. Células neuroblásticas correspondientes a un tumor con amplificación del gen *MYCN* (A) y a un tumor sin amplificación de este oncogén (B). Ambas muestras tumorales fueron sometidas a técnicas de FISH (*hibridación fluorescente in situ*), por lo que cada punto rojo corresponde a una copia del gen *MYCN* y cada punto verde a una copia del centrómero del cromosoma 17 (utilizado como control). En color azul se aprecian los núcleos celulares teñidos con DAPI.

1.3. Alteraciones genéticas y moleculares de los tumores neuroblásticos

A pesar de su relevancia, aún sabemos muy poco sobre las bases moleculares asociadas a la diversidad clínica del neuroblastoma y, en concreto, a la remisión y la diferenciación celular espontánea que ocurre en algunos casos. Las aberraciones genéticas mejor caracterizadas hasta la fecha en neuroblastoma son la ya referida amplificación del gen *MYCN*, la pérdida o ganancia de material genético a nivel de ciertas regiones cromosómicas, las alteraciones epigenéticas y las modificaciones de la expresión génica global:

A) Amplificación del gen *MYCN*.

La amplificación de *MYCN* (Figuras 4 y 5) ocurre aproximadamente en el 25% de los neuroblastomas, asociándose claramente con estadios avanzados de la enfermedad, rápida progresión del tumor, y tasas de supervivencia muy bajas (Mora *et al.*, 2001; Alaminos *et al.*, 2003 y 2005). Sin embargo, el hecho de que estas aberraciones estén presentes únicamente en una cuarta parte de todos los tumores neuroblásticos (Brodeur *et al.*, 1993; Schilling *et al.*, 2002), hace necesaria la búsqueda de marcadores más universales y específicos. La clara relación causal existente entre el nivel de agresividad tumoral y la presencia de ciertas alteraciones cromosómicas, sugiere que las distintas clases de neuroblastoma podrían presentar alteraciones genéticas específicas, y que éstas probablemente contribuyen al diverso comportamiento clínico de estos tumores (Teitz *et al.*, 2000; Eggert *et al.*, 2001; Esteller, 2003; Herman y Baylin, 2003; Woods *et al.*, 2002). El pronóstico infausto del neuroblastoma de estadio 4 requiere del desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas que aporten nuevos conocimientos sobre la biología de estos tumores.

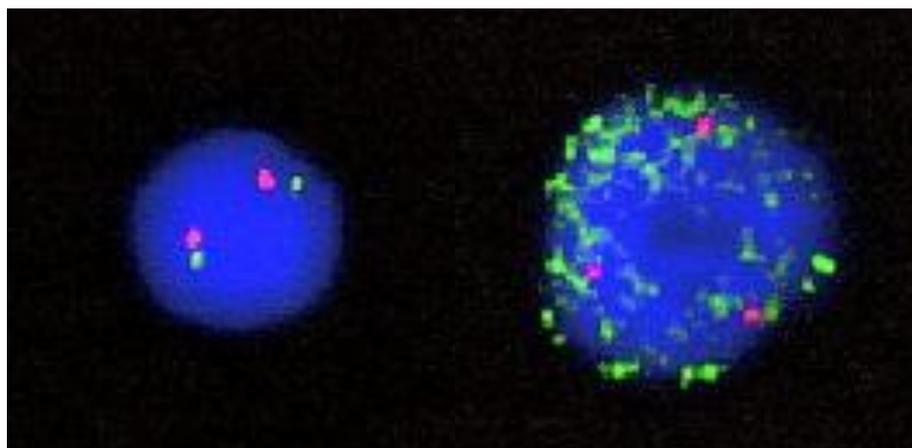


Figura 5. Célula neuroblástica correspondiente a un tumor con dos copias del gen *MYCN* (gen no amplificado, imagen de la izquierda) y a un tumor con múltiples copias de este oncogén (amplificación *MYCN*, imagen de la derecha). Ambas muestras tumorales fueron sometidas a técnicas de FISH (*hibridación fluorescente in situ*), por lo que cada punto rojo corresponde a una copia del gen *MYCN* y cada punto verde a una copia del centrómero del cromosoma 17 (utilizado como control). En color azul se aprecian los núcleos celulares teñidos con DAPI.

B) Pérdidas y ganancias de material cromosómico.

Todo tipo de alteraciones cromosómicas se han descrito en neuroblastoma, incluyendo la pérdida o la ganancia de cromosomas completos (Figura 6) o de material genético a nivel de determinados cromosomas. Probablemente, las alteraciones más frecuentes sean la pérdida de heterocigosidad (LOH) a nivel del brazo largo del cromosoma 11, concretamente, en la región 11q23, que aparece en torno al 34% de los tumores neuroblásticos (Attiyeh *et al.*, 2005), y el LOH a nivel de 1p36 (Mora *et al.*, 2000), el cual presenta igualmente una elevada prevalencia (23% de los neuroblastomas). Otras alteraciones cromosómicas pueden aparecer en prácticamente cualquier cromosoma, asociándose en la mayoría de los casos a una mayor tasa de proliferación y crecimiento tumoral y a un peor pronóstico vital para los pacientes (Oppenheimer *et al.*, 2003). De hecho, en algunos centros especializados en el tratamiento de los pacientes con neuroblastoma, se utiliza este tipo de marcadores para determinar el pronóstico y establecer una u otra pauta terapéutica en neuroblastoma. En concreto, distintos investigadores demostraron que la pérdida de heterocigosidad en la región 19q13.3 (19q13.3LOH) se asocia a un pronóstico vital desfavorable y a una elevada proliferación celular en neuroblastomas loco-regionales (Mora *et al.*, 2001 y 2003; Alaminos *et al.*, 2005).

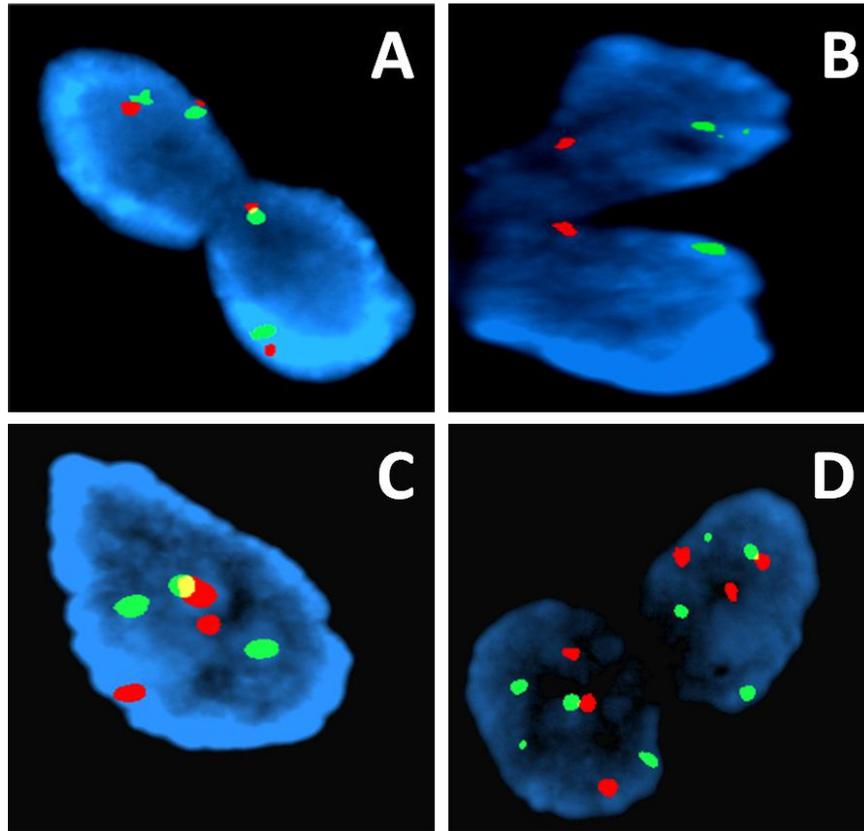


Figura 6. Imagen de FISH para el centrómero del cromosoma 1 (señales rojas) y 17 (señales de color verde) en células de neuroblastoma humano. A: células con dos copias de cada cromosoma (células euploides con carga genética normal para ambos cromosomas). B: células con pérdida de un cromosoma de cada tipo (células haploides al menos para el cromosoma 1 y el 17). C: célula con ganancia de un cromosoma de cada tipo (célula triploide al menos para ambos cromosomas analizados). D: células con ganancia de un cromosoma 1 (triploidía del cromosoma 1) y de dos cromosomas 17 (tetraploidía del cromosoma 17).

C) Modificaciones epigenéticas en neuroblastoma.

Recientemente, se ha descrito un tipo de alteración genética característica de los tumores malignos humanos: la metilación anómala de islas CpG asociadas al promotor de genes supresores tumorales. Esta alteración impide la expresión de dichos genes, produciéndose el silenciamiento de todos los *loci* implicados (Jones y Laird, 1999; Esteller 2003; Herman y Baylin, 2003). El silenciamiento de estos genes supresores juega un papel fundamental en la patogénesis de la mayor parte de los tumores malignos, ya que las alteraciones del patrón normal de metilación de ADN pueden conducir al desarrollo y progresión de todas las formas comunes de cáncer humano (Jones y Laird, 1999; Esteller 2003; Herman y Baylin, 2003). La hipermetilación de islas CpG, que normalmente no se encuentran metiladas, ha demostrado jugar un papel importante para la represión transcripcional de numerosos genes cuya función es la prevención del crecimiento y el desarrollo de tumores (Jones y Laird, 1999; Esteller 2003; Herman y Baylin, 2003).

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

En lo que respecta al neuroblastoma, y aunque es previsible que el número de genes modificados epigenéticamente sea tan numeroso como en otros tumores malignos, aún son pocos los genes que se han descrito metilados y silenciados epigenéticamente. Entre otros, en neuroblastoma se ha descrito la metilación de los genes caspasa 8 (*CASP8*), *RARβ2* (Alaminos *et al.*, 2004), *EMP3* (Alaminos *et al.*, 2005), los receptores del factor de necrosis tumoral *DR4*, *DR5*, *DcR1*, y *DcR2* (Teitz *et al.*, 2000; Eggert *et al.*, 2001; van Noesel *et al.*, 2002 y 2003) y algunos genes supresores tumorales como *HOXA9*, *TMS1* y *FOLH1* (Alaminos *et al.*, 2004). En este sentido, algunos trabajos han demostrado que la hipermetilación de ciertos genes relacionados con la biología del neuroblasto pueden sufrir hipermetilación bajo determinadas circunstancias y que, en tales casos, la hipermetilación se asocia a una elevada progresión tumoral y un mal pronóstico vital del paciente (Alaminos *et al.*, 2004 y 2005). Del mismo modo, es bien sabido que los genes supresores tumorales juegan un papel fundamental en el mantenimiento del control de la proliferación celular y, por tanto, en la prevención de la transformación maligna de las células de todos los tejidos (Hernando *et al.*, 2004).

D) Modificaciones de la expresión génica global.

Las variaciones en la expresión de genes asociadas con cada tipo de enfermedad pueden proporcionar claves importantes para el conocimiento etiológico y contribuir eventualmente al diagnóstico y a la toma de decisión terapéutica individualizada para cada paciente. Las nuevas tecnologías de análisis de alto rendimiento de ARNm en forma de *microarrays* permiten el

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

Una vez determinada la expresión génica global, los investigadores deberán ser capaces de correlacionar el patrón de expresión génica con la etiología y la respuesta al tratamiento. Estas correlaciones podrían ser utilizadas en el futuro para desarrollar grupos de marcadores moleculares que permitirían la implementación de métodos para la detección precoz y el diagnóstico más preciso de la enfermedad. El conocimiento de las correlaciones entre patrones de expresión génica y parámetros clínicos relevantes permitiría a los clínicos basar la toma de decisiones en las características moleculares del tumor de cada paciente (Matthay *et al.*, 1999; Herman y Baylin, 2003; van Noesel *et al.*, 2003).

En los últimos años, los análisis de expresión de alto rendimiento mediante microarrays han contribuido a refinar la clasificación de diversas neoplasias, identificar grupos de genes con importancia pronóstica y detectar grupos de pacientes con distinta capacidad de respuesta a la terapia (Ciccarone *et al.*, 1989; Ross *et al.*, 1995 y 2003; Jones y Laird 1999; Mora *et al.*, 2000 y 2001; Brodeur 2002; Alaminos *et al.*, 2003) (Figura 7). Por ello, parecen constituir una herramienta especialmente útil para investigar si existe un patrón de expresión característico al diagnóstico, que nos permita distinguir los neuroblastomas exclusivamente loco-regionales de aquellos con capacidad para metastatizar. Dichos patrones de expresión, junto con los parámetros clínicos y moleculares que ya han mostrado su importancia en el pronóstico de los neuroblastomas, permitirían la toma de decisiones terapéuticas más apropiadas para cada caso.

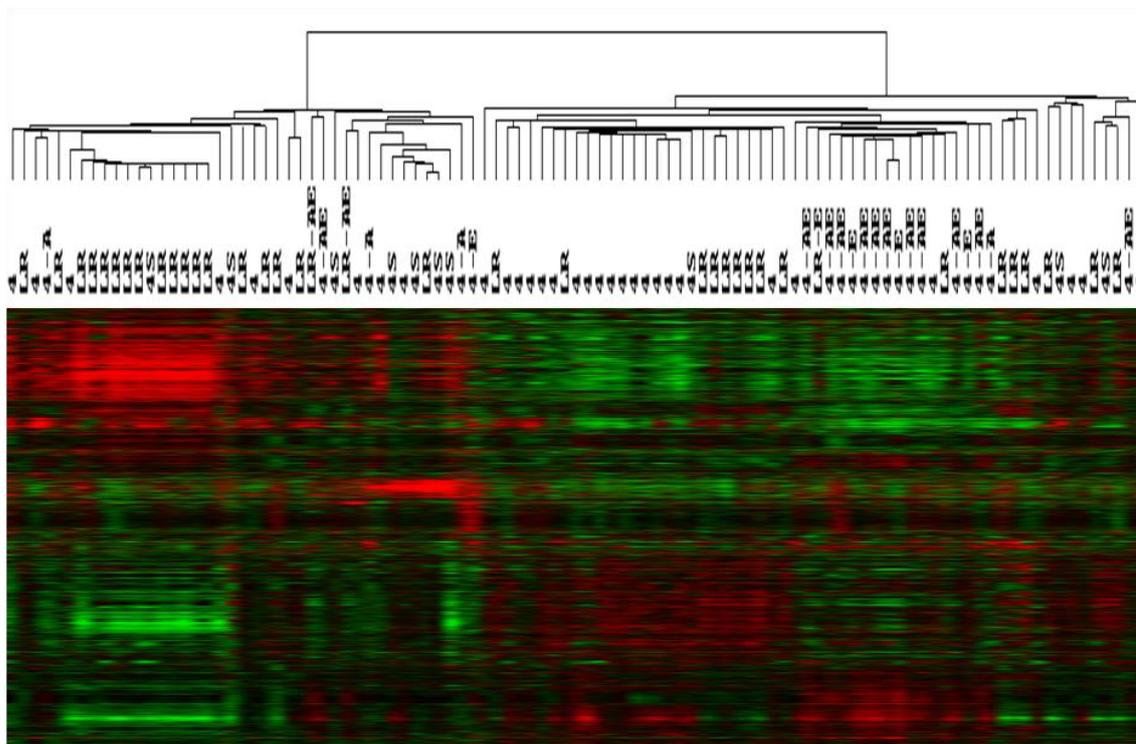


Figura 7. Análisis de 99 tumores neuroblásticos mediante *microarray*. Cada columna corresponde a un tumor concreto, mientras que cada fila representa un gen específico. En la parte superior, aparece un dendrograma en el que los tumores son agrupados según su perfil global de expresión génica. En color rojo se representan los genes cuya expresión es superior a la media de los 99 tumores, mientras que en verde aparecen los genes cuya expresión es inferior a dicha media.

1.4. Estadía y clasificación pronóstica de los pacientes con neuroblastoma

Como ya hemos indicado, el pronóstico de cada paciente afecto de neuroblastoma va a depender de diversos factores biológicos y genéticos, entre los que destacan los siguientes:

- **Estadio clínico** en que se encuentre la enfermedad (grado de extensión local y a distancia). A este respecto, la clasificación más utilizada es la INSS (*international neuroblastoma staging system*), que considera cinco estadios de la enfermedad: estadio I, cuando el tumor está restringido al lugar de origen; estadio II, cuando se extiende fuera del órgano de origen pero no cruza la línea media del cuerpo; estadio III, cuando cruza la línea media; estadio IV, cuando el tumor se extiende y se disemina a distancia (especialmente, a hueso y médula ósea); estadio 4S, cuando se trata de un paciente de menos de un año de edad, con tumor de pequeño tamaño que se extiende únicamente al hígado, la médula ósea o la piel (Castleberry, 1997; Brodeur y Maris, 2002; Herman y Baylin, 2003; Schwab *et al.*, 2003).
- **Edad del paciente** en el momento del diagnóstico. Según la mayoría de los expertos, la edad es, probablemente, el factor más importante a la hora de predecir el comportamiento del neuroblastoma. De hecho, todos los pacientes cuyo tumor se hace evidente antes de los 12-18 meses de edad (pacientes en edad lactante) tienen un pronóstico sensiblemente mejor y una supervivencia significativamente superior a los pacientes mayores de 12 meses de edad al diagnóstico.

- **Características histológicas** del tumor. A este respecto, Shimada estableció una clasificación muy útil a la hora de predecir el comportamiento de un tumor neuroblástico. Según esta clasificación, los tumores ricos en células indiferenciadas (neuroblastos inmaduros), presentan un pronóstico muy pobre, mientras que aquéllos con células más diferenciadas (especialmente, células de Schwann), presentan un pronóstico muy favorable.
- **Amplificación del gen MYCN**. Hasta el momento, se ha descrito un gran número de marcadores genéticos y moleculares de mal pronóstico en neuroblastoma. El más importante de ellos, con valor pronóstico independiente del resto de factores, es la amplificación del oncogén *MYCN* (Figura 5), la cual se asocia a tumores muy agresivos y de baja supervivencia (Brodeur y Maris, 2002; Alaminos *et al.*, 2003).
- **Ploidía**. Otro de los factores que posee valor predictivo independiente del resto de factores es la ploidía de las células tumorales neuroblásticas. En efecto, los tumores cuya dotación genética es diploide o tetraploide (esto es, normal o cercana a la normalidad), suelen ser más agresivos que los tumores con dotaciones genéticas haploides, triploides o pentaploides (ganancia o pérdida de cada uno de los 23 cromosomas de la célula humana) (Mora *et al.*, 2007).
- **Otras características** biológicas y genéticas del tumor. Otros factores implicados son, sobre todo, la presencia de alteraciones genéticas o epigenéticas descritas en el apartado correspondiente de esta Tesis Doctoral, especialmente mutaciones, deleciones o ganancias de material genético y la inactivación epigenética mediante hipermetilación de islas

CpG asociadas al promotor de ciertos genes supresores tumorales. En general, los tumores más agresivos y de peor pronóstico, van a presentar un mayor número de alteraciones genéticas que los tumores menos agresivos, lo cual nos permite, hasta cierto punto, predecir el comportamiento de esta enfermedad en base a las características genotípicas y estructurales de las células que conforman el tumor (Oppenheimer *et al.*, 2003; Mora *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2004; Alaminos *et al.*, 2005).

Según todos estos factores, los pacientes afectos de neuroblastoma se pueden clasificar en diversos grupos de riesgo (Mora *et al.*, 2001):

- 1- **Neuroblastomas de pronóstico muy favorable.** Se considera que los pacientes con neuroblastomas de estadio 4S presentan una supervivencia cercana al 100%.
- 2- **Neuroblastomas de pronóstico favorable.** Los tumores en estadio loco-regional (1, 2 y 3 de la INSS), haplo o triploides y que no presentan amplificación *MYCN* ni pérdida de heterocigosidad en la región 19q13.3, son considerados de pronóstico favorable, con una supervivencia en torno al 80%.
- 3- **Neuroblastomas de pronóstico intermedio.** Corresponden a lactantes (pacientes menores de 12 meses de edad en el momento del diagnóstico) con neuroblastoma de estadio 4. Su supervivencia, después de la quimioterapia intensiva, se acerca al 60%.

- 4- **Neuroblastomas de mal pronóstico.** Se incluyen aquí todos los pacientes mayores de un año con neuroblastoma de estadio 4, así como los casos de estadio loco-regional diploide o con amplificación del gen *MYCN* o con pérdida de heterocigosidad en la región 19q13.3.

2. LAS LÍNEAS CELULARES DE NEUROBLASTOMA

Al igual que ocurre en otros tipos de tumores malignos humanos, algunos investigadores han logrado establecer en cultivo varios tipos de líneas celulares a partir de tumores neuroblásticos humanos. Estas líneas celulares presentan la característica de poder proliferar indefinidamente en cultivo, por lo que son consideradas como “células inmortales”, lo cual las convierte en una herramienta muy útil para la investigación en laboratorio de todo tipo de características biológicas, genéticas o fisiológicas de las células neuroblásticas malignas, así como para la evaluación terapéutica de nuevos agentes quimioterápicos o para llevar a cabo ensayos *in vitro* de tipo genético y molecular.

Numerosos estudios han demostrado la existencia de una gran diversidad morfológica y estructural en las líneas celulares de neuroblastoma mantenidas en cultivo. En este sentido, podemos distinguir tres tipos fundamentales de células (Ross *et al.*, 1995 y 2003):

- **Las células tipo N** (neuroblásticas) son de pequeño tamaño, con núcleos prominentes, y proliferan muy rápidamente en cultivo (Figura 8A).
- **Las células tipo S** (estromales o similares a las células de Schwann), por el contrario, son células aplanadas, sumamente adherentes, y expresan algunas proteínas características de los melanoblastos, células gliales inmaduras o de las células Schwann, células meníngeas, o células mesenquimales (Figura 8B). Estas células de tipo S son muy poco tumorigénicas y son, en general, incapaces de formar tumores en ratones atímicos (Ciccarone *et al.*, 1989; Ross *et al.*, 2003).
- **Las células de tipo I** son morfológicamente intermedias entre las células N y las S, y poseen características bioquímicas de ambas. Las células de tipo I tienen el potencial maligno más elevado, y son capaces de formar grandes tumores cuando son implantadas en ratones (Ross *et al.*, 2003).

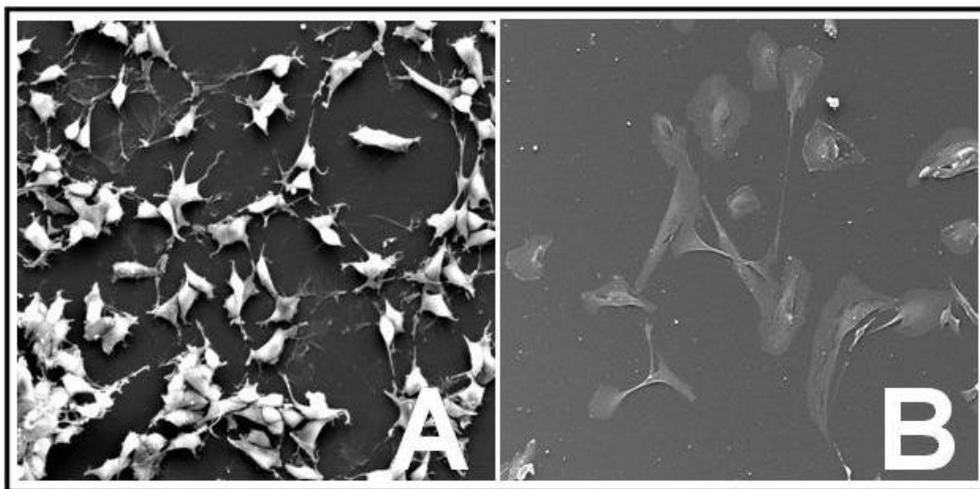


Figura 8. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de líneas celulares de neuroblastoma de tipo N (A) y de tipo S (B).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL: El objetivo general de este trabajo es contribuir al conocimiento de los marcadores de carácter genético y epigenético que se asocian a la diferenciación celular y la regresión espontánea en tumores neuroblásticos humanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Identificar la presencia de modificaciones epigenéticas del gen *RASSF1* en tumores neuroblásticos humanos.
2. Determinar el valor pronóstico de la inactivación epigenética del gen *RASSF1* en neuroblastoma y su asociación con regresión y diferenciación tumoral espontánea.
3. Cuantificar la expresión de genes relacionados con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II en tumores neuroblásticos de alto y bajo grado y en líneas celulares de neuroblastoma, mediante microarrays de oligonucleótidos.
4. Cuantificar la expresión de marcadores leucocitarios en tumores neuroblásticos de alto y bajo grado y en líneas celulares de neuroblastoma, mediante microarrays de oligonucleótidos.
5. Cuantificar la expresión de citocinas, interleucinas e interferones en tumores neuroblásticos de alto y bajo grado y en líneas celulares de neuroblastoma, mediante microarrays de oligonucleótidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras tumorales y líneas celulares de origen humano

En primer lugar, el análisis epigenético del gen *RASSF1* se llevó a cabo utilizando 108 tumores neuroblásticos pertenecientes a los estadios clínicos 1 (7 casos), 2 (16 muestras), 3 (15 muestras), 4 (60 casos), 4S (5 tumores) y ganglioneuroma (5 muestras), utilizando como control muestras de médula suprarrenal humana normal (neuroblastos normales). Las principales características de los 108 tumores neuroblásticos utilizados para este propósito se muestran en la Tabla 1.

En segundo lugar, y para la determinación de la expresión génica global mediante *microarray*, se analizaron 99 tumores neuroblásticos humanos correspondientes a 4 neuroblastomas de estadio 1, 13 de estadio 2, 10 de estadio 3, 52 tumores de estadio 4, 10 de estadio 4S y 10 tumores neuroblásticos benignos (ganglioneuromas) (Tabla 2), así como 9 muestras de médula ósea humana normal. Todas estas muestras se analizaron mediante el sistema de microarrays de oligonucleótidos *Affymetrix Genechip Human Genome U95 SetTM*, el cual contiene 62.839 genes y secuencias génicas expresadas (*EST*). Tal como se muestra en la Tabla 2, todos los tumores analizados mediante microarray se clasificaron en dos grupos atendiendo a diversos factores genéticos, clínicos y biológicos:

● **Grupo 1:** Tumores de bajo riesgo clínico (n=41). Los tumores incluidos en este grupo presentaban buen pronóstico clínico y tendencia a la regresión espontánea y la diferenciación. Los tumores incluidos en este grupo fueron los siguientes:

- Tumores en estadio 4S.
- Tumores loco-regionales (estadios 1, 2 y 3 de la INSS) sin amplificación *MYCN* ni pérdida de heterocigosidad en la región 19q13.3

● **Grupo 2:** Tumores de alto riesgo clínico (n=58). En este grupo se incluyeron aquellos tumores que presentaban tendencia hacia la metástasis y la progresión tumoral, incluyendo los siguientes casos:

- Pacientes con neuroblastoma de estadio 4.
- Tumores con amplificación del gen *MYCN*.
- Tumores con pérdida de heterocigosidad en la región 19q13.3

Todas las muestras correspondían a pacientes tratados en Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de Nueva York (EEUU) que dieron su consentimiento para ser incluidos en el estudio. Todos los tumores fueron revisados histológicamente por un mismo anatomopatólogo, descartándose aquéllas cuyo contenido en células tumorales fuese inferior al 70%. Para el análisis mediante microarray, se utilizaron únicamente las áreas del tumor que presentaban un elevado porcentaje de células neuroblásticas, para lo cual se procedió a seleccionar dichas áreas mediante macrodissección.

Por otro lado, en este estudio se utilizaron 10 líneas celulares de neuroblastoma humano (**Grupo 3** del estudio). De ellas, 6 líneas celulares presentaban amplificación del gen *MYCN* (LA1-5S, LA1-55N, LAN-1, SK-N-BE(2)S, SK-N-JD y IMR-32), mientras que 4 tenían un número normal de copias de dicho gen (SH-IN, SH-EP1, SK-N-ER y SK-N-AS).

Tabla 1: Tumores neuroblásticos utilizados en esta Tesis Doctoral para el estudio de hipermetilación de islas CpG asociadas al promotor del gen *RASSF1*. En cada tumor, se muestra el número de muestra asignado en este estudio, el estadio clínico, el estado actual de supervivencia y la edad en el momento del diagnóstico (mayor o menor de 12 meses).

Tumor número	Estadio clínico (INSS)	Supervivencia	Edad menor de 12 meses al diagnóstico
1	1	Vivo	Sí
2	1	Vivo	Sí
3	1	Vivo	Sí
4	1	Vivo	No
5	1	Vivo	No
6	1	Vivo	No
7	1	Vivo	No
8	2	Vivo	Sí
9	2	Vivo	Sí
10	2	Vivo	Sí
11	2	Vivo	Sí
12	2	Vivo	Sí
13	2	Vivo	No
14	2	Vivo	No
15	2	Vivo	No
16	2	Vivo	No
17	2	Fallecido	No
18	2	Vivo	No
19	2	Vivo	No
20	2	Vivo	No
21	2	Vivo	No
22	2	Vivo	No
23	2	Fallecido	No
24	3	Vivo	Sí
25	3	Vivo	Sí
26	3	Vivo	Sí
27	3	Vivo	Sí
28	3	Vivo	No
29	3	Fallecido	No
30	3	Vivo	No
31	3	Fallecido	No
32	3	Vivo	No
33	3	Fallecido	No
34	3	Vivo	No

Tumor número	Estadio clínico (INSS)	Supervivencia	Edad menor de 12 meses al diagnóstico
35	3	Fallecido	No
36	3	Vivo	No
37	3	Vivo	No
38	3	Fallecido	No
39	4	Fallecido	Sí
40	4	Vivo	Sí
41	4	Vivo	Sí
42	4	Fallecido	Sí
43	4	Vivo	Sí
44	4	Vivo	Sí
45	4	Vivo	Sí
46	4	Vivo	Sí
47	4	Fallecido	No
48	4	Vivo	No
49	4	Fallecido	No
50	4	Vivo	No
51	4	Fallecido	No
52	4	Fallecido	No
53	4	Vivo	No
54	4	Vivo	No
55	4	Vivo	No
56	4	Vivo	No
57	4	Fallecido	No
58	4	Fallecido	No
59	4	Fallecido	No
60	4	Fallecido	No
61	4	Fallecido	No
62	4	Fallecido	No
63	4	Vivo	No
64	4	Vivo	No
65	4	Vivo	No
66	4	Fallecido	No
67	4	Vivo	No
68	4	Fallecido	No
69	4	Vivo	No
70	4	Vivo	No
71	4	Fallecido	No
72	4	Fallecido	No
73	4	Fallecido	No
74	4	Fallecido	No
75	4	Fallecido	No
76	4	Fallecido	No

Tumor número	Estadio clínico (INSS)	Supervivencia	Edad menor de 12 meses al diagnóstico
77	4	Vivo	No
78	4	Fallecido	No
79	4	Fallecido	No
80	4	Fallecido	No
81	4	Fallecido	No
82	4	Vivo	No
83	4	Fallecido	No
84	4	Fallecido	No
85	4	Fallecido	No
86	4	Vivo	No
87	4	Fallecido	No
88	4	Vivo	No
89	4	Fallecido	No
90	4	Vivo	No
91	4	Vivo	No
92	4	Vivo	No
93	4	Fallecido	No
94	4	Fallecido	No
95	4	Vivo	No
96	4	Vivo	Sí
97	4	Fallecido	No
98	4	Vivo	No
99	4S	Fallecido	Sí
100	4S	Vivo	Sí
101	4S	Vivo	Sí
102	4S	Vivo	Sí
103	4S	Vivo	Sí
104	Ganglioneuroma	Vivo	No
105	Ganglioneuroma	Vivo	No
106	Ganglioneuroma	Vivo	No
107	Ganglioneuroma	Vivo	No
108	Ganglioneuroma	Vivo	No

Tabla 2: Tumores neuroblásticos utilizados en esta Tesis Doctoral para el estudio de expresión génica global mediante *microarray*. En cada caso, se muestra el número de muestra asignado en este estudio, el grupo de riesgo descrito en el apartado Material y Métodos de esta Tesis Doctoral, el estadio clínico, el estado actual de supervivencia, la edad en el momento del diagnóstico (mayor o menor de 12 meses), la presencia o no de amplificación del gen *MYCN* y la presencia o no de pérdida de heterocigosidad a nivel de la región cromosómica 19q13.3 (19q-LOH). GN: Ganglioneuroma.

Tumor número	Grupo de estudio en esta Tesis Doctoral	Estadio clínico (INSS)	Supervivencia	Edad menor de 12 meses al diagnóstico	<i>MYCN</i>	19q-LOH
109	1	1	Vivo	Sí	No amplificado	No
110	1	1	Vivo	Sí	No amplificado	No
111	1	1	Vivo	No	No amplificado	No
112	1	1	Vivo	No	No amplificado	No
113	1	2	Vivo	Sí	No amplificado	No
114	1	2	Vivo	Sí	No amplificado	No
115	1	2	Vivo	Sí	No amplificado	No
116	1	2	Vivo	Sí	No amplificado	No
117	1	2	Vivo	No	No amplificado	No
118	1	2	Vivo	No	No amplificado	No
119	1	2	Vivo	No	No amplificado	No
120	1	2	Vivo	No	No amplificado	No
121	1	2	Vivo	No	No amplificado	No
122	1	2	Vivo	No	No amplificado	No
123	1	2	Vivo	No	No amplificado	No
124	1	2	Fallecido	No	No amplificado	No
125	1	3	Vivo	Sí	No amplificado	No
126	1	3	Vivo	Sí	No amplificado	No
127	1	3	Vivo	No	No amplificado	No
128	1	3	Vivo	No	No amplificado	No
129	1	3	Vivo	No	No amplificado	No
130	1	4S	Vivo	Sí	No amplificado	No
131	1	4S	Vivo	Sí	No amplificado	No
132	1	4S	Vivo	Sí	No amplificado	No
133	1	4S	Vivo	Sí	No amplificado	No
134	1	4S	Vivo	Sí	No amplificado	No
135	1	4S	Vivo	Sí	No amplificado	No
136	1	4S	Vivo	Sí	No amplificado	No
137	1	4S	Vivo	Sí	No amplificado	No

Tumor número	Grupo de estudio en esta Tesis Doctoral	Estadio clínico (INSS)	Supervivencia	Edad menor de 12 meses al diagnóstico	MYCN	19q-LOH
138	1	4S	Fallecido	Sí	No amplificado	No
139	1	4S	Fallecido	Sí	No amplificado	No
140	1	GN	Vivo	No	No amplificado	No
141	1	GN	Vivo	No	No amplificado	No
142	1	GN	Vivo	No	No amplificado	No
143	1	GN	Vivo	No	No amplificado	No
144	1	GN	Vivo	No	No amplificado	No
145	1	GN	Vivo	No	No amplificado	No
146	1	GN	Vivo	No	No amplificado	No
147	1	GN	Vivo	No	No amplificado	No
148	1	GN	Vivo	No	No amplificado	No
149	1	GN	Vivo	No	No amplificado	No
150	2	2	Vivo	No	No amplificado	Sí
151	2	3	Vivo	No	Amplificado	No
152	2	3	Fallecido	No	No amplificado	Sí
153	2	3	Fallecido	No	No amplificado	Sí
154	2	3	Fallecido	No	No amplificado	Sí
155	2	3	Fallecido	No	Amplificado	Sí
156	2	4	Vivo	No	Amplificado	No
157	2	4	Vivo	No	No amplificado	Sí
158	2	4	Vivo	Sí	No amplificado	No
159	2	4	Vivo	No	No amplificado	No
160	2	4	Vivo	No	No amplificado	No
161	2	4	Vivo	No	No amplificado	No
162	2	4	Vivo	No	No amplificado	No
163	2	4	Vivo	Sí	No amplificado	No
164	2	4	Vivo	Sí	No amplificado	No
165	2	4	Vivo	No	Amplificado	No
166	2	4	Vivo	No	Amplificado	No
167	2	4	Vivo	Sí	Amplificado	No
168	2	4	Vivo	No	No amplificado	No
169	2	4	Vivo	No	Amplificado	No
170	2	4	Vivo	Sí	No amplificado	No
171	2	4	Vivo	No	No amplificado	Sí
172	2	4	Vivo	No	No amplificado	No
173	2	4	Vivo	No	No amplificado	No
174	2	4	Vivo	Sí	No amplificado	No
175	2	4	Vivo	No	No amplificado	No
176	2	4	Vivo	No	No amplificado	No
177	2	4	Vivo	No	No amplificado	No
178	2	4	Vivo	No	Amplificado	No
179	2	4	Vivo	No	No amplificado	No

Tumor número	Grupo de estudio en esta Tesis Doctoral	Estadio clínico (INSS)	Supervivencia	Edad menor de 12 meses al diagnóstico	MYCN	19q-LOH
180	2	4	Vivo	Sí	Amplificado	No
181	2	4	Vivo	Sí	No amplificado	No
182	2	4	Fallecido	No	No amplificado	Sí
183	2	4	Fallecido	No	Amplificado	No
184	2	4	Fallecido	No	Amplificado	No
185	2	4	Fallecido	No	No amplificado	Sí
186	2	4	Fallecido	No	Amplificado	No
187	2	4	Fallecido	No	No amplificado	No
188	2	4	Fallecido	No	No amplificado	No
189	2	4	Fallecido	No	Amplificado	No
190	2	4	Fallecido	No	No amplificado	No
191	2	4	Fallecido	No	No amplificado	No
192	2	4	Fallecido	No	No amplificado	No
193	2	4	Fallecido	No	No amplificado	Sí
194	2	4	Fallecido	No	Amplificado	No
195	2	4	Fallecido	No	Amplificado	No
196	2	4	Fallecido	Sí	Amplificado	No
197	2	4	Fallecido	No	No amplificado	No
198	2	4	Fallecido	No	No amplificado	No
199	2	4	Fallecido	No	No amplificado	No
200	2	4	Fallecido	No	No amplificado	No
201	2	4	Fallecido	No	No amplificado	No
202	2	4	Fallecido	No	No amplificado	No
203	2	4	Fallecido	No	Amplificado	No
204	2	4	Fallecido	No	No amplificado	No
205	2	4	Fallecido	No	No amplificado	No
206	2	4	Fallecido	No	No amplificado	No
207	2	4	Fallecido	Sí	Amplificado	No

2. Análisis de expresión génica mediante *microarray*

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

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

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

Finalmente, los ARNc marcados y fragmentados se hibridaron frente a los 5 chips del sistema de microarray de oligonucleótidos U95 de la casa comercial *Affymetrix* durante 16 h a 45°C. Este sistema contiene 62.839 genes y secuencias génicas expresadas (EST), por lo que es de suponer que todos los genes de la célula humana están incluidos en éste. Tras un proceso

estandarizado y automatizado, los chips se lavaron y se escanearon para obtener valores absolutos de expresión génica expresados como *unidades fluorescentes*. Todos los valores de expresión se normalizaron utilizando el programa informático *Affymetrix Microarray Suite 5.0* suministrado por la casa comercial *Affymetrix*.

Una vez obtenidos los valores de expresión cuantitativa en las distintas muestras analizadas, en esta Tesis Doctoral se seleccionó un grupo de 409 genes y EST cuya función se relacionaba directamente con el sistema inmunitario, incluyendo genes del sistema mayor de histocompatibilidad (HLA o MHC), marcadores de diferentes tipos de leucocitos humanos, interferones e interleucinas.

3. Análisis de los datos de expresión obtenidos mediante microarray

Para la identificación de genes sobreexpresados o reprimidos en grupos específicos de muestras (tumores del Grupo 1 con tendencia a la regresión espontánea frente a tumores del Grupo 2 con tendencia a la expansión y la metastatización) para el grupo de genes seleccionados, se utilizó la prueba *t* de Student, considerándose significativos los genes con un valor $p < 0,05$ para las pruebas de doble cola. Al mismo tiempo, se calcularon los valores medios de expresión de cada gen en cada uno de los dos grupos de estudio y se determinaron los valores de expresión diferencial media entre los grupos a comparar (*fold-change* o expresión relativa del Grupo 1 respecto del Grupo 2).

4. Análisis epigenético del gen *RASSF1*

Para la detección de modificaciones epigenéticas en genes específicos de las muestras a estudiar, se realizaron ensayos de *MSP* (PCR específica de metilación) así como secuenciación de fragmentos de ADN tratados con bisulfito. En ambos casos, se utilizó ADN tratado con bisulfito sódico según se detalla a continuación:

En primer lugar, se obtuvo el ADN celular total correspondiente a cada caso (neuroblastomas, líneas celulares o controles normales) mediante incubación en proteinasa G durante 12 h a 50°C en presencia de una elevada concentración de sales, y precipitación en etanol. Una vez purificado y

cuantificado, se obtuvo 1 μg de ADN, el cual se diluyó en 50 μl de agua en un tubo Eppendorf. Para la desnaturalización del ADN, se añadieron 5,7 μl de NaOH 3M a cada muestra, incubándose a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, se añadieron 33 μl de hidroquinona 16 mM para proteger al ADN durante la reacción de conversión, y 530 μl de bisulfito sódico 4.3 M a cada muestra, incubándose a 50°C durante 17 h en oscuridad. Mediante este procedimiento, se consiguió producir una reacción química que convirtió todas las C no metiladas en U, mientras que las C metiladas permanecieron como C. Posteriormente, para obtener los ADN modificados y eliminar los restos de bisulfito y otras sales, se procedió a purificar el ADN mediante el sistema *Wizard DNA clean-up kit* de la casa comercial Promega. Para ello, se añadió 1 ml de la resina incluida en el sistema a cada una de las muestras, haciéndolas pasar a través de los filtros específicos que posee el kit, y lavándose con isopropanol. Finalmente, los ADN se recuperaron mediante elución con 50 μl de agua bidestilada. Una vez eluidos, los ADN se volvieron a tratar con NaOH 3 M a 37°C durante 15 minutos para completar la conversión química de las C a U y para desnaturalizar el ADN de nuevo. A continuación, se precipitó el ADN con etanol y AcNH_4 en frío, lavándose en etanol y resuspendiéndose en un volumen final de 30 μl de agua.

Una vez obtenidos los ADN modificados con bisulfito, purificados y disueltos en agua, se llevaron a cabo las reacciones específicas de PCR de metilación (*MSP*). Para ello, se utilizó 1 μl de cada ADN en cada reacción de *MSP*, mezclándose con los siguientes componentes: H_2O : 13.8 μl ; dNTPs 2 μM : 2.5 μl ; tampón de reacción con Mg^{++} : 2.5 μl ; oligonucleótidos específicos 10 μM :

2.5 + 2.5 μ l; Fast-Start Taq-polimerasa: 0.2 μ l. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo durante 35 ciclos de amplificación utilizando controles negativos (ADN de linfocitos normales y de médula suprarrenal normal) y controles positivos (ADN de linfocitos normales metilado in vitro mediante una metilasa específica).

En todos los casos, las reacciones de *MSP* se realizaron utilizando dos pares diferentes de oligonucleótidos: un par que amplificaba únicamente genes no metilados y otro par capaz de amplificar únicamente el gen cuando éste se encontraba metilado.

Para la restauración del fenotipo *RASSF1* demetilado en líneas celulares de neuroblastoma, la línea celular LA1-5S se incubó durante 72 h en medio de cultivo DMEM suplementado con el agente demetilante 5-aza-2'-desoxi-citidina a concentración 2 μ M (Alaminos *et al.*, 2004). Una vez transcurrido el periodo de incubación, se extrajo el ARN total de las células control (no tratadas con 5-aza-2'-desoxi-citidina) y de las células demetiladas (tratadas con 5-aza-2'-desoxi-citidina), determinándose el nivel de expresión génica en ambas mediante microarray, como se describió más arriba.

5. Análisis de supervivencia

El análisis de supervivencia para los casos que presentaban metilación o no de *RASSF1*, se llevó a cabo mediante la prueba *log-rank* del análisis de supervivencia de *Kaplan-Mayer*, utilizando para ello el programa estadístico SPSS 12.0. Se consideró que existían diferencias significativas cuando se obtuvo un valor $p < 0,05$ en los tests de doble cola.

RESULTADOS

1. IDENTIFICACIÓN DE MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS DEL GEN RASSF1 EN TUMORES NEUROBLÁSTICOS HUMANOS

Para identificar la presencia de modificaciones epigenéticas a nivel del promotor del gen *RASSF1* (hipermetilación de islas CpG asociadas al promotor de este gen), en esta Tesis Doctoral se utilizó la PCR específica de metilación (*MSP*). Posteriormente, se llevó a cabo un estudio de supervivencia para determinar la relación entre la hipermetilación de *RASSF1* y supervivencia de los pacientes. Finalmente, analizamos la expresión de *RASSF1* a nivel de ARN e indujimos la reexpresión de este gen en líneas celulares tratadas con un agente desmetilante.

1.1. PCR específica de metilación (*MSP*) para el gen *RASSF1*

Como se muestra en la Tabla 3, los análisis llevados a cabo mediante PCR específica de metilación (*MSP*) revelaron que el promotor del gen *RASSF1* se encontraba hipermetilado en 77 de los 108 tumores neuroblásticos analizados (71,3%), encontrándose no hipermetilado en 31 casos (28,7%). Los casos en los que el gen se encontró hipermetilado corresponden a 3 tumores de estadio 1, 13 de estadio 2, 13 de estadio 3, 45 estadios 4 y 3 estadios 4S. Por el contrario, los tumores no hipermetilados corresponden a 4 neuroblastomas de estadio 1, 3 de estadio 2, 2 de estadio 3, 15 de estadio 4, 2 de estadio 4S y 5 ganglioneuromas. 82 de los casos correspondían a pacientes de edad superior

a 12 meses en el momento del diagnóstico (no lactantes) mientras que 26 casos correspondían a pacientes menores de esa edad (lactantes). Algunos ejemplos de bandas de ADN amplificadas mediante *MSP* se muestran en la Figura 9.

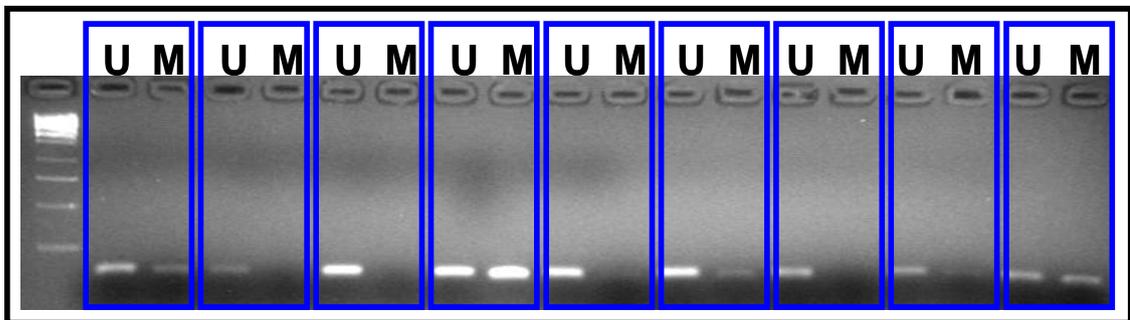


Figura 9. Análisis de metilación génica mediante PCR específica de metilación (*MSP*) en una muestra de 9 tumores neuroblásticos. A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular de ADN. Los casos en los que únicamente aparece una banda de ADN en la calle marcada U corresponden a tumores con *RASSF1* no hipermetilados, mientras que los casos metilados presentan, en general, una banda tanto en la calle U como en la calle M.

Tabla 3. Resultados del análisis de hipermetilación de islas CpG asociadas al promotor del gen *RASSF1* mediante *MSP*. Los números asignados a los distintos tumores neuroblásticos corresponden a los que aparecen en la Tabla 1 de esta Tesis Doctoral.

Tumor número	<i>RASSF1</i>	Tumor número	<i>RASSF1</i>
1	Hipermetilado	33	Hipermetilado
2	No hipermetilado	34	Hipermetilado
3	Hipermetilado	35	Hipermetilado
4	Hipermetilado	36	No hipermetilado
5	No hipermetilado	37	Hipermetilado
6	No hipermetilado	38	Hipermetilado
7	No hipermetilado	39	Hipermetilado
8	No hipermetilado	40	Hipermetilado
9	Hipermetilado	41	Hipermetilado
10	Hipermetilado	42	Hipermetilado
11	Hipermetilado	43	Hipermetilado
12	Hipermetilado	44	Hipermetilado
13	Hipermetilado	45	Hipermetilado
14	Hipermetilado	46	Hipermetilado
15	Hipermetilado	47	Hipermetilado
16	Hipermetilado	48	No hipermetilado
17	Hipermetilado	49	Hipermetilado
18	Hipermetilado	50	Hipermetilado
19	No hipermetilado	51	Hipermetilado
20	Hipermetilado	52	Hipermetilado
21	Hipermetilado	53	No hipermetilado
22	No hipermetilado	54	Hipermetilado
23	Hipermetilado	55	Hipermetilado
24	Hipermetilado	56	No hipermetilado
25	Hipermetilado	57	Hipermetilado
26	Hipermetilado	58	No hipermetilado
27	Hipermetilado	59	No hipermetilado
28	Hipermetilado	60	Hipermetilado
29	Hipermetilado	61	Hipermetilado
30	No hipermetilado	62	Hipermetilado
31	Hipermetilado	63	Hipermetilado
32	Hipermetilado	64	Hipermetilado

Tumor número	RASSF1
65	Hipermetilado
66	Hipermetilado
67	No hipermetilado
68	No hipermetilado
69	Hipermetilado
70	No hipermetilado
71	Hipermetilado
72	Hipermetilado
73	No hipermetilado
74	Hipermetilado
75	Hipermetilado
76	Hipermetilado
77	Hipermetilado
78	Hipermetilado
79	Hipermetilado
80	Hipermetilado
81	Hipermetilado
82	No hipermetilado
83	Hipermetilado
84	No hipermetilado
85	Hipermetilado
86	Hipermetilado

Tumor número	RASSF1
87	Hipermetilado
88	Hipermetilado
89	Hipermetilado
90	Hipermetilado
91	Hipermetilado
92	No hipermetilado
93	No hipermetilado
94	Hipermetilado
95	No hipermetilado
96	Hipermetilado
97	No hipermetilado
98	Hipermetilado
99	No hipermetilado
100	Hipermetilado
101	Hipermetilado
102	No hipermetilado
103	Hipermetilado
104	No hipermetilado
105	No hipermetilado
106	No hipermetilado
107	No hipermetilado
108	No hipermetilado

1.2. Valor pronóstico de la hipermetilación del promotor del gen *RASSF1* en neuroblastoma y su asociación con regresión y diferenciación tumoral espontánea

Una vez determinado el estado de hipermetilación de *RASSF1* en el grupo de tumores neuroblásticos, quisimos analizar el valor pronóstico de este factor y la eventual relación entre supervivencia e hipermetilación de islas CpG asociadas al promotor del gen *RASSF1*.

En primer lugar, el análisis de supervivencia de Kaplan-Meyer para los 108 tumores neuroblásticos incluidos en esta Tesis Doctoral no reveló diferencias significativas, comprobándose que la supervivencia de los pacientes con *RASSF1* hipermetilado no fue significativamente diferente de la que aparecía en los pacientes con *RASSF1* no hipermetilado ($p=0,212$) (Figura 10 y Tabla 4).

Sin embargo, cuando se llevó a cabo el análisis de supervivencia teniendo en cuenta únicamente los casos correspondientes a pacientes no lactantes (niños mayores de 12 meses de edad en el momento del diagnóstico), se encontró que la hipermetilación del promotor del gen *RASSF1* se asociaba de forma estadísticamente significativa con una reducción de la supervivencia en estos pacientes ($p=0,032$) (Figura 11 y Tabla 5).

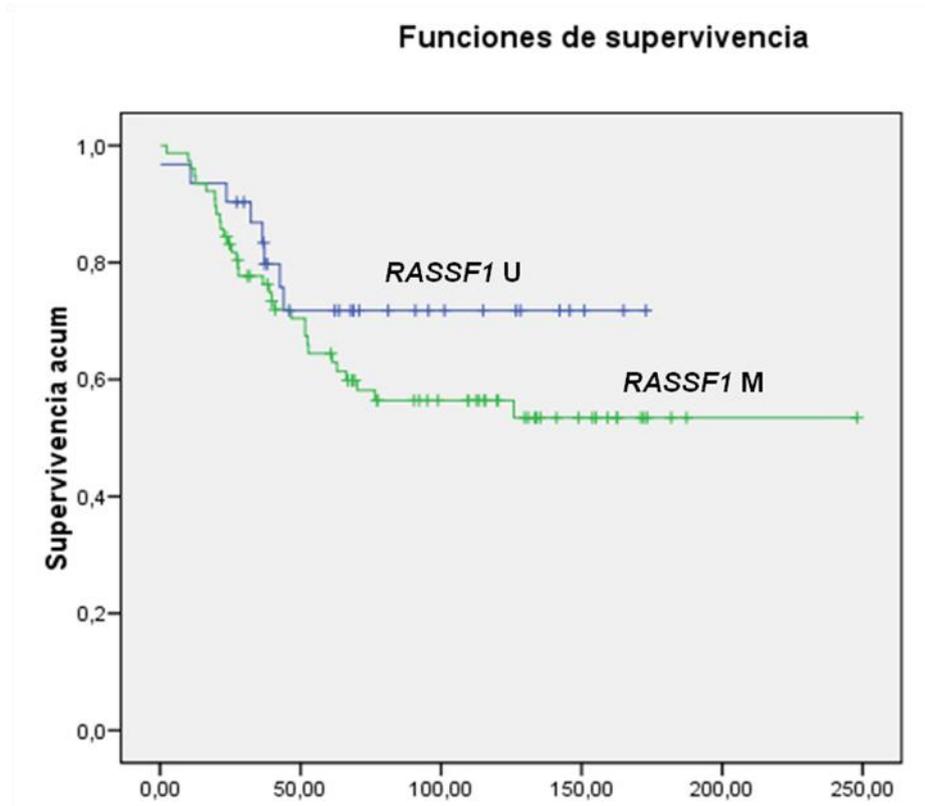


Figura 10. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meyer para los 108 casos incluidos en esta memoria, incluyendo pacientes lactantes y no lactantes. El eje X corresponde a meses de supervivencia de cada paciente, mientras que el eje Y corresponde al porcentaje de pacientes que permanecen vivos después de cada periodo de tiempo de supervivencia. U: gen no hipermetilado; M: gen hipermetilado.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,557	1	0,212

Tabla 4. Valores estadísticos de la prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de *RASSF1* (prueba *log-rank*) para los 108 casos. g.l.: grados de libertad. Sig.: valor de significación estadística *p*.

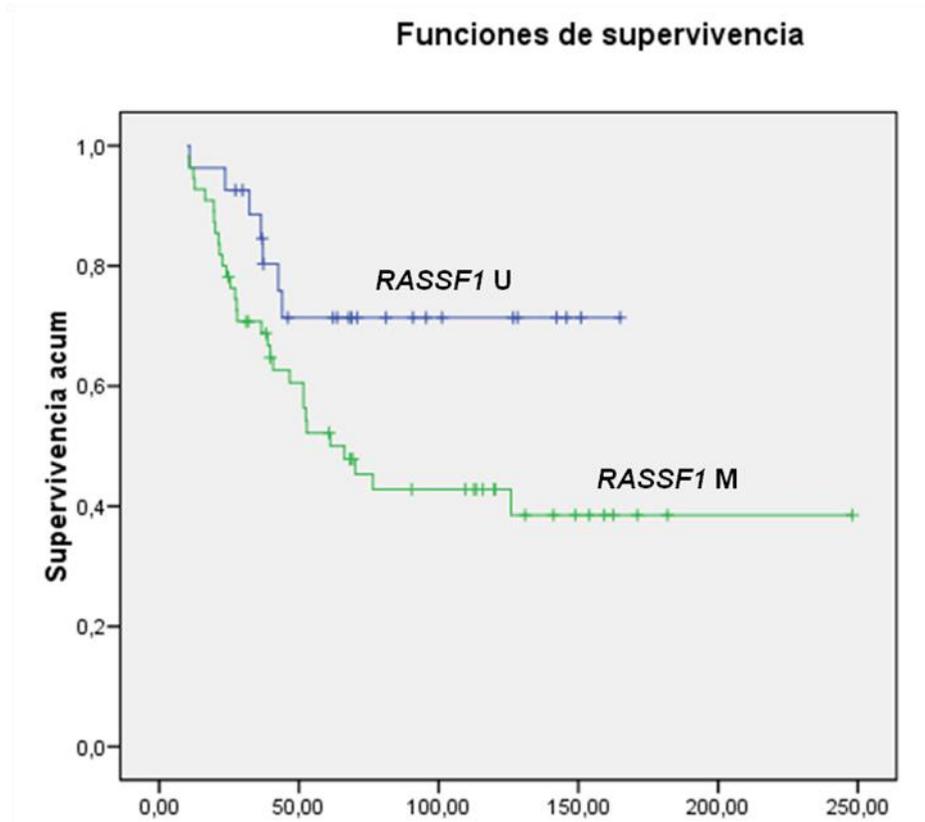


Figura 11. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meyer para los 82 pacientes mayores de 12 meses de edad (no lactantes) incluidos en esta Tesis Doctoral. El eje X corresponde a meses de supervivencia de cada paciente, mientras que el eje Y corresponde al porcentaje de pacientes que permanecen vivos después de cada periodo de tiempo de supervivencia. U: gen no hipermetilado; M: gen hipermetilado.

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	4,607	1	0,032

Tabla 5. Valores estadísticos de la prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para diferentes niveles de *RASSF1* (prueba *log-rank*) para los 82 pacientes mayores de 12 meses de edad al diagnóstico. g.l.: grados de libertad. Sig.: valor de significación estadística *p*.

1.3. Expresión del gen *RASSF1* en tumores neuroblásticos

Una vez efectuado el análisis de hipermetilación del promotor del gen *RASSF1* en tumores neuroblásticos humanos, se cuantificó la expresión de este gen mediante *microarray* para determinar la posible relación entre hipermetilación y silenciamiento génico en neuroblastoma.

Los resultados de este análisis en 99 tumores neuroblásticos y 9 muestras de médula ósea normal, mostraron que la expresión media del gen *RASSF1* en neuroblastoma fue de 1083,35 unidades fluorescentes (u.f.), siendo 1733,63 u.f. en ganglioneuroma y 1862,77 u.f. en médula ósea normal (Figura 12). Las diferencias fueron estadísticamente significativas tanto para la comparación de los niveles medios de expresión en neuroblastoma frente a médula ósea normal como para la comparación de la expresión en neuroblastoma frente a ganglioneuroma (Tabla 6). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de *RASSF1* entre distintos grupos clínicos de neuroblastoma (comparación de valores de expresión media entre tumores de distintos estadios INSS) (Tablas 7 y 8).

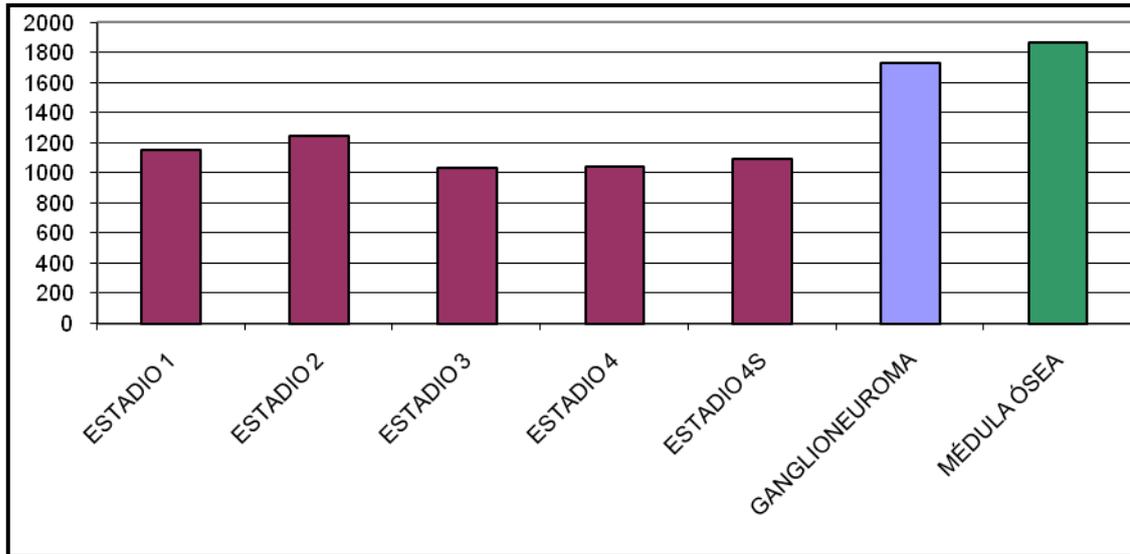


Figura 12. Expresión del ARN mensajero correspondiente al gen *RASSF1* determinada mediante análisis de microarray en 99 tumores neuroblásticos de diferentes estadios clínicos (neuroblastomas malignos de estadio 1, 2, 3, 4, 4S), tumores neuroblásticos benignos (ganglioneuromas) y médula ósea normal.

NB vs. GN	<i>RASSF1</i>	NB vs. M.O.	<i>RASSF1</i>	GN vs. M.O.	<i>RASSF1</i>
U de Mann-Whitney	40	U de Mann-Whitney	65	U de Mann-Whitney	35
W de Wilcoxon	4045	W de Wilcoxon	4070	W de Wilcoxon	90
Z	-4,703	Z	-4,127	Z	-,816
Sig. exacta	0,000	Sig. exacta	0,000	Sig. exacta	0,414

Tabla 6. Comparación estadística de valores medios de expresión del gen *RASSF1* utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney en neuroblastomas loco-regionales. Se muestran los resultados para la comparación de neuroblastomas de estadios 1, 2 y 3 entre sí. Los valores de significación estadística *p* se muestran en negrita (Sig. exacta), señalándose en rojo los valores estadísticamente significativos. NB: Neuroblastoma; GN: Ganglioneuroma; M.O.: Médula ósea normal.

NB 1 vs. 2	RASSF1	NB 2 vs. 3	RASSF1	NB 1 vs. 3	RASSF1
U de Mann-Whitney	22	U de Mann-Whitney	41	U de Mann-Whitney	20
W de Wilcoxon	32	W de Wilcoxon	96	W de Wilcoxon	75
Z	-0,453	Z	-1,488	Z	0
Sig. exacta	0,703	Sig. exacta	0,148	Sig. exacta	1,000

Tabla 7. Comparación estadística de valores medios de expresión del gen *RASSF1* utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney en neuroblastomas (NB) loco-regionales. Se muestran los resultados para la comparación de neuroblastomas de estadios 1, 2 y 3 entre sí. Los valores de significación estadística *p* se muestran en negrita (Sig. exacta).

NB loco-regional vs. NB 4	RASSF1
U de Mann-Whitney	577
W de Wilcoxon	1955
Z	-1,292
Sig. exacta	0,196

Tabla 8. Comparación estadística de valores medios de expresión del gen *RASSF1* entre el grupo de neuroblastomas loco-regionales (estadios 1, 2 y 3 de la INSS) y el grupo de tumores de estadio 4 utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Los valores de significación estadística *p* se muestran en negrita (Sig. exacta).

1.4. Inducción de la expresión génica en líneas celulares de neuroblastoma mediante tratamiento con 5-aza-2'-desoxi-citidina

El análisis mediante microarray de la línea celular de neuroblastoma LA1-5S mostró que la expresión de ARN correspondiente al gen *RASSF1* aumentó un 74,3% tras el tratamiento con el agente demetilante 5-aza-2'-desoxi-citidina, lo cual sugiere que *RASSF1* podría estar hipermetilado en líneas celulares de neuroblastoma (Figura 13).

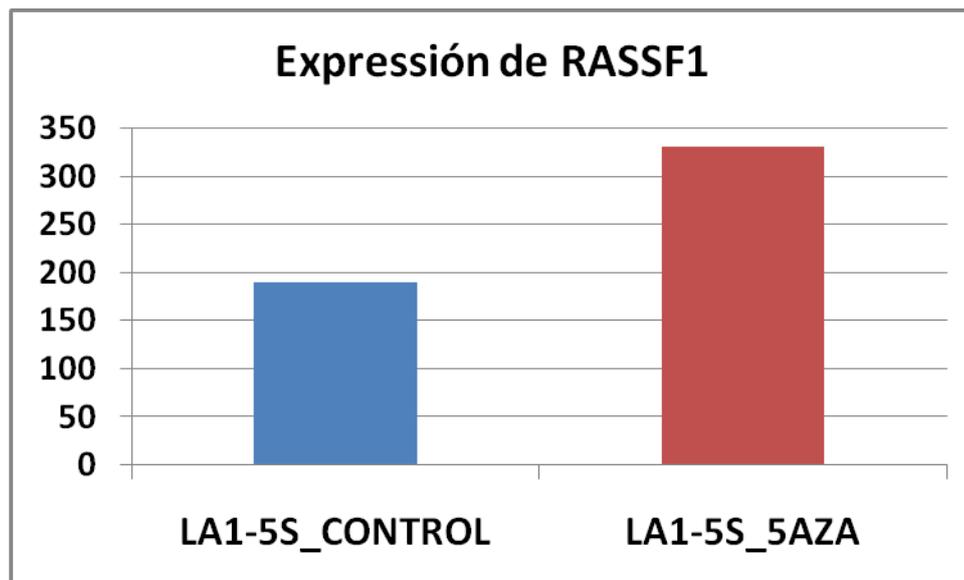


Figura 13. Expresión del ARNm del gen *RASSF1* en la línea celular de neuroblastoma LA1-5S determinada mediante microarray. Los valores de expresión corresponden a intensidad de fluorescencia del array de Affymetrix. LA1-5S_CONTROL: línea celular control. LA1-5S_5AZA: línea celular tratada con el agente desmetilante 5-aza-2'-desoxi-citidina.

2. EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL SISTEMA INMUNITARIO EN TUMORES NEUROBLÁSTICOS HUMANOS

En esta Tesis Doctoral, se utilizaron *microarrays* de oligonucleótidos de alta densidad para cuantificar la expresión de 424 genes o EST relacionados con el sistema inmunitario en tumores neuroblásticos. Para identificar aquellos genes o EST cuya expresión fuese significativamente mayor en uno de los dos grupos de tumores neuroblásticos establecidos en este trabajo respecto al otro grupo (Grupo 1 vs. Grupo 2), se calcularon valores de significación estadística p y de expresión media relativa (*fold-changes*) entre ambos grupos.

El resultado de este análisis reveló la existencia de 104 genes (25,4% del total de genes relacionados con el sistema inmune) cuya expresión fue significativamente superior en uno de los dos grupos comparados utilizando la prueba t de Student (Tabla 9).

Por otro lado, el análisis mostró que, en general, el grupo de tumores de bajo riesgo (Grupo 1) presentaba niveles de expresión génica muy superiores a los que se apreciaron en los tumores de alto riesgo, mientras que las líneas celulares del Grupo 3 (que no presentan ninguna célula del sistema inmune, sino únicamente células tumorales neuroblásticas) apenas expresaron algunos de estos genes.

A continuación, se presentarán los resultados del análisis de microarray para grupos de genes de especial relevancia en el sistema inmunitario humano.

2.1. Genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC o HLA)

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC o HLA) está regulado y controlado por un conjunto complejo de genes que codifican dos grupos básicos de proteínas: las del sistema tipo I (MHC-I) y las del sistema tipo II (MHC-II). El sistema MHC-I, a su vez, está constituido por una proteína o antígeno mayor alfa, que puede ser de varios tipos (A, B, E, F, G, J) y una proteína beta de pequeño tamaño denominada beta-2-microglobulina. Todas estas proteínas están codificadas en el ADN por un gran número de genes distintos, existiendo 33 genes/EST en el sistema de *microarray* utilizado en esta Tesis Doctoral.

De los 33 genes/EST relacionados con el sistema mayor de histocompatibilidad que se analizaron en este estudio (Figuras 14 y 15), 19 presentaron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (Grupo 1 y Grupo 2), estando todos ellos sobreexpresados en el Grupo de tumores de menor malignidad y mayor propensión a la diferenciación espontánea (Grupo 1).

Cuando se analizaron los 19 genes/EST que resultaron significativos, se pudo comprobar que 9 de ellos estaban relacionados con el sistema mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I), teniendo una expresión mínima en las líneas celulares de neuroblastoma. Uno de los genes incluidos en este grupo es *B2M*, que codifica la beta-2-microglobulina, estando también sobreexpresados en el Grupo 1 los genes *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-E*, *HLA-G* y *HLA-J* de la cadena alfa del MHC-I. De este modo, tanto las cadenas pesadas alfa como las cadenas ligeras beta del MHC-I se encontraban sobreexpresadas en tumores de buen

pronóstico (Grupo 1). Todos estos genes juegan un papel fundamental en la presentación de antígenos al sistema inmune, por lo que su expresión disminuida en tumores de elevado riesgo (Grupo 2) podría explicar por qué estos tumores son capaces de escapar a la vigilancia del sistema inmune y proliferar sin ningún obstáculo. Por el contrario, los tumores de bajo riesgo (Grupo 1) expresarían grandes cantidades de estas moléculas de reconocimiento celular, lo cual permitiría al sistema inmune reconocer a estas células y, a continuación, activar los mecanismos de defensa necesarios para destruirlas o inducir su diferenciación.

Junto a estos genes del sistema mayor de histocompatibilidad de clase I, encontramos que 10 genes/EST del sistema de histocompatibilidad clase II (MHC-II) se encontraron sobreexpresados en tumores del Grupo 1, incluyendo *HLA-DMA*, *HLA-DMB*, *HLA-DPA1*, *HLA-DPB1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRA* y *HLA-DRB1*. Por un lado, los genes *HLA-DMA* y *HLA-DMB* juegan un papel importante a la hora de facilitar la unión de los péptidos celulares a las moléculas del sistema de histocompatibilidad MHC-II. Por otro lado, los genes *HLA -DPA1*, *HLA-DPB1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRA* y *HLA-DRB1* llevan a cabo funciones específicas en la presentación de los péptidos a los linfocitos T CD4+. Por estos motivos, la sobreexpresión relativa de estos genes en los tumores neuroblásticos de bajo riesgo podría contribuir al reclutamiento de linfocitos T por parte de estos tumores.

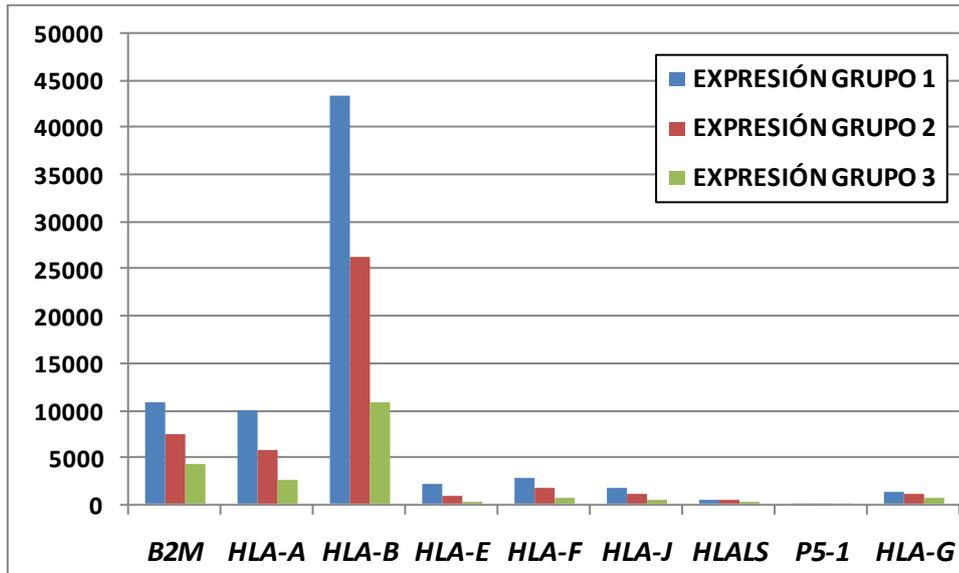


Figura 14. Expresión de algunos de los genes/EST relacionados con el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (HLA-I) en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

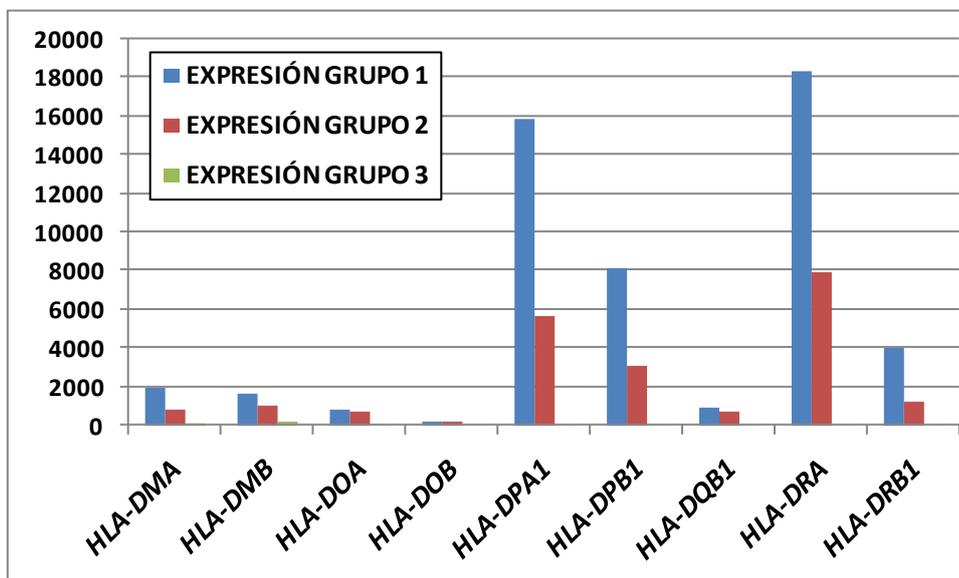


Figura 15. Expresión de algunos de los genes/EST relacionados con el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (HLA-II) en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

2.2. Genes relacionados con marcadores leucocitarios

El análisis de expresión de genes específicos de los leucocitos humanos reveló que, en general, los tumores de bajo grado y bajo nivel de malignidad (Grupo 1) presentaron mayor expresión de este tipo de marcadores que los tumores más agresivos (Grupo 2). Sin embargo, las diferencias no fueron tan acusadas como en el caso de los genes del sistema MHC, no alcanzando significación estadística en la mayoría de los casos. Los niveles medios de expresión en cada uno de los grupos y para cada gen/EST analizado en esta Tesis Doctoral se muestran en la Tabla 9 y, gráficamente, en las Figuras 16, 17, 18, 19, 20 y 21.

Del total de genes/EST relacionados con marcadores leucocitarios analizados en esta Tesis Doctoral, se encontró que 22 genes/EST mostraron diferencias significativas entre el Grupo 1 y el Grupo 2 de tumores neuroblásticos. De ellos, algunos genes/EST se encontraron sobreexpresados en el Grupo 1 (tumores de bajo grado de malignidad) respecto al Grupo 2 (tumores muy agresivos), incluyendo CD58 (marcador leucocitario), CD3E (marcador de linfocitos T), CD8A (marcador de linfocitos T citotóxicos) y CD69 (marcador de linfocitos B y T activados). Otros genes/EST cuya expresión fue significativamente mayor en el Grupo 1 de tumores son los marcadores de monocitos CD14, CD36L2, CD63 y CD9, el marcador de células *natural-killer* CD56 y el gen específico de timocitos CD1D. Todos estos resultados sugieren que la población leucocitaria podría ser superior o, en todo caso, más activa, en los tumores del Grupo 1 que en los del Grupo 2.

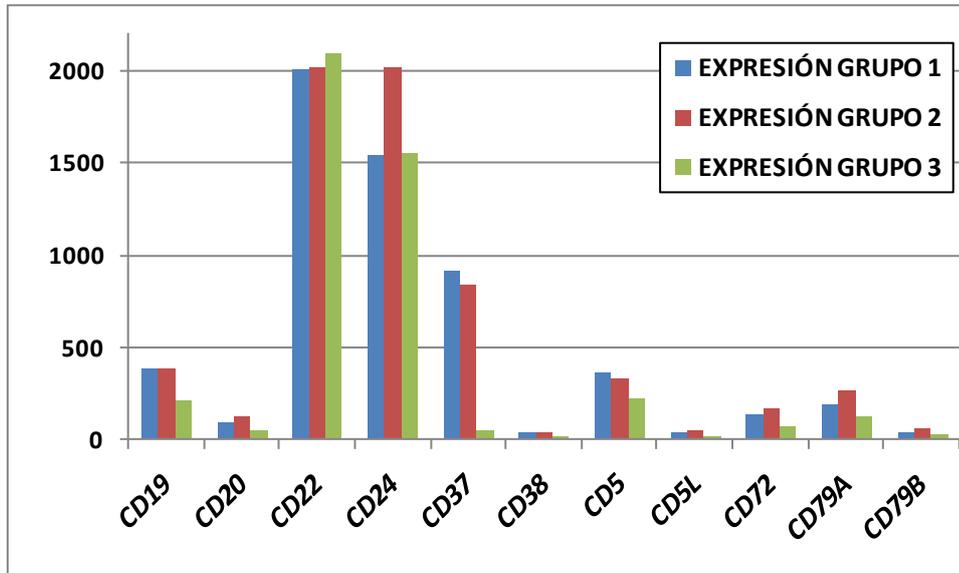


Figura 16. Expresión de algunos de los principales genes/EST utilizados como marcadores de linfocitos B en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

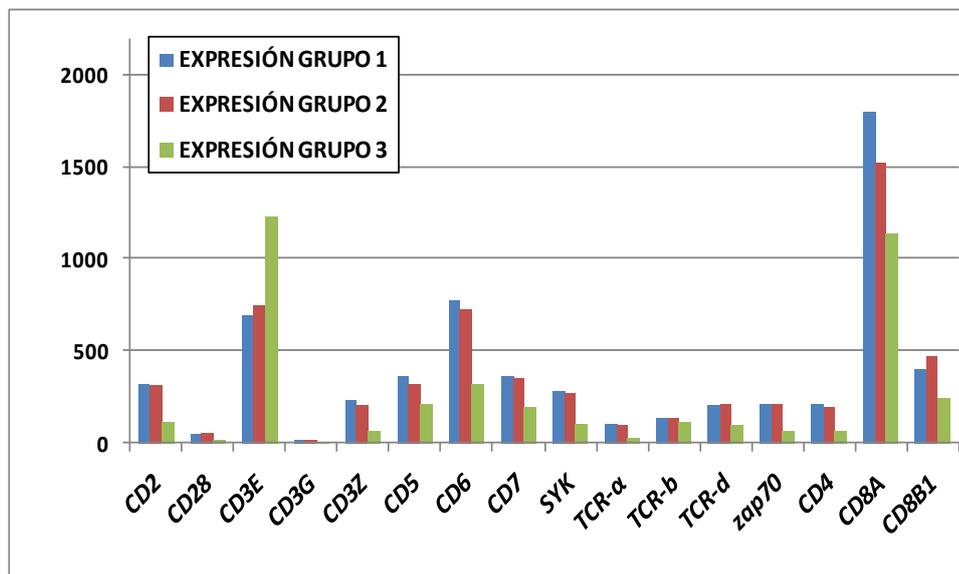


Figura 17. Expresión de algunos de los principales genes/EST utilizados como marcadores de linfocitos T en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

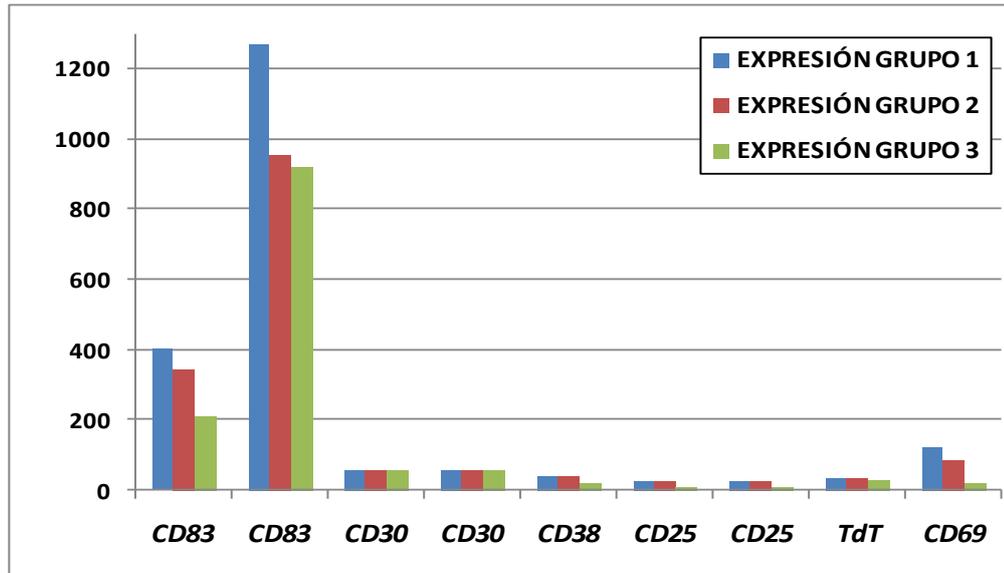


Figura 18. Expresión de algunos de los principales genes/EST utilizados como marcadores de activación linfocitaria B y T en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

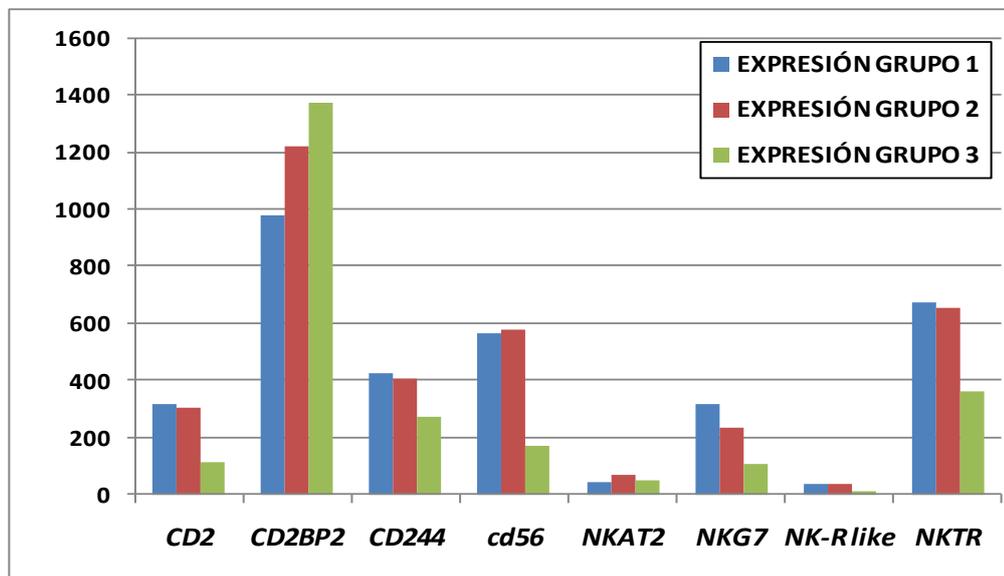


Figura 19. Expresión de algunos de los principales genes/EST utilizados como marcadores de células NK (*natural killer*) en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

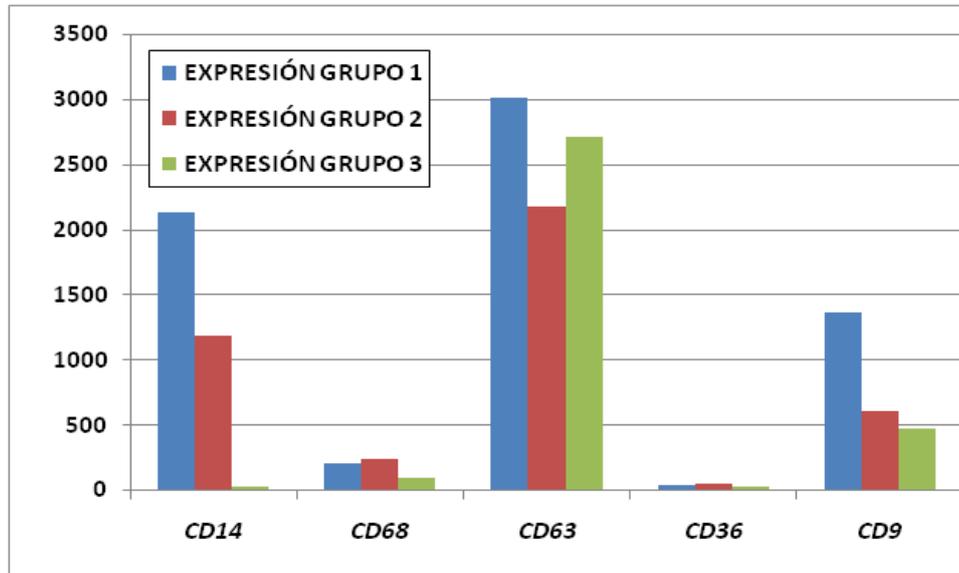


Figura 20. Expresión de algunos de los principales genes/EST relacionados con marcadores leucocitarios en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

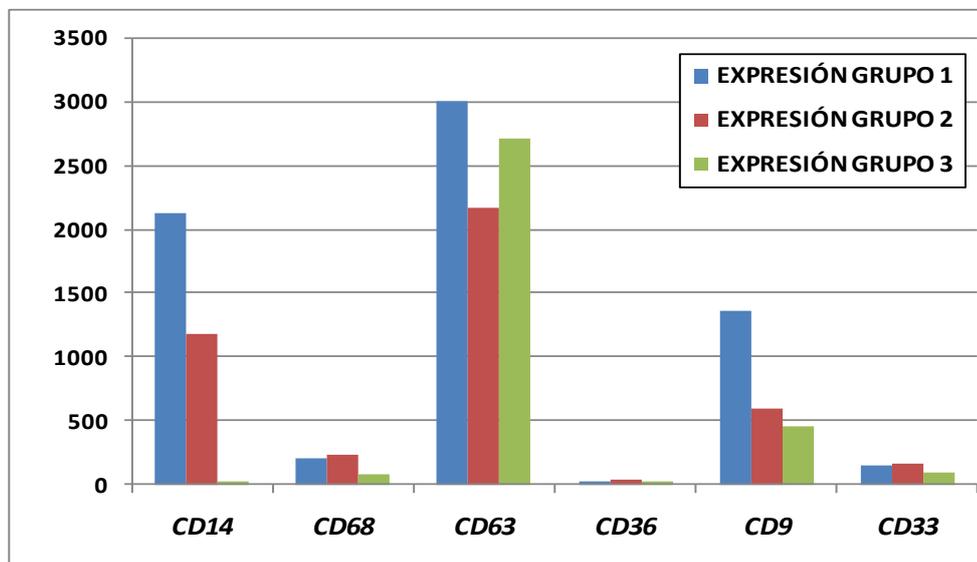


Figura 21. Expresión de algunos de los principales genes/EST relacionados con marcadores de monocitos-macrófagos en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

2.3. Genes relacionados con la expresión de citocinas y quimiocinas

La expresión de determinadas citocinas y quimiocinas juega un papel fundamental en la activación del sistema inmune por parte de los leucocitos y el resto de células que conforman este sistema. El análisis de expresión de algunos de los principales genes relacionados con la síntesis de citocinas y quimiocinas mostró 14 genes/EST diferencialmente expresados entre el Grupo 1 y el Grupo 2 de modo estadísticamente significativo (Tabla 9 y Figuras 22, 23, 24, 25 y 26), siendo mayor la expresión de 10 de estos genes en el Grupo 1 que en el Grupo 2. Entre éstos, destacan los genes de las citocinas GDF10 (miembro de la familia de genes TGF- β), SCYA2 (factor quimiotáctico de monocitos), SCYD1 (citocina D1, promueve la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular), SDF1 y SDF2 (factores quimiotácticos de linfocitos) y los receptores de citocinas CCR1, CCR9, CX3CR1 y CXCL16.

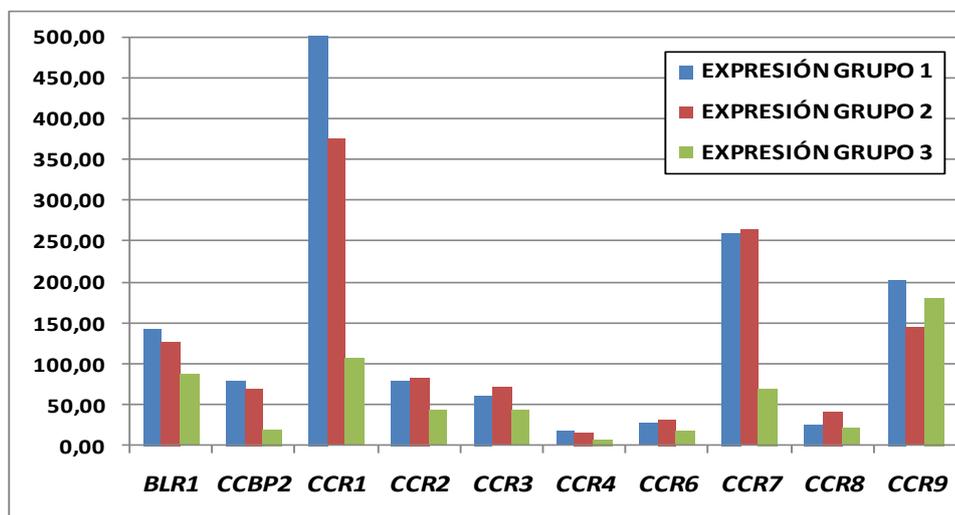


Figura 22. Expresión de algunos de los principales genes/EST relacionados con citocinas y quimiocinas en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

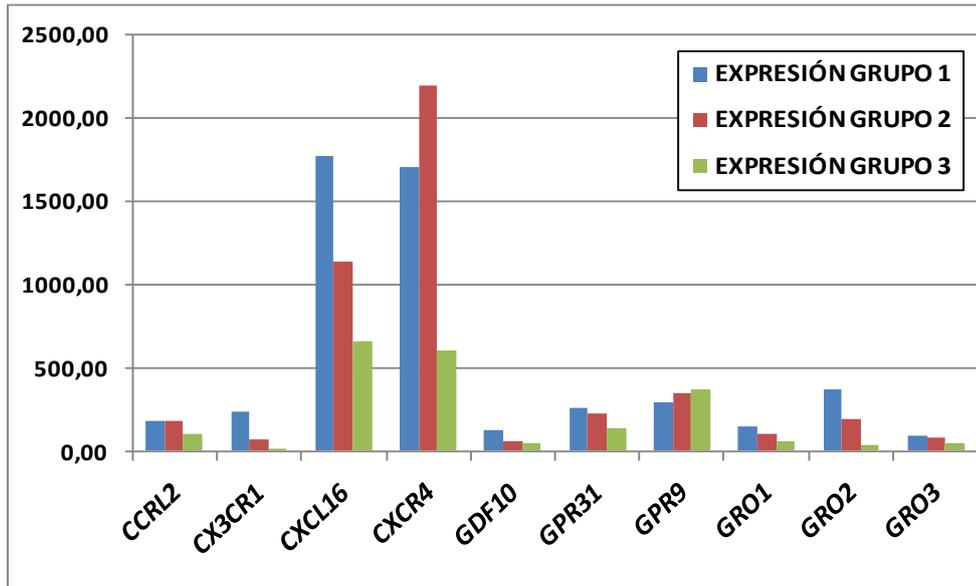


Figura 23. Expresión de algunos de los principales genes/EST relacionados con citocinas y quimiocinas en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

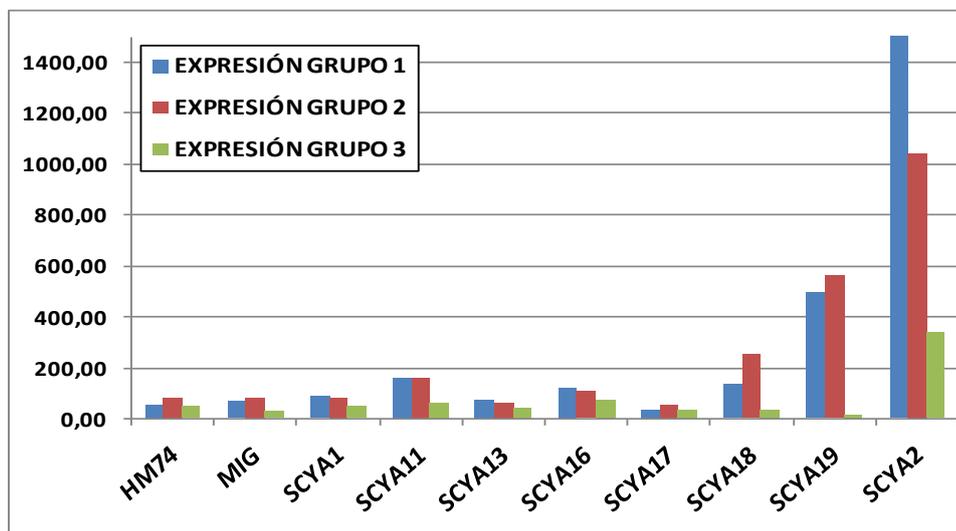


Figura 24. Expresión de algunos de los principales genes/EST relacionados con citocinas y quimiocinas en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

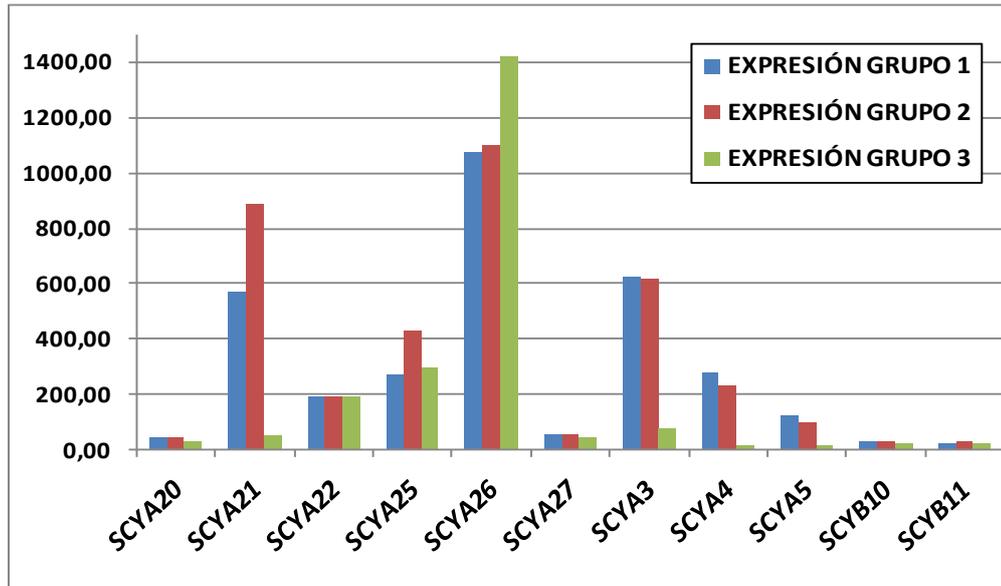


Figura 25. Expresión de algunos de los principales genes/EST relacionados con citocinas y quimiocinas en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

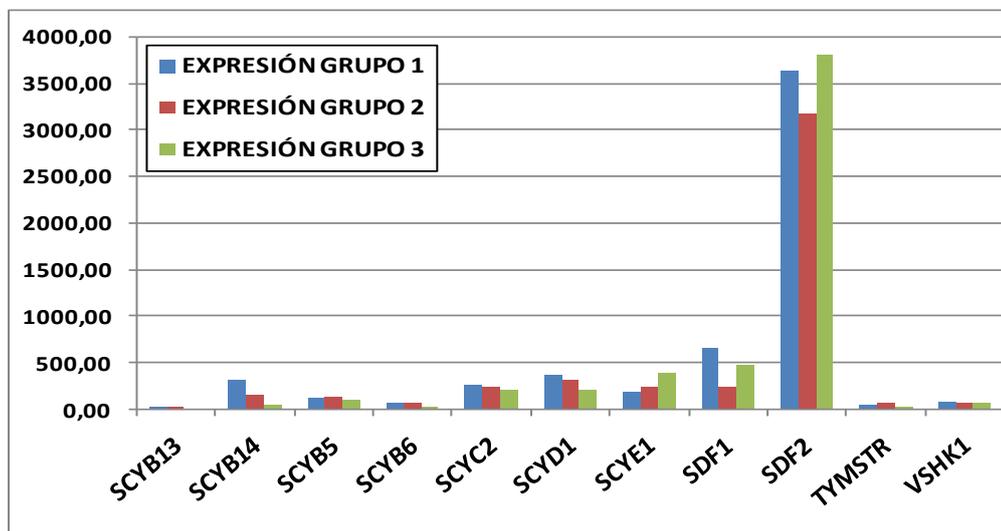


Figura 26. Expresión de algunos de los principales genes/EST relacionados con citocinas y quimiocinas en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

2.4. Genes que codifican para interferones y receptores de interferones

Como se muestra en la Tabla 9 y en las Figuras 27, 28 y 29, la expresión de numerosos genes relacionados con la síntesis de interferón o de los receptores de interferón fue mayor en uno de los grupos de estudio que en el resto de los grupos. En concreto, en lo que respecta a los genes de interferón, se encontró una mayor expresión de la mayor parte de estos genes en los tumores del Grupo 2 (mayor agresividad) que en los del Grupo 1 (menor agresividad), aunque las diferencias fueron mínimas en la mayor parte de los casos. Sin embargo, cuando se analizó la expresión de genes de los receptores de este mediador del sistema inmunitario, se comprobó que los tumores del Grupo 1 tendían a presentar mayores niveles de expresión que el resto de las muestras. Finalmente, el análisis de los genes inducibles por acción de interferón mostró de igual modo mayor expresión en el Grupo 1 que en los Grupos 2 y 3.

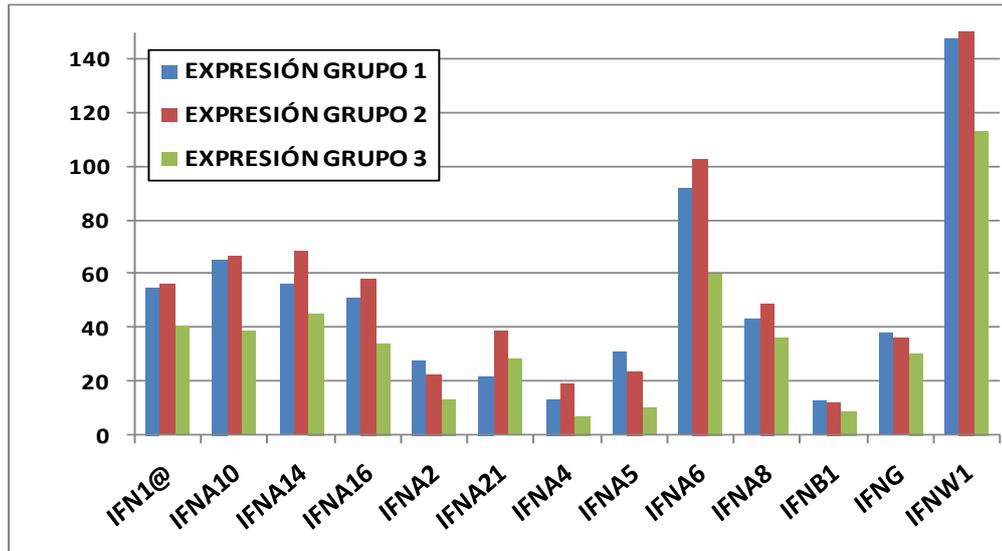


Figura 27. Expresión de algunos de los principales genes/EST relacionados con la síntesis de interferón en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

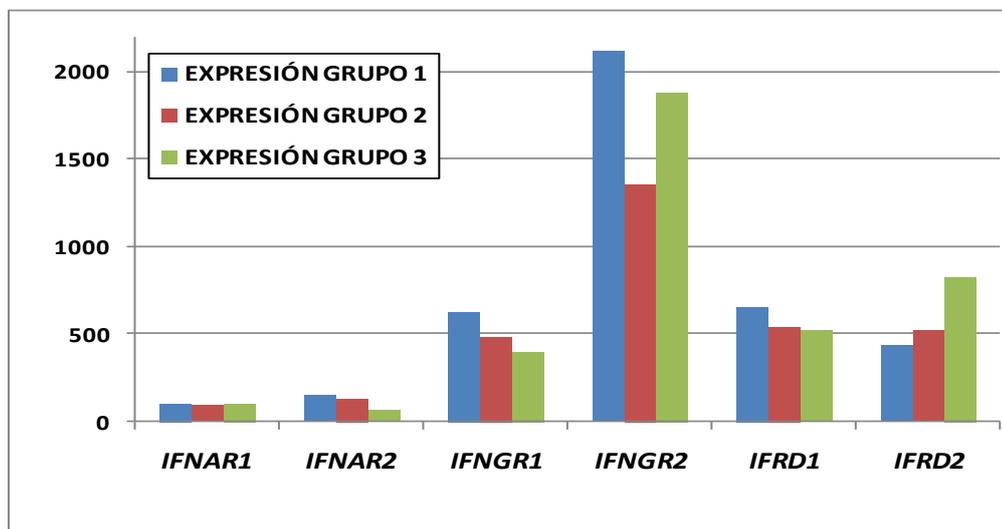


Figura 28. Expresión de algunos de los principales genes/EST relacionados con receptores de interferón en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

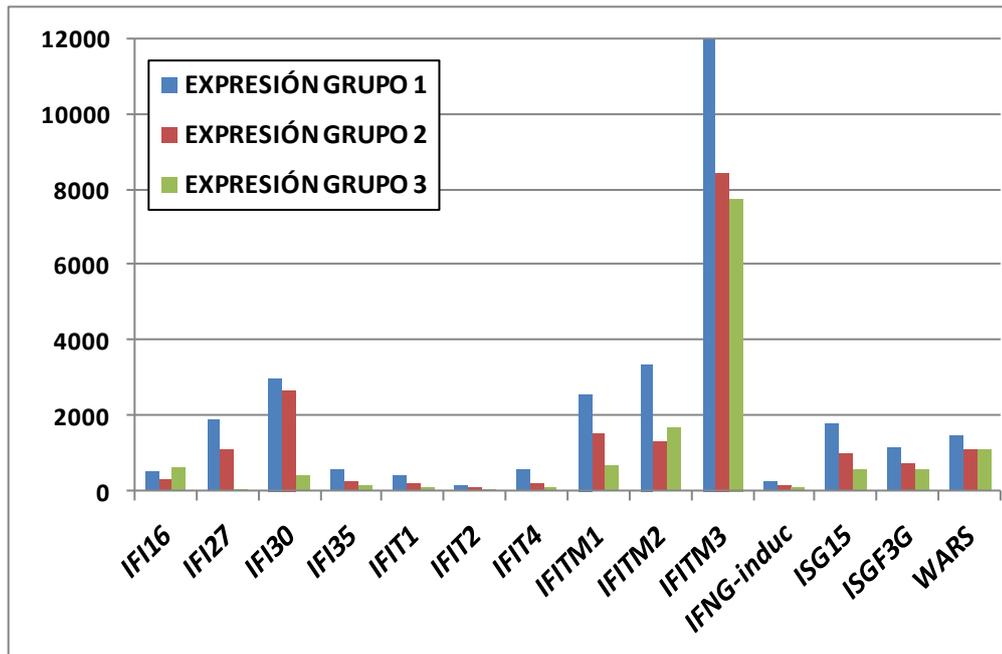


Figura 29. Expresión de algunos de los principales genes/EST relacionados con proteínas inducibles por la acción del interferón en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

2.5. Genes relacionados con la expresión de interleucinas y receptores de interleucinas

Como mediadoras de la respuesta inflamatoria, las interleucinas juegan un papel muy importante en la activación del sistema inmunitario. A este respecto, nuestro análisis mediante *microarrays* mostró una expresión significativamente mayor en el Grupo 1 del gen de la interleucina 6, así como de los receptores de las interleucinas 10, 11 y 13 y varios genes relacionados con la función de las interleucinas. Por otro lado, ciertos genes mostraron mayor expresión en el Grupo 2 de tumores, incluyendo las interleucinas 1α y 23α y el receptor de la interleucina 5. Estos resultados sugieren que la expresión de genes relacionados con las interleucinas podría ser específica de tejido, siendo diferente en los tumores más agresivos y en los menos agresivos. Estos resultados se muestran en la Tabla 9 y, se ilustran a modo de ejemplo en las Figuras 30 y 31.

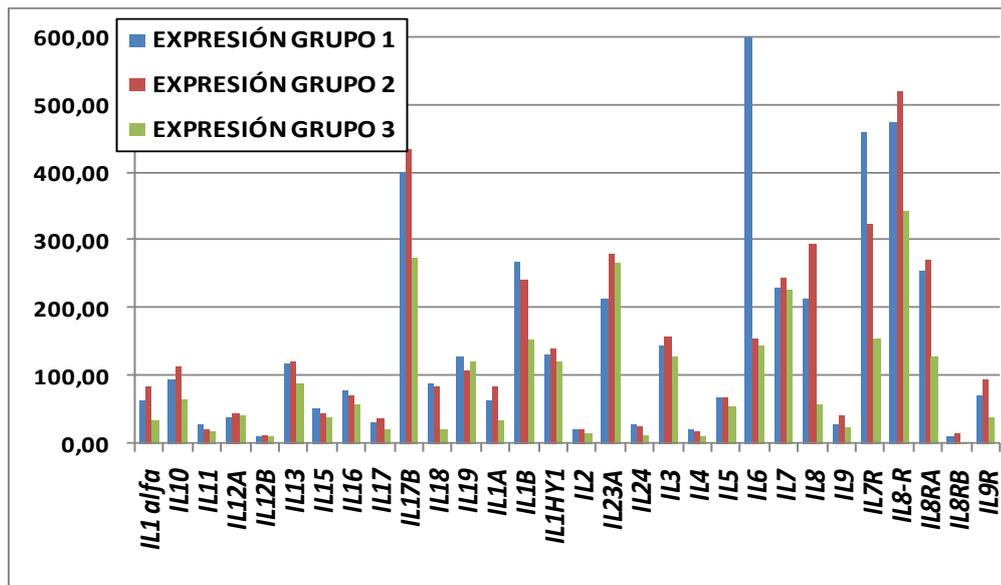


Figura 30. Expresión de algunos de los principales genes/EST que codifican para diferentes interleucinas en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

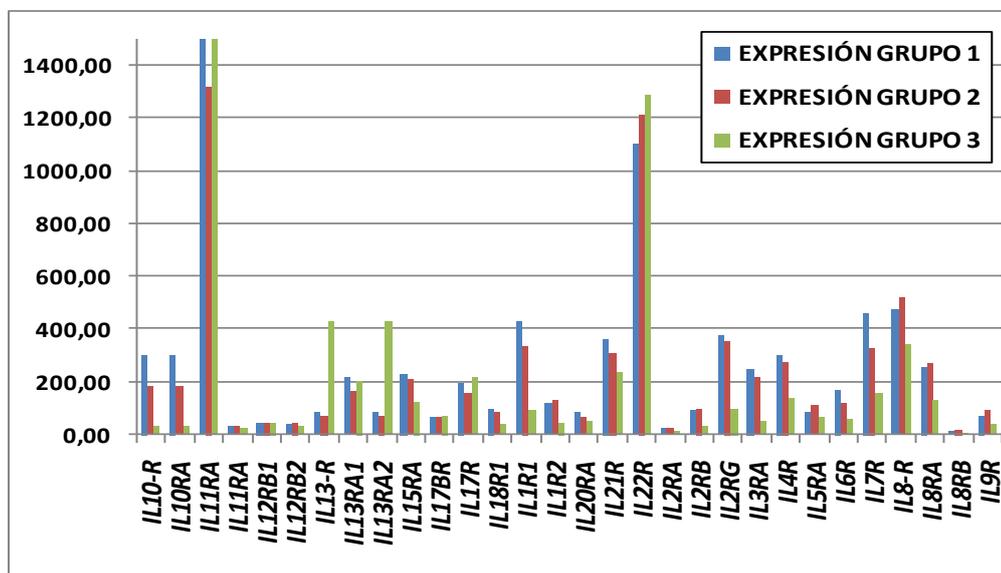


Figura 31. Expresión de algunos de los principales genes/EST relacionados con receptores de interleucinas en los tres grupos de muestras considerados en esta Tesis Doctoral. El eje vertical representa niveles de expresión en forma de unidades fluorescentes (Affymetrix).

DISCUSIÓN

Los tumores del sistema nervioso constituyen un grave problema de salud en todos los países, debido no sólo a su incidencia sino, además, a su elevada mortalidad (Ohgaki y Kleihues, 2005; Peris y Giner, 2006). En concreto, los tumores malignos del sistema nervioso periférico, especialmente los tumores neuroblásticos, presentan una elevada prevalencia en la edad pediátrica, siendo mucho menos frecuentes en el adulto. Sin embargo, la frecuencia de los tumores del sistema nervioso central, especialmente los gliomas, es muy elevada en la edad adulta.

Por un lado, los tumores derivados de la glía, especialmente los glioblastomas, presentan una incidencia de 3,5 casos por 100.000 habitantes al año, con una supervivencia del 42,4% a los 6 meses, 17,7% al año y 3,3% a los dos años del diagnóstico (Cairncross *et al.*, 1998; Ohgaki y Kleihues, 2005), lo cual los convierte en tumores frecuentes y muy agresivos. Por otro lado, el neuroblastoma constituye el tumor sólido maligno más frecuente en la infancia (Castleberry, 1997; Schwab *et al.*, 2003), presentando una mortalidad global superior al 50% cuando se aplican pautas intensivas de tratamiento quimio y radioterápico (Mora *et al.*, 2001; Brodeur y Maris, 2002; Oppenheimer *et al.*, 2003).

Diversos estudios sugieren que tanto los gliomas como los neuroblastomas podrían originarse a partir de las mismas células precursoras neuroectodérmicas (Ueki *et al.*, 1997). Sin embargo, aunque todos estos tumores podrían tener un origen común, los mecanismos genéticos y moleculares que dirigen la diferenciación celular a partir de las células ectodérmicas del tubo neural no son bien conocidos. Asimismo, se desconoce

el papel que podría jugar el sistema inmunitario del paciente en el control de la enfermedad neuroblástica establecida.

En su conjunto, los tumores neuroblásticos constituyen un conjunto muy heterogéneo de tumores desde un punto de vista clínico. Mientras algunos neuroblastomas tienden a diferenciarse y regresar espontáneamente, otros tumores muestran gran agresividad y capacidad de producir metástasis a distancia, especialmente al hueso, presentando una elevada mortalidad y muy mal pronóstico. Este comportamiento clínico tan diverso hace necesaria la búsqueda de nuevos marcadores biológicos, genéticos y moleculares que contribuyan a una mejor clasificación de los pacientes para una adecuada decisión terapéutica. En este sentido, el reciente desarrollo de las técnicas genéticas basadas en *chips de microarray* permite establecer perfiles de expresión génica global en todo tipo de muestras de origen humano, incluyendo los tumores neuroblásticos (Hessner *et al.*, 2006). Por otro lado, los análisis epigenéticos permiten evaluar el estado de activación o inactivación de determinados genes cuya función podría ser relevante en la génesis y la clasificación de los tumores neuroblásticos (Alaminos *et al.*, 2004). En esta Tesis Doctoral, se han utilizado ambos tipos de técnicas para determinar el papel que podrían jugar ciertos genes en el desarrollo y la progresión de los tumores neuroblásticos.

En primer lugar, es bien conocida la existencia de varios genes cuya hipermetilación a nivel de promotor se ha asociado a la aparición de tumores malignos o la progresión y extensión de éstos, incluyendo el neuroblastoma. Por ese motivo, en esta Tesis Doctoral se estudió el papel que la

hipermetilación epigenética del gen *RASSF1* podría jugar en neuroblastoma humano. Para ello, se realizó un análisis epigenético para determinar el estado de metilación del promotor de dicho gen mediante PCR específica de metilación (*MSP*) después de un periodo de incubación con bisulfito sódico. Diversos investigadores han demostrado que la hipermetilación de promotores genéticos está directamente relacionada con la estructura de la cromatina y la expresión génica (Robertson y Wolffe, 2000). En cáncer, la generación y el mantenimiento de los tumores se asocia a diversas alteraciones del perfil global de metilación génica, así como de la expresión génica en prácticamente todos los tipos de cáncer (Baylin *et al.*, 1998). De hecho, la hipermetilación de islas CpG asociadas al promotor de diversos genes parece asociarse específicamente a algunos tipos de cáncer y, lo que es más importante, puede utilizarse como predictor del comportamiento de estos tumores, constituyendo marcadores de subtipos específicos de cáncer (Uhlmann *et al.*, 2003). En este sentido, diversos estudios han demostrado una asociación específica entre algunos tipos de cáncer y determinados perfiles de metilación génica en glioma (Uhlmann *et al.*, 2003), neuroblastoma (Alaminos *et al.*, 2004 y 2005), carcinomas cutáneos (Murao *et al.*, 2006), cáncer colorrectal (Young y Jass, 2006) y otros muchos tumores.

Los resultados de nuestro estudio de las modificaciones epigenéticas del gen *RASSF1* en neuroblastoma demostraron que un elevado porcentaje de tumores presentaba hipermetilación del promotor de *RASSF1*. Curiosamente, nuestro análisis mostró que ninguno de los tumores neuroblásticos benignos (ganglioneuromas) incluidos en este estudio (tumores 104 a 108) presentaba

hipermetilación de este gen, siendo mayor el porcentaje de tumores hipermetilados en el grupo de neuroblastomas malignos de alto riesgo biológico.

Estos resultados sugieren que la hipermetilación del gen *RASSF1* podría jugar un papel relevante en la transformación maligna de los neuroblastos de la cresta neural del embrión y, por tanto, en la génesis del neuroblastoma. Del mismo modo, esta modificación epigenética parece estar relacionada con la ausencia de regresión espontánea en los tumores de alto grado, siendo ésta un hecho relativamente frecuente en los tumores de bajo grado. Además, nuestro estudio reveló que la expresión de ARN correspondiente a *RASSF1* fue significativamente más baja en neuroblastomas malignos que en tejidos neurales normales e incluso que en tumores neuroblásticos benignos (ganglioneuroma).

Por otro lado, el análisis de supervivencia en nuestro grupo general de tumores neuroblásticos mostró una tendencia no significativa hacia una mayor supervivencia en los tumores que no presentaban hipermetilación génica, siendo estadísticamente significativa la diferencia cuando se analizó exclusivamente el grupo de pacientes no lactantes (mayores de 12 meses de edad). Numerosos estudios previos (Mora y Gerald, 2004; Oppenheimer *et al.*, 2004) demostraron que los tumores neuroblásticos correspondientes a pacientes lactantes (menores de 12 meses de edad) presentan un pronóstico muy favorable en la mayoría de los casos, siendo significativamente peor en el caso de los pacientes mayores de 12 meses. Por este motivo, el hecho de que en nuestro estudio la hipermetilación de *RASSF1* se asociara a una

disminución significativa de la supervivencia en pacientes mayores de 12 meses de edad, nos permite contribuir a elaborar una previsión pronóstica en este grupo de pacientes de pronóstico incierto. Aunque la hipermetilación de este gen no parece jugar un papel pronóstico relevante en pacientes lactantes, la previsión pronóstica no suele constituir un problema en este tipo de pacientes en los que el pronóstico siempre es más favorable que en pacientes de mayor edad. Si estos resultados fuesen validados en una cohorte independiente de pacientes, sugerimos que el estado de metilación del gen *RASSF1* se podría utilizar en el futuro como factor pronóstico en niños afectos de neuroblastoma, especialmente en niños de edades avanzadas.

Por otro lado, nuestros hallazgos abren la puerta a la posibilidad de que este tipo de tumores sean tratados utilizando terapias demetilantes, incluyendo el tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina u otros fármacos similares. Este tipo de terapia ya ha sido propuesta para otras enfermedades en las que existe hipermetilación de genes relevantes (Cheng *et al.*, 2004). Por otro lado, el reciente desarrollo de sistemas de *micorarray* para detección de perfiles globales de hipermetilación de islas CpG asociadas a promotores génicos permitirá establecer el nivel de metilación génica global en todo tipo de tumores humanos, incluyendo los neuroblastomas (Chen *et al.*, 2003) y descubrir otros genes cuya inactivación epigenética pudiese jugar un papel relevante en neuroblastoma.

En segundo lugar, y una vez analizado el valor pronóstico de la inactivación epigenética de *RASSF1*, en este trabajo hemos llevado a cabo un estudio de expresión génica global mediante *microarrays* de oligonucleótidos en una gran

cohorte de tumores neuroblásticos con objeto de identificar perfiles de expresión génica para distintos grupos y estadios clínicos de neuroblastoma y ganglioneuroma. De este modo, cuando analizamos concretamente los **genes relacionados con el sistema inmunitario**, comprobamos que existían diferencias estadísticamente significativas entre los tumores de bajo riesgo (Grupo 1 de estudio) y los tumores de alto riesgo (Grupo 2). En concreto, numerosos genes del sistema inmunitario mostraron una expresión significativamente superior en los tumores de bajo grado, aquéllos que tienden a remitir espontáneamente o tras la aplicación de tratamientos quirúrgicos o quimioterapéuticos suaves, siendo muy escasa su expresión en los tumores de alto grado (Grupo 2), es decir, los tumores de elevada mortalidad incluso tras la aplicación de tratamientos intensivos multimodales (Mora *et al.*, 2001) y en las líneas celulares (Grupo 3).

De este modo, se comprobó que, por un lado, los tumores de bajo grado (Grupo 1) mostraron mayor expresión de genes relacionados con el **complejo mayor de histocompatibilidad** (MHC o HLA) que las muestras de los Grupos 2 y 3. Este hecho podría explicar por qué los neuroblastomas de alto grado (Grupo 2 de estudio) son capaces de escapar a la vigilancia del sistema inmunitario y, por tanto, progresar y extenderse tanto localmente como a distancia (Wolfl *et al.*, 2005). Por el contrario, los tumores de bajo grado (Grupo 1) conservarían la expresión de marcadores de superficie celular, lo cual facilitaría el reconocimiento de estas células por parte del sistema inmunitario y, por tanto, el control de los neuroblastos neoplásicos por parte de los linfocitos y las células *natural-killer*. Curiosamente, este mismo fenómeno se

aprecia tanto para los genes del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I), incluyendo el gen de la beta-2-microglobulina, como para los del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) analizados en este estudio. Estudios previos ya sugirieron que ciertos neuroblastomas podrían escapar al sistema de vigilancia inmunitaria mediante la represión de ciertas proteínas relacionadas con el reconocimiento autoinmune (Raffaghello *et al.*, 2004).

Junto con los genes del sistema de histocompatibilidad humana, en esta Tesis Doctoral se analizaron diversos genes que actúan como marcadores de leucocitos humanos. Los resultados de este análisis sugieren que los tumores del Grupo 1 de estudio podrían contener una mayor población leucocitaria que los tumores del Grupo 2 ó que, en todo caso, la población leucocitaria del Grupo 1 podría ser más activa que la del Grupo 2. Sin embargo, las diferencias de niveles de expresión génica determinados mediante microarray no fueron tan acusadas como en el caso de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad, dándose el caso de que ciertos genes (por ejemplo, *CD24* y *CD72*) se encontraron más expresados en los tumores más agresivos (Grupo 2) que en los menos agresivos (Grupo 1). Probablemente, este fenómeno sugiere que el papel del sistema inmunitario en neuroblastoma es complejo y multifactorial, siendo posible que distintas células del sistema inmunitario jueguen distintos papeles en tumores agresivos y en tumores autolimitados.

Cuando se analizaron los genes correspondientes a las distintas subpoblaciones leucocitarias existentes en las muestras analizadas en esta Tesis Doctoral, se comprobó que algunos genes presentaban mayor expresión

en uno de los grupos de estudio respecto a los otros grupos. Por un lado, nuestros resultados demostraron que la expresión de algunos genes relacionados con la función de los **linfocitos B** fue superior en los tumores de bajo riesgo (Grupo 1) que en los de alto riesgo (Grupo 2), incluyendo *CD5* y *CD37*, por ejemplo. Sin embargo, otros genes mostraron mayor expresión en el Grupo 2, como es el caso de *CD19* y *CD20*, por ejemplo. En el mismo sentido, ciertos genes correspondientes a **linfocitos T** presentaron mayor expresión en uno de los grupos de estudio, ya fuese el Grupo 1 (genes *CD4*, *CD8*, *4-1BB*, *CD2* y *CD6*, por ejemplo) o en el Grupo 2 (entre otros, *CD28*). De nuevo, estos resultados sugieren que el papel del sistema inmunitario podría ser diferente en cada tipo de tumor, expresándose ciertos genes en los tumores más agresivos y otros genes diferentes en los tumores de mejor pronóstico. Entre todos estos genes, destacan *CD4*, marcador de linfocitos Th (*helper* o colaboradores) y *CD8*, marcador de linfocitos Tc (citotóxicos). El papel que juega la expresión de todos estos genes en la regresión y diferenciación espontánea de los tumores neuroblásticos aún no ha sido aclarado. Además de todo lo expuesto hasta ahora, nuestro análisis mostró que algunos genes de **activación linfocitaria** (*CD83*, *CD38*, *TdT* y *CD69*) se encontraban más expresados en los tumores menos agresivos (Grupo 1) que en los más agresivos (Grupo 2). De este modo, se podría afirmar que la población linfocitaria existente en los tumores de menor grado podría presentar mayores niveles de activación funcional que los tumores más agresivos y, por tanto, podrían participar en la regresión y diferenciación tumoral espontánea que experimentan muchos tumores del Grupo 1.

Las consecuencias de estos hallazgos son muy relevantes desde un punto de vista clínico. Por un lado, la posible infiltración tumoral por linfocitos B existente en los tumores del Grupo 1 podría estar relacionada con una eventual producción de anticuerpos por parte de estas células, los cuales contribuirían a la destrucción del tumor vía humoral y a su eventual regresión espontánea. Por otro lado, la infiltración de los tumores de bajo grado por linfocitos T, tanto colaboradores como citotóxicos, contribuiría de forma directa a la acción citotóxica sobre las células tumorales y, por tanto, a la regresión tumoral por un mecanismo directo (Feinmesser *et al.*, 2004). La regresión tumoral espontánea y la diferenciación celular hacia neuroblastos no tumorales, serían, por tanto, procesos mediados por la acción de los linfocitos B y T que, a su vez, vendría determinada por la mayor expresión de antígenos de histocompatibilidad en la superficie de los tumores de bajo riesgo (Grupo 1).

Todo ello estaría en consonancia con los datos de expresión génica correspondiente a dos grupos muy importantes de leucocitos: las células matadoras o *natural killer* y los monocitos-macrófagos, ambos con función citotóxica directa. Por un lado, ciertos marcadores de células *natural killer* se encontraron sobreexpresados en el Grupo 1 de tumores neuroblásticos (entre otros, CD2, NKG7 y NKTR). Por otro, CD9, CD14 y CD63, genes característicos de monocitos y macrófagos, mostraron mayor expresión en el grupo de tumores de menor agresividad (Grupo 1). Estos resultados sugieren que, de nuevo, los tumores de menor grado podrían presentar mayor infiltración por células del sistema inmunitario o que, en todo caso, las células

existentes en este tipo de tumores podrían ser funcionalmente más activas que en los tumores más agresivos (Grupo 2).

Por otra parte, en esta Tesis Doctoral quisimos cuantificar la expresión de distintos mediadores del sistema inmunitario en neuroblastoma, incluyendo citocinas y quimiocinas, interferones e interleucinas. Todos estos mediadores juegan un papel fundamental en la activación y la regulación del sistema inmunitario humano.

En general, las citocinas son proteínas que regulan la función de las células que las producen o de otros tipos celulares. Las citocinas son los agentes responsables de la comunicación intercelular, induciendo la activación de receptores específicos de la membrana celular para activar la proliferación y la diferenciación celular, así como las funciones de quimiotaxis, crecimiento y secreción de inmunoglobulinas. Concretamente, las citocinas encargadas de inducir quimiotaxis de ciertas células diana, son las denominadas quimiocinas.

En su mayor parte, las citocinas son segregadas por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polinucleares, células endoteliales, epiteliales y del tejido conjuntivo (Vergara, 1996). Según la célula que las produzca se denominan linfocinas (linfocito), monocinas (monocitos) o interleucinas (células hematopoyéticas) (Gallin y Snyderman, 1999; Janeway et al., 1999; Roitt et al., 2002).

Se denomina interleucinas a un conjunto de proteínas que son sintetizadas y expresadas por los leucocitos (de ahí el término *-leukin*), y por los histiocitos y que tienen como función la intercomunicación entre las distintas

subpoblaciones leucocitarias, participando en la respuesta del sistema inmunitario. Las interleucinas constituyen, en general, un conjunto de proteínas solubles de bajo peso molecular que ejercen una función mediadora del crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación, entre otras actividades (Hernández y Alvarado, 2001). Las interleucinas suelen intervenir en todas las reacciones inmunes del organismo, activando o desactivando células del sistema inmunológico y actuando como mediadores en los procesos inflamatorios o como factores estimuladores de colonias de células precursoras de la sangre. Existen distintos tipos de interleucinas, entre las que destacan, entre muchas otras, la IL-1 (pirógeno endógeno que aumenta la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular), la IL-2 (proteína que facilita la proliferación de los linfocitos T activados) y la IL-3 (que facilita el crecimiento de las células madre pluripotenciales de la médula ósea).

En este contexto, el análisis de los tumores neuroblásticos incluidos en este estudio reveló que numerosos genes relacionados con citocinas y quimiocinas mostraron mayor expresión en uno de los grupos de estudio (Grupo 1 ó Grupo 2), estando poco expresados en el resto de las muestras analizadas. Concretamente, los genes que codifican para las citocinas CCR1, CCR8, CCR9, CX3CR1, CXCL16, GDF10, SCYA17 (factor quimiotáctico de linfocitos T), SCYA2 (factor quimiotáctico de monocitos), SCYA25 (factor inductor del desarrollo de linfocitos T), SCYD1, SCYE1, SDF1 (factor quimiotáctico de linfocitos) y SDF2 se encontraron más expresados en el grupo de tumores menos agresivos (Grupo 1) que en el grupo de tumores de mayor malignidad (Grupo 2). Estos datos, junto con la mayor expresión de marcadores

leucocitarios que encontramos en las muestras del Grupo 1, sugieren una mayor activación del sistema inmune en los tumores menos agresivos que en los neuroblastomas más malignos, lo cual podría explicar por qué estos tumores presentan una mayor tendencia a remitir espontáneamente.

En el mismo sentido, nuestro análisis mostró que los genes que codifican para interleucinas y receptores de interleucinas se expresaron a diferentes niveles en los diferentes grupos de muestras analizadas en esta Tesis Doctoral. En concreto, se pudo apreciar una mayor expresión de interleucina 6 en los tumores del Grupo 1 y una mayor expresión de otras interleucinas en el Grupo 2. En lo que respecta a los receptores, algunos de estos genes se encontraron más expresados en los tumores menos agresivos, siendo mayor la expresión de otros receptores en los tumores de mayor agresividad. Estos resultados indicarían que la expresión de genes de interleucinas podría ser específica de tejido, pudiendo jugar un papel relevante en la diferenciación celular inducida en los tumores de bajo grado o incluso en el mantenimiento del fenotipo maligno en los tumores de alto grado. Será necesario llevar a cabo estudios en una cohorte mayor de tumores para clarificar este punto.

Finalmente, nuestro análisis demostró que algunos genes relacionados con los interferones se encontraban más expresados en el grupo de muestras de mayor malignidad, mientras que otros genes se expresaron de modo cuantitativamente superior en los tumores menos agresivos. El interferón se describió originariamente como una glicoproteína sintetizada por las células humanas que habían sido previamente infectadas por un virus y que era capaz de proteger a dichas células frente a la infección por un segundo tipo de virus,

impidiendo la replicación de ácidos nucleicos virales en el interior de las células humanas. Estas moléculas del sistema inmunitario se pueden clasificar en tres familias: tipo α o interferón de los leucocitos, tipo β o interferón de los fibroblastos, y el tipo γ o interferón de los linfocitos. Su efectividad biológica es tan elevada que bastaría una concentración de interferón de 3×10^{-14} M para que éste fuese efectivo *in vivo*. En general, el interferón es capaz de llevar a cabo diversas acciones biológicas relacionadas con el sistema inmune, entre las cuales destacamos las siguientes (Almenteros *et al.*, 1999):

- Inhibe la proliferación celular.
- Estimula la actividad citotóxica linfocítica.
- Estimula la actividad fagocítica y tumoricida de los macrófagos.
- Estimula la expresión de antígenos de superficie.

Las propiedades antitumorales del interferón fueron descritas por Kurt Paucker ya en 1962, y hoy se conoce que estas sustancias actúan fundamentalmente por un doble mecanismo de acción (Jonson y Baron, 1976; Petska, 1983; Strander, 1983): un efecto antiproliferativo directo y un efecto inmunomodulador.

Concretamente, nuestro análisis de *microarray* demostró que la mayor parte de los interferones se expresaron preferentemente en el Grupo 2 (tumores más agresivos), mientras que los receptores de interferones y las proteínas inducibles por acción de interferón se encontraron más expresados en los tumores del Grupo 1 (menos agresivos). Estos resultados podrían indicar que, al tener mayor número de receptores de interferón, los tumores con mayor

tendencia a la involución espontánea serían más sensibles a la acción inmunomoduladora del interferón, incluyendo la acción inductora de la citotoxicidad por parte de los linfocitos infiltrantes del tumor.

Por todo lo indicado hasta ahora, podríamos concluir que el sistema inmunitario presenta mayor nivel de activación en los tumores del Grupo 1. Probablemente, la mayor presencia de marcadores de superficie tipo MHC en estos tumores podría inducir el reconocimiento de estas células, una vez transformadas, por parte de los leucocitos del propio individuo, lo cual provocaría una infiltración leucocitaria del tumor por linfocitos T, monocitos y células *natural-killer*, con función citotóxica para los neuroblastos malignos. A su vez, estas células producirían una elevada cantidad de citocinas y quimiocinas, las cuales estimularían la atracción quimiotáctica de nuevas células del sistema inmunitario, así como la activación de éstas para destruir las células malignas. Finalmente, las células del tumor, así como la población leucocitaria infiltrante, producirían elevadas cantidades de interleucinas de distinto tipo y de receptores de interferones, los cuales harían a estas células más sensibles a la acción citotóxica de las células infiltrantes. Todo ello desembocaría en la destrucción de los neuroblastos malignos por parte de las células del sistema inmune.

Por el contrario, las células de los tumores neuroblásticos más agresivos (Grupo 2 de estudio) podrían escapar a la vigilancia autoinmune de los leucocitos circulantes mediante una reducción de la producción de marcadores MHC de superficie. De este modo, las células inmunitarias no serían capaces

de reconocer estas células malignas y, por tanto, no infiltrarían estos tejidos para inducir su destrucción y/o diferenciación celular.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, pueden emitirse las siguientes **Conclusiones**:

1. Los análisis llevados a cabo mediante **PCR específica de metilación (MSP)** demostraron que el gen *RASSF1* se encuentra silenciado epigenéticamente en el 71,3% de los tumores neuroblásticos analizados. Estos resultados demuestran que la hipermetilación de *RASSF1* es un fenómeno frecuente en los tumores neuroblásticos humanos.

2. En general, existe una tendencia no significativa hacia una **mayor mortalidad** en los pacientes portadores de modificaciones epigenéticas del gen *RASSF1*. Cuando se consideran únicamente los pacientes mayores de 12 meses de edad al diagnóstico, la hipermetilación del promotor del gen *RASSF1* se asocia a una reducción estadísticamente significativa de la supervivencia, lo cual indica que el estado de metilación de este gen podría utilizarse como marcador pronóstico en pacientes mayores de 12 meses de edad afectados de neuroblastoma.

3. La determinación de los niveles de expresión de los genes relacionados con el **complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II** mediante microarrays de oligonucleótidos demostró que los tumores neuroblásticos de alto grado y elevada agresividad clínica presentaban menor expresión de estos genes que los tumores de mejor pronóstico clínico. Estos resultados sugieren que los tumores más agresivos podrían escapar al control del sistema inmunitario mediante una menor producción de marcadores de superficie de

tipo I y de tipo II, lo cual dificultaría el reconocimiento de estas células por las células encargadas de la vigilancia inmunitaria.

4. El análisis de expresión de **marcadores leucocitarios** demostró que los tumores con tendencia a la diferenciación y regresión espontánea, esto es, los tumores de menor agresividad clínica, presentaron mayores niveles de expresión de numerosos marcadores de leucocitos, linfocitos T, monocitos y células *natural-killer* que los tumores de mayor agresividad. Estos datos indican que la población de células del sistema inmune con función citotóxica podría ser mayor en los tumores menos agresivos y, por tanto, podrían ser los responsables de la regresión y la diferenciación tumoral espontánea que experimentan estos tumores.

5. La expresión de numerosas **citocinas, interleucinas e interferones** fue específica de cada tipo de tejido, encontrándose una mayor expresión de algunos de estos genes en los tumores de baja agresividad y de otros genes en los tumores de alta agresividad. En general, la mayor expresión de ciertas citocinas quimiotácticas de leucocitos en tumores con tendencia a la regresión espontánea podría explicar la mayor infiltración leucocitaria que podría existir en este tipo de tumores. Por otro lado, y aunque los tumores más agresivos tendieron a expresar numerosos genes de interferones, la mayor expresión de receptores de interferón en los tumores de bajo grado contribuiría a explicar la tendencia a la regresión espontánea que experimentan estos tejidos.

REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

1. Alaminos M, Davalos V, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M. Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(16):1208-19.
2. Alaminos M, Davalos V, Ropero S, Setien F, Paz MF, Herranz M, Fraga MF, Mora J, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M. EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma. *Cancer Res.* 2005;65(7):2565-71.
3. Alaminos M, Gerald WL, Cheung NK. Prognostic value of MYCN and ID2 overexpression in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2005;45(7):909-15.
4. Alaminos M, Mora J, Cheung NK, Smith A, Qin J, Chen L, Gerald WL. Genome-wide analysis of gene expression associated with MYCN in human neuroblastoma. *Cancer Res.* 2003;63(15):4538-46.
5. Almenteros C, Santiago T, González JM, Rodríguez J. Interferón y cáncer de mama avanzado. *Rev Cubana Oncol* 1999;15(2):89-94.
6. Ambros IM, Zellner A, Roald B, Amann G, Ladenstein R, Printz D, *et al.* Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *New Engl J Med* 1996; 334 (23):1505-11.
7. Ambros PF, Ambros IM, Strehl S, Bauer S, Luegmayr A, Kovar H, *et al.* Regression and progression in neuroblastoma, Does genetics predict tumor behavior? *Eur J Cancer* 1995;31A: 510-15.
8. Attiyeh EF, London WB, Mossé YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, McGrady PW, Seeger RC, Look AT, Shimada H, Brodeur GM, Cohn SL, Matthay KK, Maris JM; Children's Oncology Group. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Nov 24;353(21):2243-53.
9. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998;72:141-96.
10. Beckwith JB, Perrin EV. In-situ neuroblastoma: its contribution to the natural history of neural crest tumors. *Am J Pathol* 1963;43: 1089-104.
11. Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* Philadelphia (PA): Lippincott; 2002. p. 895-937.
12. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F. Revisions of the international criteria for

- neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993;11:1466-77.
13. Brodeur MB. Clinical and biological aspects of neuroblastoma. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer*. New York (NY): McGraw-Hill; 2002. p. 751–72.
 14. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1473–9.
 15. Castleberry RP. Neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997;33:1430-7.
 16. Chen CM, Chen HL, Hsiau TH, Hsiau AH, Shi H, Brock GJ, et al. Methylation target array for rapid analysis of CpG island hypermethylation in multiple tissue genomes. *Am J Pathol* 2003;163:37–45.
 17. Cheng JC, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Liang G, Xu GL, Hu YG, Marquez VE, Jones PA. Continuous Zebularine Treatment Effectively Sustains Demethylation in Human Bladder Cancer Cells. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(3): 1270–1278.
 18. Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of neural crest lineages. *Cancer Res* 1989;49:219–25.
 19. D'Angio GJ, Evans AE, Koop CE. Special pattern of widespread neuroblastoma with a favorable prognosis. *Lancet* 1971;1:1046-9.
 20. Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, Wiewrodt BR, Ho R, Ikegaki N, et al. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res* 2001;61:1314–9.
 21. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225–9.
 22. Esteller, M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol* 2003;4:351–8.
 23. Evans AE, Gerson J, Schnauffer L. Spontaneous regression of neuroblastoma. *Natl Cancer Inst Monogr* 1976;44:49–54.
 24. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001; 97(1): 14-32.
 25. Feinmesser M, Okon E, Schwartz A, Kaganovsky E, Hardy B, Aminov E, Nageris B, Sulkes J, Feinmesser R. Histologic and immunohistochemical characterization of tumor and inflammatory infiltrates in oral squamous cell carcinomas treated with local

- multikine immunotherapy: the macrophage at the front line. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2004;261(7):359-68.
26. Gallin J, Snyderman R (eds). *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates.* 3rd edition, Philadelphia, Lippincott William and Wilkins, 1999.
27. Harden SV, Sanderson H, Goodman SN, Partin AA, Walsh PC, Epstein JI, *et al.* Quantitative GSTP1 methylation and the detection of prostate adenocarcinoma in sextant biopsies. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1634–7.
28. Hasegawa R, Tatematsu M, Imaida K, Murasaki G, Ito N, Watanabe I, Nakazato M. Neuroblastoma in situ. *Acta Pathol Jpn.* 1982;32(3):537-46.
29. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-54.
30. Hernández MA, Alvarado A. Interleucinas e inmunidad innata. *Rev Biomed* 2001; 12(4): 272-280.
31. Hernando E, Nahlé Z, Juan G, Diaz-Rodriguez E, Alaminos M, Hemann M, Michel L, Mittal V, Gerald W, Benezra R, Lowe SW, Cordon-Cardo C. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature.* 2004;430(7001):797-802.
32. Hessner MJ, Liang M, Kwitek AE. The application of microarray analysis to pediatric diseases. *Pediatr Clin North Am.* 2006;53(4):579-90.
33. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nature Med* 1995;1(3):249-55.
34. Janeway CA *et al.* (eds). *Immunobiology. The immune system in Health and Disease,* 4th edition, New York, Garland, 1999.
35. Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Oliveira J, Lopes C, Nelson WG, *et al.* Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1747–52.
36. Johnson H.M. Baron S: Interferon effects on the immune response and the mechanism of activation of the celular response. *C.R.C. Rev. Biochim* 1976;4,203-27.
37. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21:163–7.

38. Lopez RD, Waller EK, Lu PH, Negrin RS. CD58/LFA-3 and IL-12 provided by activated monocytes are critical in the in vitro expansion of CD56+ T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2001;49(12):629-40.
39. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, *et al.* Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cisretinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* 1999;341:1165–73.
40. Modlich O, Prisack HB, Bojar H. Breast cancer expression profiling: the impact of microarray testing on clinical decision making. *Expert Opin Pharmacother.* 2006;7(15):2069-78.
41. Mora J, Cheung NK, Chen L, Qin J, Gerald W. Loss of heterozygosity at 19q13.3 is associated with locally aggressive neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7(5):1358-61.
42. Mora J, Cheung NK, Kushner BH, *et al.* Loss of Heterozygosity on chromosome arm 1p correlates with clinical categories of neuroblastoma. *J Mol Diagn* 2000, 2:37-46.
43. Mora J, Cheung NK, Kushner BH, LaQuaglia MP, Kramer K, Fazzari M, Heller G, Chen L, Gerald WL. Clinical categories of neuroblastoma are associated with different patterns of loss of heterozygosity on chromosome arm 1p. *J Mol Diagn.* 2000;2(1):37-46.
44. Mora J, Cheung NKV, Juan G, Illei P, Cheung I, Chi S, Ladanyi M, Cordon-Cardo C and Gerald WL. Schwannian cells of neuroblastoma are derived from a tumoral cell progenitor. *Cancer Res* 61: 6892-6898, 2001.
45. Mora J, Gerald WL, Cheung NK. Evolving significance of prognostic markers associated with new treatment strategies in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2003;197(1-2):119-24.
46. Mora J, Gerald WL, Qin J, Cheung NK. Molecular genetics of neuroblastoma and the implications for clinical management: a review of the MSKCC experience. *Oncologist* 2001;6:263–8.
47. Mora J, Gerald WL, Qin J, Cheung NK. Molecular genetics of neuroblastoma and the implications for clinical management: a review of the MSKCC experience. *Oncologist.* 2001;6(3):263-8.
48. Mora J, Gerald WL. Origin of neuroblastic tumors: clues for future therapeutics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004;4(3):293-302

49. Mora J, Lavarino C, Alaminos M, Cheung NK, Ríos J, de Torres C, Illei P, Juan G, Gerald WL. Comprehensive analysis of tumoral DNA content reveals clonal ploidy heterogeneity as a marker with prognostic significance in locoregional neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46(4):385-96.
50. Murao K, Kubo Y, Ohtani N, Hara E, Arase S. Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas: frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways. *Br J Dermatol*. 2006;155(5):999-1005.
51. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med* 2000; 28 (Suppl):N3-12.
52. Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005;64:479-489.
53. Oppenheimer O, Alaminos M, Gerald WL. Genomic medicine and neuroblastoma. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:39–54
54. Peris Bonet R, Giner Ripoll B. Incidencia y supervivencia del cáncer en la infancia. En: F Antillon, E Bernaola, A Patiño, L Sierrasesumaga (Eds). *Tratado de Oncología pediátrica*. Madrid: Pearson Educación; 2006. p. 1-15.
55. Petska S: Purificación y fabricación de interferones humanos. *Investigación y Ciencia* 1983;85:18-25.
56. Raffaghello L, Prigione I, Airoidi I, Camoriano M, Levreri I, Gambini C, Pende D, Steinle A, Ferrone S, Pistoia V. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia*. 2004;6(5):558-68.
57. Reynolds ML, Woolf. Reciprocal Schwann cell-axon interactions. *Curr Opin Neurobiol* 1993;3:683-93.
58. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet*. 2000;1(1):11-9.
59. Roitt I et al. (eds.) *Immunology*. 5th edition, London, Mosby, 2002.
60. Ross RA, Biedler JL, Spengler BA. A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Lett* 2003;197:35–9.
61. Ross RA, Spengler BA, Domenech C, Porubcin M, Rettig WJ, Biedler JL. Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth Differ* 1995;6:449–56.

62. Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Fehse N, Hero B, *et al.* Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med* 2002;346:1047-53.
63. Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 2003;4:472-80.
64. Shao JY, Yu Y, Dustin ML. A model for CD2/CD58-mediated adhesion strengthening. *Ann Biomed Eng.* 2005;33(4):483-93.
65. Shimada H. Tumors of the neuroblastoma group. In: Pathology: State of the art reviews, R. Williams, ed., Philadelphia, Pa, Hanley & Belfus, Inc., 1993;2:43-59.
66. Strander H: Tratamiento de enfermedades malignas con interferón ALPHA humano. Memorias del primer seminario cubano sobre interferón, La Habana, 1983:383-390.
67. Su WT, Alaminos M, Mora J, Cheung NK, La Quaglia MP, Gerald WL. Positional gene expression analysis identifies 12q overexpression and amplification in a subset of neuroblastomas. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;154(2):131-7.
68. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, *et al.* Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2000;6:529–35.
69. Ueki K, Ramaswamy S, Billings SJ, Mohrenweiser HW, Louis DN. ANOVA, a putative astrocytic RNA-binding protein gene that maps to chromosome 19q13.3. *Neurogenetics* 1997;1:31–6.
70. Uhlmann K, Rohde K, Zeller C, Szymas J, Vogel S, Marczynek K, Thiel G, Nurnberg P, Laird PW. Distinct methylation profiles of glioma subtypes. *Int J Cancer.* 2003;106(1):52-9.
71. van Noesel MM, van Bezouw S, Salomons GS, Voute PA, Pieters R, Baylin SB, *et al.* Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DCR1 and DCR2 is associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Res* 2002;62: 2157–61.
72. van Noesel MM, van Bezouw S, Voute PA, Herman JG, Pieters R, Versteeg R. Clustering of hypermethylated genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:226–33.
73. Vela E. Oncología pediátrica. En: Cruz M (Ed.), Tratado de Pediatría. 8ª edic. Madrid: Ergon, 2000.
74. Vergara VJC. Quimiocinas. *Alergia e Inmunol Pediatr* 1996; 5(6): 193-197.
75. Wolff M, Jungbluth AA, Garrido F, Cabrera T, Meyen-Southard S, Spitz R, Ernestus K, Berthold F. Expression of MHC class I, MHC class II, and cancer

germline antigens in neuroblastoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54(4):400-6.

76. Young J, Jass JR. The case for a genetic predisposition to serrated neoplasia in the colorectum: hypothesis and review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(10):1778-84.

TABLA SUPLEMENTARIA

Tabla 9: Genes relacionados con el sistema inmunitario que mostraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación del grupo de tumores de bajo riesgo frente al grupo de tumores de alto riesgo. Se muestra el nivel de expresión para cada uno de los grupos de estudio (1, 2 y 3), así como para las muestras de médula ósea humana normal. El valor P corresponde al nivel de significación estadística para el test paramétrico t de Student para la comparación de los grupos 1 frente a 2. La columna “FC 1/2” corresponde al *fold-change* o expresión relativa del Grupo 1 respecto del Grupo 2

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
MHC-I	34644_at	B2M	beta-2-microglobulin	10914,35	7487,23	1,46	0,0004	4273,93	21950,53
MHC-I	41237_at	HLA-A	Heavy chain that associates with beta 2-microglobulin; forms MHC class I complex that binds peptides to present them to CTLs	9997,13	5768,39	1,73	0,0003	2501,43	30651,09
MHC-I	57280_f_at	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	43402,77	26384,07	1,65	0,0004	10780,91	160440,40
MHC-I	32321_at	HLA-E	Nonclassical MHC I molecule; associates with beta 2-microglobulin	2047,01	985,78	2,08	0,0004	180,24	5012,40
MHC-I	37421_f_at	HLA-F	Human leukocyte antigen-F, class I protein of the major histocompatibility complex	2731,45	1798,95	1,52	0,0005	682,17	7426,84
MHC-I	37420_i_at	HLA-F	Human leukocyte antigen-F, class I protein of the major histocompatibility complex	1933,69	1212,79	1,59	0,0071	129,35	7894,87
MHC-I	40369_f_at	HLA-F	Human leukocyte antigen-F, class I protein of the major histocompatibility complex	1829,60	1396,70	1,31	0,0013	785,59	4973,98
MHC-I	55400_at	HLA-F	Human leukocyte antigen-F, class I protein of the major histocompatibility complex	298,96	275,45	1,09	0,4034	204,58	485,01
MHC-I	35017_f_at	HLA-J	major histocompatibility complex, class I, J (pseudogene)	1660,68	1093,84	1,52	0,0006	443,57	5386,98
MHC-I	51470_s_at	HLALS	MHC class I-related molecule; has a peptide-binding domain	322,16	273,76	1,18	0,1511	225,48	547,19
MHC-I	42812_g_at	HLALS	MHC class I-related molecule; has a peptide-binding domain	84,96	110,46	0,77	0,0870	79,38	78,41
MHC-I	34425_at	HLALS	MHC class I-related molecule; has a peptide-binding domain	478,72	459,48	1,04	0,5502	311,25	520,86
MHC-I	42811_at	HLALS	MHC class I-related molecule; has a peptide-binding domain	239,30	283,01	0,85	0,2022	399,88	285,58
MHC-I	34427_g_at	HLALS	MHC class I-related molecule; has a peptide-binding domain	73,79	63,80	1,16	0,3054	52,65	104,68
MHC-I	34426_at	HLALS	MHC class I-related molecule; has a peptide-binding domain	132,93	134,87	0,99	0,8702	65,49	118,97
MHC-I	33320_at	P5-1	MHC class I region ORF	33,10	35,61	0,93	0,6938	19,02	107,11
MHC-I	40370_f_at	HLA-G	Nonclassical MHC I molecule; inhibits NK function	1341,76	1016,55	1,32	0,0057	567,51	4224,57
MHC-II	37344_at	HLA-DMA	Alpha chain of a heterodimer associated with MHC class II molecules; facilitates the binding of peptides to MHC class II molecules	1951,40	855,18	2,28	0,0002	132,79	5111,17
MHC-II	41609_at	HLA-DMB	Beta chain of a heterodimer associated with MHC class II molecules; facilitates the binding of peptides to MHC class II molecules	1683,80	1009,64	1,67	0,0003	254,91	3856,26

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
MHC-II	31467_at	HLA-DOA	Alpha chain of MHC class II molecule; contains alpha 1 and alpha 2 domains	46,95	62,62	0,75	0,121	26,28	50,24
MHC-II	33967_at	HLA-DOA	Alpha chain of MHC class II molecule; contains alpha 1 and alpha 2 domains	791,05	715,73	1,11	0,1033	459,92	968,72
MHC-II	38570_at	HLA-DOB	Beta subunit of MHC class II molecule (Ia antigen); complex binds peptides and presents them to CD4+ T lymphocytes	178,65	194,11	0,92	0,643	69,26	691,48
MHC-II	54984_at	HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	224,59	111,39	2,02	0,0006	57,88	515,83
MHC-II	91041_at	HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	15880,04	5619,93	2,83	0,0002	435,19	27373,22
MHC-II	38096_f_at	HLA-DPB1	Beta 1 chain of HLA-DP subunit of MHC class II molecule (Ia antigen); complex binds peptides and presents them to CD4+ T lymphocytes	4743,73	1921,53	2,47	0,0002	128,49	14358,61
MHC-II	38095_i_at	HLA-DPB1	Beta 1 chain of HLA-DP subunit of MHC class II molecule (Ia antigen); complex binds peptides and presents them to CD4+ T lymphocytes	8133,83	3073,72	2,65	0,0001	320,46	21617,46
MHC-II	36878_f_at	HLA-DQB1	Highly similar to A class II molecule beta chain (Ia antigen) (murine H2-Ab1); may bind and present peptides to CD4+ T lymphocytes; contains an immunoglobulin (Ig) domain	1168,15	499,46	2,34	0,0001	50,23	2929,6
MHC-II	36877_at	HLA-DQB1	Highly similar to A class II molecule beta chain (Ia antigen) (murine H2-Ab1); may bind and present peptides to CD4+ T lymphocytes; contains an immunoglobulin (Ig) domain	41,25	36,96	1,12	0,4936	26,58	44,7
MHC-II	77151_at	HLA-DQB1	Highly similar to A class II molecule beta chain (Ia antigen) (murine H2-Ab1); may bind and present peptides to CD4+ T lymphocytes; contains an immunoglobulin (Ig) domain	902,85	729,86	1,24	0,06	878,36	628,74
MHC-II	37039_at	HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	18344,55	7910,69	2,32	0	231,31	47942,09
MHC-II	75284_f_at	HLA-DRB1	Beta 1 chain of HLA-DR; complex binds peptides and presents them to CD4+ T lymphocytes	64120,82	20129,57	3,19	0	1682,81	125687,07
MHC-II	41723_s_at	HLA-DRB1	Beta 1 chain of HLA-DR; complex binds peptides and presents them to CD4+ T lymphocytes	4007,26	1280,96	3,13	0,0001	22,82	8175,36
MHC-II	54906_r_at	HLA-DRB1	Beta 1 chain of HLA-DR; complex binds peptides and presents them to CD4+ T lymphocytes	67,93	49,8	1,36	0,1581	47,94	71,76

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Linfocitos B	1096_g_at	CD19	CD19 antigen	256,40	314,96	0,81	0,2686	122,53	3903,11
Linfocitos B	1116_at	CD19	CD19 antigen	377,31	380,93	0,99	0,8663	209,61	567,43
Linfocitos B	1096_g_at	CD19	CD19 antigen	256,40	314,96	0,81	0,2686	122,53	3903,11
Linfocitos B	40749_at	CD20	CD20 antigen	46,70	85,16	0,55	0,4460	16,62	1234,40
Linfocitos B	619_s_at	CD20	CD20 antigen	90,72	127,47	0,71	0,4498	43,90	949,89
Linfocitos B	38521_at	CD22	CD22 antigen	503,02	516,70	0,97	0,7639	319,88	1573,68
Linfocitos B	38522_s_at	CD22	CD22 antigen	35,87	55,90	0,64	0,2297	29,89	543,11
Linfocitos B	52277_at	CD22	CD22 antigen	999,72	1029,06	0,97	0,7676	629,64	3234,24
Linfocitos B	67629_at	CD22	CD22 antigen	2841,90	2959,92	0,96	0,4002	2981,05	2608,24
Linfocitos B	67631_f_at	CD22	CD22 antigen	1999,04	2016,03	0,99	0,8668	2084,90	2203,93
Linfocitos B, granulocitos	266_s_at	CD24	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	1534,34	2013,61	0,76	0,0290	1552,98	1810,64
Linfocitos B	31870_at	CD37	CD37 antigen	909,78	834,92	1,09	0,7728	43,90	19101,46
Linfocitos B	66531_at	CD37	CD37 antigen	255,47	286,54	0,89	0,5798	179,17	1238,69
Linfocitos B y T	40323_at	CD38	CD38 antigen (p45)	41,55	39,34	1,06	0,7888	16,13	455,74
Linfocitos B y T	32953_at	CD5	CD5 antigen (p56-62)	77,55	113,23	0,68	0,0268	61,03	165,26
Linfocitos B y T	89666_at	CD5	CD5 antigen (p56-62)	355,39	324,79	1,09	0,4301	216,24	900,36
Linfocitos B y T	39996_at	CD5L	CD5 antigen-like (scavenger receptor cysteine rich family)	36,45	47,32	0,77	0,1526	15,08	35,24
Linfocitos B	37479_at	CD72	CD72 antigen	131,84	166,14	0,79	0,0950	69,98	1136,98
Linfocitos B	38017_at	CD79A	CD79A antigen (immunoglobulin-associated alpha)	189,40	260,28	0,73	0,3131	126,27	6043,38
Linfocitos B	38018_g_at	CD79A	CD79A antigen (immunoglobulin-associated alpha)	37,75	78,72	0,48	0,3160	23,40	2831,10
Linfocitos B	37988_at	CD79B	CD79B antigen (immunoglobulin-associated beta)	41,15	60,23	0,68	0,4419	20,35	11421,62

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Linfocitos T	31540_at	4-1BB	4-1BB	50,77	48,84	1,04	0,7973	28,14	55,34
Linfocitos T	35000_at	4-1BB	4-1BB	39,10	34,06	1,15	0,4597	62,83	82,13
Linfocitos T y NK	40738_at	CD2	CD2 antigen (p50), sheep red blood cell receptor	317,52	306,63	1,04	0,7894	113,53	806,74
Linfocitos T	32861_s_at	CD28	CD28 antigen (Tp44)	18,82	22,64	0,83	0,2922	8,79	20,36
Linfocitos T	50048_at	CD28	CD28 antigen (Tp44)	46,34	52,11	0,89	0,5987	15,43	85,01
Linfocitos T y NK	34699_at	CD2AP	CD2-associated protein	268,63	271,73	0,99	0,8964	372,13	740,54
Linfocitos T y NK	44551_at	CD2AP	CD2-associated protein	366,05	439,87	0,83	0,0192	751,69	586,28
Linfocitos T y NK	61665_at	CD2AP	CD2-associated protein	216,09	232,65	0,93	0,4775	245,53	300,32
Linfocitos T y NK	64283_at	CD2AP	CD2-associated protein	663,62	673,79	0,98	0,8042	1253,44	1047,91
Linfocitos T y NK	33801_at	CD2BP2	CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2	254,66	284,44	0,90	0,3779	359,29	133,78
Linfocitos T y NK	52454_at	CD2BP2	CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2	976,82	1216,86	0,80	0,0019	1370,82	1235,50
Linfocitos T y NK	78483_at	CD2BP2	CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2	2718,54	3132,65	0,87	0,0078	3595,97	1653,34
Linfocitos T	36277_at	CD3E	CD3E antigen, epsilon polypeptide (TiT3 complex)	384,51	397,50	0,97	0,6784	213,65	926,34
Linfocitos T	73329_at	CD3E	CD3E antigen, epsilon polypeptide (TiT3 complex)	694,44	748,53	0,93	0,4716	1224,56	978,34
Linfocitos T	73331_at	CD3E	CD3E antigen, epsilon polypeptide (TiT3 complex)	315,66	233,16	1,35	0,0181	258,82	278,08
Linfocitos T	39226_at	CD3G (TCR γ)	CD3G antigen, gamma polypeptide (TiT3 complex)	13,05	13,14	0,99	0,9770	6,02	21,69
Linfocitos T	37078_at	CD3Z	CD3Z antigen, zeta polypeptide (TiT3 complex)	231,34	198,98	1,16	0,4888	60,04	1387,96
Linfocitos B y T	32953_at	CD5	CD5 antigen (p56-62)	77,55	113,23	0,68	0,0268	61,03	165,26
Linfocitos B y T	89666_at	CD5	CD5 antigen (p56-62)	355,39	324,79	1,09	0,4301	216,24	900,36
Linfocitos B y T	39996_at	CD5L	CD5 antigen-like (scavenger receptor cysteine rich family)	36,45	47,32	0,77	0,1526	15,08	35,24
Linfocitos T	40667_at	CD6	CD6 antigen	431,42	392,32	1,10	0,3638	242,82	674,42

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Linfocitos T	80597_at	CD6	CD6 antigen	775,81	723,75	1,07	0,6634	322,13	1830,58
Linfocitos T	771_s_at	CD7	CD7 antigen (p41)	359,66	345,88	1,04	0,6970	194,53	772,96
Linfocitos T	36885_at	SYK	SYK	176,99	139,77	1,27	0,1326	33,31	2713,67
Linfocitos T	1630_s_at	SYK	SYK	284,60	271,67	1,05	0,7461	106,76	3227,76
Linfocitos T	432_s_at	TCR alfa	TCR alfa	107,08	92,74	1,15	0,6606	21,63	416,78
Linfocitos T	433_at	TCR alfa	TCR alfa	35,49	42,56	0,83	0,2782	38,24	53,36
Linfocitos T	31449_at	TCR beta	TCR beta	60,49	55,52	1,09	0,5258	29,60	108,24
Linfocitos T	31563_at	TCR beta	TCR beta	12,88	17,81	0,72	0,1031	11,33	11,73
Linfocitos T	32416_at	TCR beta	TCR beta	26,18	25,91	1,01	0,9486	15,30	22,27
Linfocitos T	32795_at	TCR beta	TCR beta	137,47	130,51	1,05	0,6740	112,48	106,94
Linfocitos T	32797_at	TCR beta	TCR beta	24,19	34,79	0,70	0,1976	18,59	26,72
Linfocitos T	1110_at	TCR delta	TCR delta	205,77	212,40	0,97	0,7408	89,75	763,91
Linfocitos T	1498_at	zap70	zap70	211,20	211,74	1,00	0,9904	69,52	1467,07
Linfocitos T helper	35517_at	CD4	CD4 antigen (p55)	209,56	196,84	1,06	0,5234	65,48	282,88
Linfocitos T helper	1146_at	CD4	CD4 antigen (p55)	181,05	147,42	1,23	0,2163	28,32	327,79
Linfocitos T helper	856_at	CD4	CD4 antigen (p55)	109,95	106,44	1,03	0,7676	56,74	156,23
Linfocitos T helper	36776_at	CD4-rel	CD4 antigen (p55)-like	62,79	82,95	0,76	0,0271	37,32	57,92
Linfocitos T citotóxicos	40699_at	CD8A	CD8 antigen, alpha polypeptide (p32)	314,32	322,36	0,98	0,7815	142,08	664,58
Linfocitos T citotóxicos	74901_at	CD8A	CD8 antigen, alpha polypeptide (p32)	1796,14	1522,49	1,18	0,0453	1133,68	3781,18
Linfocitos T citotóxicos	39239_at	CD8B1	CD8 antigen, beta polypeptide 1 (p37)	400,20	468,31	0,85	0,0783	242,40	483,08

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Linfocitos B activados	37536_at	CD83	CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	398,71	342,52	1,16	0,0888	209,19	2769,21
Linfocitos B activados	89856_at	CD83	CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	1270,33	952,60	1,33	0,1123	918,48	10909,18
Linfocitos B y T activados	34929_at	CD30	CD30	52,16	54,90	0,95	0,6811	53,07	50,56
Linfocitos B y T activados	34929_at	CD30	CD30	52,16	54,90	0,95	0,6811	53,07	50,56
Linfocitos B y T activados	40323_at	CD38	CD38 antigen (p45)	41,55	39,34	1,06	0,7888	16,13	455,74
Linfocitos B y T activados	1702_at	IL2RA (CD25)	interleukin 2 receptor, alpha	22,14	24,25	0,91	0,6678	9,13	17,68
Linfocitos B y T activados	1702_at	IL2RA (CD25)	interleukin 2 receptor, alpha	22,14	24,25	0,91	0,6678	9,13	17,68
Linfocitos B y T activados	34168_at	TdT	TdT	33,88	33,40	1,01	0,9501	26,51	1043,17
Linfocitos B y T activados	65611_at	TdT binding protein	TdT binding protein	944,22	1175,56	0,80	0,0548	2487,08	2029,18
Linfocitos B y T activados, NK	37645_at	CD69	CD69 antigen (p60, early T-cell activation antigen)	121,19	85,16	1,42	0,0334	18,47	906,86

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Linfocitos T, NK	40738_at	CD2	CD2 antigen (p50), sheep red blood cell receptor	317,52	306,63	1,04	0,7894	113,53	806,74
Linfocitos T, NK	34699_at	CD2AP	CD2-associated protein	268,63	271,73	0,99	0,8964	372,13	740,54
Linfocitos T, NK	44551_at	CD2AP	CD2-associated protein	366,05	439,87	0,83	0,0192	751,69	586,28
Linfocitos T, NK	61665_at	CD2AP	CD2-associated protein	216,09	232,65	0,93	0,4775	245,53	300,32
Linfocitos T, NK	64283_at	CD2AP	CD2-associated protein	663,62	673,79	0,98	0,8042	1253,44	1047,91
Linfocitos T, NK	33801_at	CD2BP2	CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2	254,66	284,44	0,90	0,3779	359,29	133,78
Linfocitos T, NK	52454_at	CD2BP2	CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2	976,82	1216,86	0,80	0,0019	1370,82	1235,50
Linfocitos T, NK	78483_at	CD2BP2	CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2	2718,54	3132,65	0,87	0,0078	3595,97	1653,34
NK	81541_at	CD244	natural killer cell receptor 2B4	423,23	404,43	1,05	0,5891	274,94	1386,47
NK	38243_at	cd56	CD56	109,95	34,44	3,19	0,0008	15,60	33,27
NK	1566_at	cd56	CD56	563,50	575,59	0,98	0,8624	174,47	82,90
NK	36886_f_at	NKAT2	NKAT2	44,95	70,13	0,64	0,0066	49,83	504,93
NK	37121_at	NKG7	natural killer cell group 7 sequence	318,33	233,19	1,37	0,0626	110,43	3881,96
NK	36887_f_at	NK-R like	NK-R like	36,04	36,24	0,99	0,9790	13,05	393,91
NK	34232_at	NKTR	natural killer-tumor recognition sequence	200,52	205,05	0,98	0,7917	79,00	100,39
NK	66050_at	NKTR	natural killer-tumor recognition sequence	60,97	65,72	0,93	0,7531	41,93	112,68
NK	71496_at	NKTR	natural killer-tumor recognition sequence	242,52	194,19	1,25	0,0796	197,16	164,33
NK	71497_f_at	NKTR	natural killer-tumor recognition sequence	672,26	655,90	1,02	0,7631	361,24	918,91

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Leucocitos	37890_at	CD47	CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer)	426,96	510,01	0,84	0,1700	670,51	1357,33
Leucocitos	87790_at	CD47	CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer)	495,77	507,37	0,98	0,8370	592,68	1124,20
Leucocitos	38006_at	CD48	CD48 antigen (B-cell membrane protein)	159,68	136,78	1,17	0,4318	12,57	1486,44
Leucocitos	38378_at	CD53	CD53 antigen	492,72	388,70	1,27	0,2798	19,39	3351,12
Leucocitos	37177_at	CD58	CD58 antigen, (lymphocyte-associated antigen 3)	219,96	118,72	1,85	0,0002	240,00	348,38
Leucocitos	37856_at	CD84	CD84 antigen (leukocyte antigen)	67,89	62,33	1,09	0,5425	44,98	57,56
Leucocitos	42211_at	CD84-H1	CD84-H1 precursor	719,51	734,13	0,98	0,7265	545,81	637,04
Leucocitos	61437_at	CD84-H1	CD84-H1 precursor	184,51	235,18	0,78	0,0612	260,38	215,83
Leucocitos, eritrocitos	1125_s_at	CD44	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	98,31	88,65	1,11	0,4235	34,76	169,24
Leucocitos, eritrocitos	1126_s_at	CD44	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	754,53	572,61	1,32	0,0527	481,32	1047,39
Leucocitos, eritrocitos	2036_s_at	CD44	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	660,90	515,49	1,28	0,0783	488,34	1212,79
Leucocitos, eritrocitos	40493_at	CD44	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	1805,09	1539,47	1,17	0,2525	700,46	851,79
Leucocitos, eritrocitos	52729_at	CD44	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	130,87	138,46	0,95	0,6469	102,98	361,80
Monocitos	36661_s_at	CD14	CD14 antigen	2123,68	1180,15	1,80	0,0013	27,79	2811,44
Monocitos, macrófagos	33391_r_at	CD68	CD68 antigen	204,07	232,90	0,88	0,3056	86,64	166,04
Monocitos, macrófagos, plaquetas	37003_at	CD63	CD63 antigen (melanoma 1 antigen)	3005,76	2169,92	1,39	0,0049	2705,93	1289,97
Monocitos	36656_at	CD36	CD36 antigen	32,36	40,95	0,79	0,0992	23,09	70,97
Monocitos	41200_at	CD36L1	CD36 antigen-like 1	1132,17	1073,16	1,05	0,8141	1759,61	845,18
Monocitos	33823_at	CD36L2	CD36 antigen-like 2 (lysosomal integral protein II)	377,42	308,12	1,22	0,0088	348,60	167,98
Monocitos, linfocitos preB	39389_at	CD9	CD9 antigen (p24)	1361,61	601,42	2,26	0,0000	464,03	1071,70
Monocitos, linfocitos preB	64619_at	CD9	CD9 antigen (p24)	91,36	79,69	1,15	0,3918	62,56	119,36
Monocitos, progenitores mieloides	36802_at	CD33	CD33 antigen (gp67)	154,48	165,43	0,93	0,4998	98,64	451,41

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Citocina	37455_at	BLR1	BLR1 G protein-coupled receptor family	70,68	86,35	0,82	0,1184	40,23	65,97
Citocina	1003_s_at	BLR1	BLR1 G protein-coupled receptor family	141,45	126,59	1,12	0,5095	87,42	154,66
Citocina	1004_at	BLR1	BLR1 G protein-coupled receptor family	182,81	196,49	0,93	0,5352	132,67	334,51
Citocina	32484_at	CCBP2	CC chemokine receptor	218,56	237,22	0,92	0,4080	171,72	158,11
Citocina	43210_r_at	CCBP2	CC chemokine receptor	78,32	69,67	1,12	0,6079	19,48	168,26
Citocina	91043_at	CCR1	CC chemokine receptor 1	609,51	375,33	1,62	0,0342	106,63	1021,80
Citocina	39994_at	CCR1	CC chemokine receptor 1	303,78	243,46	1,25	0,3061	63,26	876,89
Citocina	1128_s_at	CCR1	CC chemokine receptor 1	164,38	176,97	0,93	0,5544	95,17	121,84
Citocina	39937_at	CCR2	CC chemokine receptor 2	86,62	107,91	0,80	0,0615	52,72	162,98
Citocina	37149_s_at	CCR2	CC chemokine receptor 2	114,02	153,76	0,74	0,0825	106,70	6685,26
Citocina	39938_g_at	CCR2	CC chemokine receptor 2	78,56	82,90	0,95	0,6908	43,61	114,11
Citocina	39936_at	CCR2	CC chemokine receptor 2	24,05	22,88	1,05	0,8485	14,63	112,67
Citocina	36724_s_at	CCR2(5?)	CC chemokine receptor 2	57,51	49,70	1,16	0,4551	16,43	70,78
Citocina	33098_at	CCR3	CC chemokine receptor 3	61,33	70,24	0,87	0,2455	42,90	65,13
Citocina	390_at	CCR4	CC chemokine receptor 4	17,41	14,40	1,21	0,3610	7,84	9,77
Citocina	33553_r_at	CCR6	CC chemokine receptor 6	19,87	26,41	0,75	0,1589	15,63	24,20
Citocina	458_at	CCR6	CC chemokine receptor 6	27,70	30,73	0,90	0,6239	18,03	56,16
Citocina	1097_s_at	CCR7	CC chemokine receptor 7	259,73	262,94	0,99	0,9567	69,24	658,11
Citocina	35088_at	CCR8	CC chemokine receptor 8	24,30	40,02	0,61	0,0191	20,83	28,81
Citocina	69680_at	CCR9	CC chemokine receptor 9	202,53	144,18	1,40	0,0232	181,17	310,93
Citocina	32009_at	CCR9	CC chemokine receptor 9	65,63	50,84	1,29	0,1793	30,19	56,46
Citocina	1445_at	CCRL2	CCRL2 G protein-coupled receptor family	174,37	177,58	0,98	0,8472	104,45	255,68
Citocina	40646_at	CX3CR1	CX3C chemokine receptor	234,64	63,89	3,67	0,0076	15,43	563,33
Citocina	44095_at	CXCL16	CXCL16 chemokine receptor	1769,99	1132,06	1,56	0,0030	658,64	1915,59

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Citocina	55057_at	CXCL16	CXCL16 chemokine receptor	306,06	238,05	1,29	0,0684	330,58	574,16
Citocina	649_s_at	CXCR4	CXC chemokine receptor (fusin)	1698,00	2188,36	0,78	0,1668	605,18	18711,18
Citocina	41245_at	GDF10	Member of the TGF-beta family of growth factors	125,80	53,47	2,35	0,0078	40,72	34,22
Citocina	1186_at	GDF10	Member of the TGF-beta family of growth factors	58,01	41,18	1,41	0,1279	28,87	14,27
Citocina	136_at	GPR31	Member of the G protein-coupled receptor family	259,09	224,85	1,15	0,2365	128,55	393,47
Citocina	34077_at	GPR9	CXC chemokine receptor	289,59	343,58	0,84	0,1169	364,40	588,81
Citocina	408_at	GRO1	Melanoma growth stimulating activity	147,64	97,00	1,52	0,2112	56,75	129,51
Citocina	37187_at	GRO2	Strongly similar to GRO1	366,48	189,61	1,93	0,0603	34,55	746,48
Citocina	34022_at	GRO3	Similar to human GRO1, may be a mitogenic factor	83,53	82,76	1,01	0,9590	39,94	234,28
Citocina	34951_at	HM74	G protein-coupled receptor	57,18	80,48	0,71	0,1439	50,60	149,46
Citocina	37219_at	MIG	Member of the chemokine family of cytokines	68,68	82,61	0,83	0,7028	25,07	31,74
Citocina	33965_at	SCYA1	Cytokine A1; chemokine	87,98	77,93	1,13	0,4780	48,56	79,02
Citocina	40008_at	SCYA11	Cytokine A11 (eotaxin)	159,94	157,72	1,01	0,9226	60,33	62,71
Citocina	37454_at	SCYA13	Cytokine A13; chemokine that activates leukocytes	71,07	61,32	1,16	0,3218	38,63	43,17
Citocina	34434_at	SCYA16	Cytokine A16; leukocyte chemoattractant	121,41	107,50	1,13	0,3974	72,74	74,23
Citocina	1183_at	SCYA17	Cytokine A17; chemotactic factor for T lymphocytes	34,54	56,09	0,62	0,0100	31,75	40,78
Citocina	32128_at	SCYA18	Cytokine A18	134,62	254,69	0,53	0,0640	32,58	82,17
Citocina	36067_at	SCYA19	Cytokine A19; chematactic factor for lymphocytes	498,11	558,49	0,89	0,7053	13,63	21,60
Citocina	34375_at	SCYA2	Cytokine A 2; chemotactic factor for monocytes	2300,23	1039,99	2,21	0,0026	337,57	1691,51
Citocina	40385_at	SCYA20	Cytokine A20; chemotactic factor for lymphocytes	42,67	39,57	1,08	0,8493	29,32	86,77
Citocina	36503_at	SCYA21	Cytokine A 21; chemotactic factor for lymphocytes	569,53	887,42	0,64	0,3781	45,33	83,33
Citocina	34041_at	SCYA22	Cytokine A22; dendritic, NK cells, and monocytes	190,36	188,84	1,01	0,9458	187,11	163,99
Citocina	36703_at	SCYA25	Thymus-expressed chemokine; T cell development	271,02	428,32	0,63	0,0400	292,06	361,51
Citocina	90189_at	SCYA26	Eotaxin-3; chemokine that binds the CCR3 receptor	1075,23	1098,52	0,98	0,6378	1417,90	1293,41

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Citocina	31644_at	SCYA27	Member of the CC chemokine family	54,38	56,41	0,96	0,7502	41,44	51,50
Citocina	36103_at	SCYA3	Macrophage inflammatory protein 1 alpha	625,02	618,38	1,01	0,9564	71,84	3260,89
Citocina	36674_at	SCYA4	Cytokine A4	274,35	224,79	1,22	0,2978	15,67	1106,73
Citocina	1403_s_at	SCYA5	Cytokine A5	618,95	468,88	1,32	0,0706	104,26	4483,77
Citocina	37085_g_at	SCYA5	Cytokine A5	261,27	308,13	0,85	0,0948	190,13	333,90
Citocina	36445_at	SCYA5	Cytokine A5	62,86	77,14	0,81	0,2020	32,23	38,43
Citocina	1405_i_at	SCYA5	Cytokine A5	123,74	92,46	1,34	0,3523	11,60	1944,57
Citocina	33789_at	SCYA5	Cytokine A5	167,06	153,09	1,09	0,4156	118,28	115,31
Citocina	1404_r_at	SCYA5	Cytokine A5	17,13	14,96	1,15	0,6393	7,58	133,76
Citocina	36444_s_at	SCYA5	Cytokine A5	42,61	45,41	0,94	0,7084	23,08	66,87
Citocina	37084_at	SCYA5	Cytokine A5	131,89	131,96	1,00	0,9961	118,98	177,92
Citocina	431_at	SCYB10	SCYB10 member of C-X-C chemokine family	26,94	25,20	1,07	0,7404	17,80	8,70
Citocina	35061_at	SCYB11	Cytokine B11; activity on activated T cells	23,47	24,19	0,97	0,8829	20,71	9,68
Citocina	41104_at	SCYB13	Predicted B lymphocyte chemoattractant	15,46	16,76	0,92	0,7582	7,49	7,76
Citocina	44982_s_at	SCYB14	Cytokine B14; regulates leukocyte infiltration	528,69	228,40	2,31	0,1360	36,59	67,03
Citocina	65823_at	SCYB14	Cytokine B14; regulates leukocyte infiltration	307,21	153,28	2,00	0,2461	36,59	31,36
Citocina	65598_g_at	SCYB14	Cytokine B14; regulates leukocyte infiltration	169,01	203,07	0,83	0,3978	146,08	96,62
Citocina	65597_at	SCYB14	Cytokine B14; regulates leukocyte infiltration	1101,06	1056,71	1,04	0,5559	868,86	790,82
Citocina	90150_at	SCYB14	Cytokine B14; regulates leukocyte infiltration	71,62	72,89	0,98	0,9296	48,63	84,32
Citocina	35025_at	SCYB5	Cytokine B5; neutrophil activation	106,70	124,04	0,86	0,1556	89,48	92,73
Citocina	65970_at	SCYB5	Cytokine B5; neutrophil activation	805,49	784,24	1,03	0,7367	1090,77	979,88
Citocina	35410_at	SCYB6	Cytokine B6; chemotactic factor for granulocytes	65,47	56,34	1,16	0,7350	27,72	12,46
Citocina	31495_at	SCYC2	Cytokine C2; chemokine	256,28	247,58	1,04	0,7062	207,53	508,77
Citocina	31496_g_at	SCYC2	Cytokine C2; chemokine	171,35	181,28	0,95	0,7695	38,81	565,29

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Citocina	823_at	SCYD1	Cytokine D1 (neurotactin, C3Xkine, fractalkine); promotes adhesion of leukocytes to endothelial cells	372,65	311,43	1,20	0,0422	206,78	119,13
Citocina	39734_at	SCYE1	Endothelial monocyte-activating polypeptide II; proinflammatory mediator	180,79	232,63	0,78	0,0070	391,72	174,93
Citocina	46121_at	SCYE1	Endothelial monocyte-activating polypeptide II; proinflammatory mediator	119,23	136,21	0,88	0,2849	180,13	130,72
Citocina	33834_at	SDF1	Stromal cell-derived factor 1	817,24	489,60	1,67	0,0023	572,23	2202,14
Citocina	32666_at	SDF1	Stromal cell-derived factor 1	650,30	246,03	2,64	0,0014	477,19	514,11
Citocina	89941_g_at	SDF2	Stromal cell-derived factor 2	3628,54	3180,98	1,14	0,0029	3814,08	3595,84
Citocina	41627_at	SDF2	Stromal cell-derived factor 2	673,32	641,18	1,05	0,2657	491,31	574,44
Citocina	89939_at	SDF2	Stromal cell-derived factor 2	54,56	61,50	0,89	0,4925	38,70	45,44
Citocina	36293_at	TYMSTR	Member of the G protein-coupled receptor family; similar to chemokine receptors	47,67	52,07	0,92	0,6162	20,55	33,39
Citocina	55096_at	VSHK1	CC chemokine receptor; a G protein-coupled receptor that binds chemokines of the CC subfamily, especially MCP-4, ELC (SCYA19) and TECK (SCYA25)	74,96	92,05	0,81	0,2686	77,34	79,77
Citocina	81729_at	VSHK1	CC chemokine receptor; a G protein-coupled receptor that binds chemokines of the CC subfamily, especially MCP-4, ELC (SCYA19) and TECK (SCYA25)	74,86	61,64	1,21	0,4414	64,03	49,92
Citocina	70490_at	VSHK1	CC chemokine receptor; a G protein-coupled receptor that binds chemokines of the CC subfamily, especially MCP-4, ELC (SCYA19) and TECK (SCYA25)	148,68	162,77	0,91	0,4794	216,52	122,27

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Interferón	1456_s_at	IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16	533,29	292,73	1,82	0,0032	630,63	782,98
Interferón	425_at	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	1885,07	1089,16	1,73	0,0274	32,57	3141,19
Interferón	48864_at	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	5612,33	3406,37	1,65	0,0132	283,46	8882,22
Interferón	39728_at	IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30	2993,63	2687,71	1,11	0,5295	430,18	11692,38
Interferón	925_at	IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30	1817,78	1817,79	1,00	1,0000	297,36	9341,80
Interferón	464_s_at	IFI35	interferon-induced protein 35	548,50	274,26	2,00	0,0021	124,21	1034,10
Interferón	74907_at	IFI35	interferon-induced protein 35	1331,26	1316,11	1,01	0,8543	1461,03	1300,48
Interferón	74908_at	IFI35	interferon-induced protein 35	471,91	187,68	2,51	0,0032	163,18	881,01
Interferón	32814_at	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide rep 1	425,63	200,40	2,12	0,0069	74,57	258,80
Interferón	915_at	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide rep 1	377,75	211,86	1,78	0,0079	102,55	288,44
Interferón	908_at	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide rep 2	198,32	156,11	1,27	0,0222	59,29	120,33
Interferón	909_g_at	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide rep 2	140,67	91,92	1,53	0,0182	55,88	144,31
Interferón	38584_at	IFIT4	interferon-induced protein with tetratricopeptide rep 4	576,97	203,24	2,84	0,0044	69,24	472,24
Interferón	675_at	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	2597,07	1527,81	1,70	0,0044	657,18	4835,44
Interferón	676_g_at	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	#####	9327,52	1,92	0,0005	7506,13	16340,61
Interferón	89882_at	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	266,49	267,04	1,00	0,9872	85,73	271,72
Interferón	411_i_at	IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	3368,86	1318,63	2,55	0,0002	1688,59	3219,39
Interferón	57594_at	IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	311,27	323,28	0,96	0,5973	365,70	373,23
Interferón	41745_at	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	#####	8469,73	2,20	0,0006	7786,50	15800,46
Interferón	874_at	IFN γ induc	SCYA2 = small inducible cytokine A2	255,20	152,50	1,67	0,0048	75,51	91,12
Interferón	875_g_at	IFN γ induc	SCYA2 = small inducible cytokine A2	4008,99	1886,86	2,12	0,0020	530,33	2398,77
Interferón	1666_at	IFN1@	interferon, type 1, cluster	54,82	56,05	0,98	0,8699	40,72	45,56
Interferón	427_f_at	IFNA10	interferon, alpha 10	65,43	66,82	0,98	0,8949	38,62	42,23
Interferón	1022_f_at	IFNA14	interferon, alpha 14	56,25	68,37	0,82	0,1237	45,32	33,17

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Interferón	1075_f_at	IFNA16	interferon, alpha 16	50,82	58,16	0,87	0,3535	34,16	43,89
Interferón	1770_at	IFNA2	interferon, alpha 2	27,81	22,67	1,23	0,2479	13,30	21,33
Interferón	1791_s_at	IFNA2	interferon, alpha 2	43,13	50,54	0,85	0,3003	36,07	38,93
Interferón	1435_f_at	IFNA21	interferon, alpha 21	21,71	38,49	0,56	0,0669	28,23	20,97
Interferón	1580_f_at	IFNA4	interferon, alpha 4	13,37	19,49	0,69	0,1088	6,93	14,52
Interferón	1540_f_at	IFNA5	interferon, alpha 5	59,84	68,68	0,87	0,3846	33,56	74,31
Interferón	32415_at	IFNA5	interferon, alpha 5	30,61	23,55	1,30	0,3149	10,03	13,49
Interferón	1541_f_at	IFNA6	interferon, alpha 6	91,64	102,99	0,89	0,3266	60,04	88,70
Interferón	682_at	IFNA8	interferon, alpha 8	43,12	49,01	0,88	0,4419	35,87	28,38
Interferón	1157_s_at	IFNAR1	interferon (alpha, beta and omega) receptor 1	102,94	93,15	1,11	0,4110	96,16	113,47
Interferón	1568_s_at	IFNAR2	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	87,81	79,33	1,11	0,4048	77,33	153,82
Interferón	1569_r_at	IFNAR2	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	302,53	323,82	0,93	0,4819	200,67	498,61
Interferón	1588_at	IFNAR2	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	150,81	133,25	1,13	0,2522	57,83	180,61
Interferón	1589_s_at	IFNAR2	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	128,56	119,92	1,07	0,5165	126,75	234,76
Interferón	1214_s_at	IFNB1	interferon, beta 1, fibroblast	12,48	11,89	1,05	0,8665	8,75	8,18
Interferón	1021_at	IFNG	IFN gamma	77,54	82,09	0,94	0,6286	48,13	98,86
Interferón	1021_at	IFNG	interferon, gamma	77,54	82,09	0,94	0,6286	48,13	98,86
Interferón	1611_s_at	IFNG	interferon, gamma	37,67	36,21	1,04	0,7748	30,18	43,21
Interferón	40702_at	IFNG	interferon, gamma	46,33	57,76	0,80	0,1516	20,68	54,49
Interferón	1038_s_at	IFNGR1	interferon gamma receptor 1	625,78	485,27	1,29	0,0066	392,23	566,48
Interferón	41140_at	IFNGR2	interferon gamma receptor 2	2119,89	1359,98	1,56	0,0051	1881,00	2182,78
Interferón	75317_s_at	IFNGR2	interferon gamma receptor 2	16313,14	9705,72	1,68	0,0016	14863,79	21669,72
Interferón	33969_at	IFNW1	interferon, omega 1	147,73	154,60	0,96	0,5860	112,88	139,54
Interferón	37679_at	IFRD1	interferon-related developmental regulator 1	647,71	536,49	1,21	0,0777	523,36	258,02

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Interferón	64529_at	IFRD1	interferon-related developmental regulator 1	37,50	40,84	0,92	0,7165	29,98	27,50
Interferón	36613_at	IFRD2	interferon-related developmental regulator 2	430,18	516,76	0,83	0,0007	821,68	819,54
Interferón	62130_at	IFRG28	28kD interferon responsive protein	139,26	72,04	1,93	0,0139	44,90	121,17
Interferón	73213_at	IFRG28	28kD interferon responsive protein	348,64	340,48	1,02	0,8516	343,97	464,19
Interferón	669_s_at	IRF1	IFN regulatory factor 1	252,42	165,93	1,52	0,0297	104,33	1279,46
Interferón	669_s_at	IRF1	interferon regulatory factor 1	252,42	165,93	1,52	0,0297	104,33	1279,46
Interferón	1219_at	IRF2	interferon regulatory factor 2	82,64	73,56	1,12	0,4123	55,32	88,41
Interferón	1220_g_at	IRF2	interferon regulatory factor 2	482,22	478,39	1,01	0,8942	325,68	560,33
Interferón	371_at	IRF3	interferon regulatory factor 3	879,27	778,27	1,13	0,0603	849,96	1252,54
Interferón	37625_at	IRF4	interferon regulatory factor 4	58,48	47,78	1,22	0,4414	9,77	3704,49
Interferón	36465_at	IRF5	interferon regulatory factor 5	264,93	217,13	1,22	0,0306	115,18	615,98
Interferón	477_at	IRF5	interferon regulatory factor 5	359,40	368,20	0,98	0,7490	233,73	390,30
Interferón	478_g_at	IRF5	interferon regulatory factor 5	154,66	127,54	1,21	0,2437	58,88	586,81
Interferón	36412_s_at	IRF7	interferon regulatory factor 7	343,83	287,83	1,19	0,0745	153,99	934,33
Interferón	43350_f_at	IRF7	interferon regulatory factor 7	1293,39	1076,29	1,20	0,0295	746,51	3522,01
Interferón	74528_s_at	IRF7	interferon regulatory factor 7	232,00	205,27	1,13	0,1375	189,50	886,04
Interferón	1107_s_at	ISG15	IFN induced	1812,14	991,52	1,83	0,0089	580,18	2875,43
Interferón	38517_at	ISGF3G	interferon-stimulated transcription factor 3, gamma (48kD)	1148,36	741,21	1,55	0,0007	558,27	1047,52
Interferón	38121_at	WARS	IFN induced	1473,97	1122,99	1,31	0,0073	1108,24	1497,58

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Interleucina	1766_g_at	ICE	IL1 converting enzyme	169,48	174,47	0,97	0,7435	119,32	210,88
Interleucina	31383_at	ICE	IL1 converting enzyme	43,34	47,18	0,92	0,5505	24,13	40,34
Interleucina	1765_at	ICE	IL1 converting enzyme	92,77	102,15	0,91	0,4232	72,23	92,86
Interleucina	1076_at	IL1 alfa	interleukin 1 alpha	62,09	84,83	0,73	0,0072	34,23	95,00
Interleucina	574_s_at	IL1conv	IL1 convertase	122,61	73,95	1,66	0,0012	35,08	508,37
Interleucina	39320_at	IL1 ce	IL1 converting enzyme	40,81	31,69	1,29	0,2290	24,21	190,77
Interleucina	1548_s_at	IL10	interleukin 10	94,18	112,97	0,83	0,1557	65,23	73,97
Interleucina	1062_g_at	IL10-R	IL10-R	300,93	181,81	1,66	0,0053	34,02	802,54
Interleucina	1061_at	IL10-R	IL10-R	359,71	292,09	1,23	0,0629	61,43	801,09
Interleucina	1061_at	IL10RA	interleukin 10 receptor, alpha	359,71	292,09	1,23	0,0629	61,43	801,09
Interleucina	1062_g_at	IL10RA	interleukin 10 receptor, alpha	300,93	181,81	1,66	0,0053	34,02	802,54
Interleucina	35659_at	IL10RA	interleukin 10 receptor, alpha	128,64	81,50	1,58	0,1273	31,38	693,56
Interleucina	35464_at	IL11	interleukin 11	27,43	19,33	1,42	0,1045	18,34	7,50
Interleucina	496_s_at	IL11RA	interleukin 11 receptor, alpha	455,10	390,12	1,17	0,0892	376,33	207,04
Interleucina	89839_at	IL11RA	interleukin 11 receptor, alpha	292,06	248,84	1,17	0,1894	241,68	373,17
Interleucina	89841_g_at	IL11RA	interleukin 11 receptor, alpha	1912,66	1319,37	1,45	0,0149	1997,34	634,01
Interleucina	89921_at	IL11RA	interleukin 11 receptor, alpha	2364,64	1904,18	1,24	0,0198	2469,79	1053,91
Interleucina	73348_at	IL11RA	interleukin 11 receptor, alpha	29,61	30,96	0,96	0,7224	26,18	38,07
Interleucina	33955_at	IL12A	interleukin 12A	39,67	45,57	0,87	0,3610	40,42	36,53
Interleucina	563_at	IL12B	interleukin 12B	10,26	12,10	0,85	0,2191	10,19	10,32
Interleucina	1066_at	IL12RB1	interleukin 12 receptor, beta 1	42,40	45,06	0,94	0,6613	47,84	78,61
Interleucina	1534_at	IL12RB2	interleukin 12 receptor, beta 2	39,30	45,21	0,87	0,3694	30,16	54,67
Interleucina	494_at	IL13	interleukin 13	119,25	121,29	0,98	0,9086	88,10	121,53
Interleucina	1016_s_at	IL13-R	IL13-R	83,94	68,97	1,22	0,3675	426,68	44,40

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Interleucina	35797_at	IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1	54,81	50,59	1,08	0,5116	30,33	60,10
Interleucina	359_at	IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1	217,05	165,09	1,31	0,0314	205,35	133,54
Interleucina	1016_s_at	IL13RA2	interleukin 13 receptor, alpha 2	83,94	68,97	1,22	0,3675	426,68	44,40
Interleucina	1036_at	IL15	interleukin 15	51,88	43,33	1,20	0,2183	38,41	54,99
Interleucina	1036_at	IL15	interleukin 15	51,88	43,33	1,20	0,2183	38,41	54,99
Interleucina	38488_s_at	IL15	interleukin 15	106,50	78,35	1,36	0,0795	87,23	100,58
Interleucina	495_at	IL15RA	interleukin 15 receptor, alpha	230,04	210,30	1,09	0,3467	122,26	239,68
Interleucina	1056_s_at	IL16	interleukin 16	79,85	71,43	1,12	0,4345	57,15	152,33
Interleucina	1359_at	IL17	interleukin 17	30,82	37,46	0,82	0,2762	19,49	22,38
Interleucina	50750_at	IL17B	interleukin 17B	402,09	435,00	0,92	0,4202	274,33	508,68
Interleucina	64439_at	IL17BR	IL-17B receptor	61,77	61,56	1,00	0,9847	71,63	64,61
Interleucina	36229_at	IL17R	interleukin 17 receptor	199,74	160,14	1,25	0,1613	216,03	783,93
Interleucina	1165_at	IL18	interleukin 18	89,09	82,88	1,07	0,5893	20,10	60,58
Interleucina	88738_at	IL18BP	interleukin 18 binding protein	727,70	588,08	1,24	0,1662	313,01	656,64
Interleucina	36377_at	IL18R1	interleukin 18 receptor 1	94,89	85,04	1,12	0,4280	39,85	165,61
Interleucina	33093_at	IL18RAP	interleukin 18 receptor accessory protein	18,19	23,72	0,77	0,0401	12,89	89,17
Interleucina	47855_at	IL19	interleukin 19	128,08	107,92	1,19	0,2446	122,08	241,03
Interleucina	1076_at	IL1A	interleukin 1, alpha	62,09	84,83	0,73	0,0072	34,23	95,00
Interleucina	39402_at	IL1B	interleukin 1, beta	268,51	241,59	1,11	0,6032	152,85	2562,32
Interleucina	71013_at	IL-1H1	interleukin-1 homolog 1	176,78	199,83	0,88	0,3384	170,08	134,99
Interleucina	84883_at	IL1HY1	interleukin 1, delta	131,46	138,68	0,95	0,6649	121,16	128,17
Interleucina	1100_at	IL1-R kin	IL1-R kinase	654,74	852,81	0,77	0,0001	1453,88	1317,02
Interleucina	1368_at	IL1R1	interleukin 1 receptor, type I	427,41	336,67	1,27	0,1529	87,92	102,96
Interleucina	998_s_at	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	116,65	128,68	0,91	0,5139	46,60	162,11

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Interleucina	38546_at	IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	231,10	133,01	1,74	0,0099	267,78	187,56
Interleucina	51136_at	IL1RAP	interleukin 1 receptor accessory protein	59,35	56,22	1,06	0,8034	390,22	93,68
Interleucina	40321_at	IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	56,95	59,42	0,96	0,7889	41,44	70,54
Interleucina	40322_at	IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	238,01	263,39	0,90	0,3132	126,17	183,07
Interleucina	36461_at	IL1RL1LG	putative T1/ST2 receptor binding protein	256,33	268,42	0,95	0,4024	329,04	309,82
Interleucina	87853_at	IL1RL1LG	putative T1/ST2 receptor binding protein	455,06	459,30	0,99	0,9273	765,02	826,50
Interleucina	31560_at	IL1RL2	interleukin 1 receptor-like 2	72,56	69,84	1,04	0,7259	52,38	44,04
Interleucina	37603_at	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	120,35	97,59	1,23	0,3816	32,61	821,12
Interleucina	31343_at	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	21,50	18,52	1,16	0,5527	8,79	12,30
Interleucina	1538_s_at	IL2	interleukin 2	10,48	13,91	0,75	0,2093	8,63	21,67
Interleucina	1387_at	IL2	interleukin 2	16,44	17,74	0,93	0,4978	9,53	12,63
Interleucina	34021_at	IL2	interleukin 2	20,94	21,13	0,99	0,9779	14,41	9,87
Interleucina	42969_at	IL20RA	interleukin 20 receptor, alpha	46,79	41,40	1,13	0,7087	64,63	122,40
Interleucina	54288_at	IL20RA	interleukin 20 receptor, alpha	139,55	146,46	0,95	0,6720	116,45	115,46
Interleucina	68058_at	IL20RA	interleukin 20 receptor, alpha	533,52	568,95	0,94	0,5391	803,22	426,59
Interleucina	84510_at	IL20RA	interleukin 20 receptor, alpha	111,74	109,49	1,02	0,8848	80,02	115,26
Interleucina	84948_at	IL20RA	interleukin 20 receptor, alpha	83,80	64,03	1,31	0,2195	53,38	75,13
Interleucina	72992_at	IL21R	interleukin 21 receptor	365,19	306,56	1,19	0,3068	234,47	720,96
Interleucina	86427_at	IL21R	interleukin 21 receptor	534,07	496,53	1,08	0,5330	393,77	1046,29
Interleucina	80910_r_at	IL22R	interleukin 22 receptor	1099,00	1213,39	0,91	0,0688	1286,23	962,67
Interleucina	77064_at	IL22RA2	class II cytokine receptor	311,40	313,66	0,99	0,9358	284,95	308,14
Interleucina	49076_at	IL23A	interleukin 23, alpha subunit p19	214,53	278,89	0,77	0,0369	267,39	339,02
Interleucina	41848_f_at	IL24	interleukin 24	18,18	20,02	0,91	0,5247	13,33	12,42
Interleucina	41849_r_at	IL24	interleukin 24	28,57	27,05	1,06	0,7787	11,93	20,33

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Interleucina	1702_at	IL2RA	interleukin 2 receptor, alpha	22,14	24,25	0,91	0,6678	9,13	17,68
Interleucina	1365_at	IL2RB	interleukin 2 receptor, beta	91,94	99,74	0,92	0,6926	32,58	960,56
Interleucina	1506_at	IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma	373,45	353,39	1,06	0,6992	97,98	1879,51
Interleucina	1263_at	IL3	interleukin 3	144,66	158,66	0,91	0,3818	130,13	159,27
Interleucina	1185_at	IL3RA	interleukin 3 receptor, alpha	251,30	219,11	1,15	0,3175	54,47	665,26
Interleucina	1574_s_at	IL4	interleukin 4	132,09	145,92	0,91	0,2416	82,67	130,64
Interleucina	33981_at	IL4	interleukin 4	19,40	17,73	1,09	0,6900	9,23	15,30
Interleucina	404_at	IL4R	interleukin 4 receptor	300,69	275,20	1,09	0,5263	135,13	645,41
Interleucina	436_at	IL5	interleukin 5	67,50	68,38	0,99	0,9220	53,64	66,00
Interleucina	36755_s_at	IL5RA	interleukin 5 receptor, alpha	84,92	109,76	0,77	0,0398	64,63	100,91
Interleucina	36756_at	IL5RA	interleukin 5 receptor, alpha	20,97	36,87	0,57	0,0041	16,96	26,49
Interleucina	38299_at	IL6	interleukin 6	687,18	155,86	4,41	0,0188	143,67	703,57
Interleucina	160032_at	IL6R	interleukin 6 receptor	90,43	76,66	1,18	0,2571	26,63	179,58
Interleucina	48565_at	IL6R	interleukin 6 receptor	170,79	115,95	1,47	0,0145	59,68	419,11
Interleucina	37621_at	IL6ST	interleukin 6 signal transducer	81,78	63,54	1,29	0,0364	51,60	46,68
Interleucina	64136_at	IL6ST	interleukin 6 signal transducer	218,64	158,12	1,38	0,0627	186,14	52,72
Interleucina	1159_at	IL7	interleukin 7	115,71	154,27	0,75	0,1875	22,38	13,31
Interleucina	33966_at	IL7	interleukin 7	190,49	260,29	0,73	0,1679	47,31	47,97
Interleucina	66244_at	IL7	interleukin 7	229,73	245,23	0,94	0,6164	227,24	166,11
Interleucina	1370_at	IL7R	interleukin 7 receptor	393,52	369,06	1,07	0,7160	172,08	901,72
Interleucina	59289_at	IL7R	interleukin 7 receptor	398,60	322,82	1,23	0,5924	160,15	2271,66
Interleucina	63628_at	IL7R	interleukin 7 receptor	455,82	336,33	1,36	0,4405	70,28	2461,18
Interleucina	63629_g_at	IL7R	interleukin 7 receptor	459,45	325,79	1,41	0,4046	156,22	2349,14
Interleucina	35372_r_at	IL8	interleukin 8	126,50	179,78	0,70	0,5007	35,38	1368,18

TIPO DE GEN	REFERENCIA AFFYMETRIX	SÍMBOLO DEL GEN	NOMBRE DEL GEN	EXPRESIÓN GRUPO 1	EXPRESIÓN GRUPO 2	FC 1/2	VALOR P	EXPRESIÓN GRUPO 3	EXPRESIÓN MÉDULA ÓSEA NORMAL
Interleucina	1369_s_at	IL8	interleukin 8	213,03	294,44	0,72	0,6247	58,13	4587,42
Interleucina	1032_at	IL8-R	interleukin 8-R	474,66	521,36	0,91	0,1147	342,57	371,64
Interleucina	1033_g_at	IL8-R	interleukin 8-R	98,66	110,70	0,89	0,3680	66,34	75,03
Interleucina	1352_at	IL8RA	interleukin 8 receptor, alpha	204,11	221,84	0,92	0,5128	123,18	198,82
Interleucina	1353_g_at	IL8RA	interleukin 8 receptor, alpha	256,09	271,72	0,94	0,6275	128,19	280,32
Interleucina	664_at	IL8RB	interleukin 8 receptor, beta	11,11	15,54	0,71	0,2484	3,03	30,92
Interleucina	34037_at	IL9	interleukin 9	28,86	41,55	0,69	0,1662	21,90	24,36
Interleucina	629_at	IL9R	interleukin 9 receptor	70,35	93,68	0,75	0,0650	39,78	140,88
Interleucina	938_at	IL9-R	interleukin 9-R	170,06	188,51	0,90	0,2227	127,31	172,87
Interleucina	40476_s_at	ILF1	interleukin enhancer binding factor 1	426,51	624,03	0,68	0,0000	624,26	424,92
Interleucina	40477_r_at	ILF1	interleukin enhancer binding factor 1	191,18	298,91	0,64	0,0001	267,54	74,34
Interleucina	84985_s_at	ILF1	interleukin enhancer binding factor 1	410,48	564,09	0,73	0,0666	1136,04	442,40
Interleucina	36189_at	ILF2	interleukin enhancer binding factor 2	1665,98	2430,99	0,69	0,0000	6686,31	2893,57
Interleucina	40845_at	ILF3	interleukin enhancer binding factor 3	826,42	1246,84	0,66	0,0000	1638,68	898,31
Interleucina	40846_g_at	ILF3	interleukin enhancer binding factor 3	1377,50	2059,71	0,67	0,0000	3165,23	1601,83
Interleucina	34473_at	TIL3	TIL3	48,70	39,26	1,24	0,2797	10,41	36,71
Interleucina	40310_at	TIL4	TIL4	183,21	112,09	1,63	0,0041	31,57	365,76