

Solicitud de Ayuda Actividad Asistencial e Investigadora en Genética del Neuroblastoma

**Asociación de Familiares y Amigos de Pacientes con
Neuroblastoma (Asociación NEN)**

**Dra. Rosa Noguera
Departamento de Patología
Universidad de Valencia/INCLIVA**

En relación a los tumores sólidos pediátricos, como el Neuroblastoma, las diversas estrategias terapéuticas a utilizar en los niños afectos de estos tumores dependen de la estratificación de los mismos en distintos grupos de riesgo.

Los grados de riesgo están determinados, entre otros parámetros, por la presencia o ausencia de alteraciones genéticas características, bien en cantidad como en estructura, lo que supone una traslación directa de resultados de investigación a la práctica clínica.

Desde hace dos décadas, nuestro Laboratorio del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia / Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA, actúa como Laboratorio Nacional de Referencia, encargado de realizar estas determinaciones genéticas en los casos remitidos por los distintos hospitales españoles.

Durante estos años, el desarrollo de esta labor ha sido sufragado, tanto el personal técnico de apoyo como el material fungible, gracias a la financiación obtenida a través de proyectos de investigación competitivos y, en menor medida, mediante aportaciones de las Comunidades Autónomas que han remitido muestras para su análisis (adjunto el catálogo de servicios)

La coyuntura económica actual, unida a la incorporación de nuevas técnicas pangenómicas de alto rendimiento cuyos costes se han incrementado sustancialmente, ha puesto en dificultades económicas a nuestro grupo de investigación. La presente solicitud tiene como objetivo cubrir parte de estas necesidades, tanto de personal como de material fungible.

Resumen divulgativo

ANÁLISIS GENÉTICO DEL NEUROBLASTOMA PARA UNA TERAPIA MÁS PERSONALIZADA Y MÁS EFICIENTE

El neuroblastoma es el tumor sólido más frecuente en la infancia. Los niños españoles afectados por este tumor se benefician de los resultados de las directrices en materia de genética de los estudios europeos en los que están incluidos. Así, de acuerdo a las alteraciones genéticas de las células tumorales, el oncopediatra suministra un tratamiento determinado al paciente lo más personalizado posible, lo que implica, una mayor eficiencia y una menor toxicidad. Nuestro grupo de investigación es el responsable del análisis genético del neuroblastoma de los pacientes españoles que son incluidos en los diferentes protocolos europeos de estratificación terapéutica que clasifican a los pacientes según su riesgo de recaída y progresión (bajo, intermedio o alto). El estudio preciso del perfil genético completo propuesto en este proyecto permitirá en los pacientes del grupo de bajo riesgo, reducir e incluso eliminar la quimioterapia en los pacientes con neuroblastoma de biología favorable (perfil genómico con alteraciones cromosómicas numéricas), así como mantener el tratamiento quimioterápico en los pacientes con biología desfavorable (perfil genómico con alteraciones segmentarias), obteniendo alta supervivencia (~100%); en los pacientes con riesgo intermedio y alto de recaída o progresión, permitirá detectar nuevas alteraciones genéticas asociadas a los tumores que puedan tenerse en cuenta en estratificaciones terapéuticas futuras para aplicar terapias más personalizadas.

ANÁLISIS MEDIANTE LA TÉCNICA DE aSNP DE LAS MODIFICACIONES DEL DNA EN LOS TUMORES NEUROBLÁSTICOS

Resumen del proyecto

El análisis genético de los tumores neuroblásticos de los pacientes españoles supone la continuidad de un amplio proyecto asistencial y de investigación actualmente financiado, de forma muy reducida, por el Instituto de Salud Carlos III y los Servicios Autonómicos de Salud. Es una necesidad el mantener e incrementar el buen nivel de resultados de estudio del DNA del neuroblastoma con aplicación traslacional actual y en un futuro próximo en los pacientes españoles. El objetivo principal de este proyecto es el análisis prospectivo del perfil genómico completo utilizando la técnica de microarrays de polimorfismos de cambio de un nucleótido (aSNP) en los tumores neuroblásticos de los pacientes españoles que están siendo incluidos en los estudios europeos de estratificación terapéutica para pacientes con alto riesgo (HR: "High Risk") y con riesgo intermedio o bajo (LINES: "European Low and Intermediate Risk Neuroblastoma") de recaída en lugar de la técnica utilizada hasta hace pocos meses de sonda de amplificación ligadura-dependiente MLPA. Para ello, nuestro laboratorio como Centro de Referencia Nacional de Estudios Biológicos del Neuroblastoma seguirá y ampliará las directrices en materia de genética marcadas en tales estudios en criterios de inclusión y para la estratificación terapéutica. El estudio del perfil genético tumoral se llevará a cabo mediante la técnica de alta resolución de aSNP no solo en los pacientes incluidos en el ensayo sino también en todos los incluidos en los 9 subgrupos del estudio LINES. En los pacientes con bajo riesgo de recaída, el estudio del perfil genético del tumor ya está permitiendo a través de un ensayo a doble ciego que no reciban tratamiento quimioterápico y sean sometidos a observación aquellos que no muestren síntomas amenazantes para la vida, que presenten tumor locorregional y edad al diagnóstico ≤ 18 meses (subgrupo 1) o metástasis y edad de diagnóstico \leq de 12 meses (subgrupo 4), células tumorales sin amplificación del oncogen MYCN y con alteraciones cromosómicas numéricas. Si el tumor presenta alteraciones cromosómicas numéricas o segmentarias y el paciente muestra síntomas amenazantes para la vida se le reduce o modifica el tratamiento quimioterápico respectivamente. Además, utilizaremos la técnica de aSNP en un estudio retrospectivo para detectar nuevas alteraciones genéticas en los tumores neuroblásticos del grupo de pacientes con bajo/intermedio riesgo de recaída imposibles de detectar por MLPA.

Antecedentes y estado actual del tema

El neuroblastoma es una forma de cáncer infantil que se forma en el tejido nervioso simpático y que por lo general suele comenzar con mayor frecuencia en las glándulas suprarrenales. Con los tratamientos actuales, los pacientes de riesgo bajo e intermedio de la enfermedad suelen cursar con muy buen pronóstico, con tasas de curación superiores al 90% en los pacientes de bajo riesgo y 70-90% en los de riesgo intermedio. En contraste, en las últimas décadas, la terapia para pacientes de alto riesgo de neuroblastoma ha dado como resultado curas de alrededor del 30%. Por lo tanto, es importante que todos los niños accedan al tratamiento adecuado en el tiempo indicado. Por ello, la estratificación de riesgo de recaída y progresión del neuroblastoma se continúa perfilando gracias a múltiples estudios clínico-biológicos entre los que se encuentran los estudios genéticos de las células tumorales mediante técnicas de análisis multilocus y/o pangenómicas. De este modo se ha determinado que las ganancias o pérdidas de cromosomas completos (NCA) se observan más frecuentemente en tumores localizados y en niños menores de 1 año de edad y están relacionadas con buen pronóstico. En cambio, las alteraciones cromosómicas segmentarias (SCA) son más frecuentes en estadios más avanzados o en niños de más de 12 meses de edad y se ha relacionado con alto riesgo de recaída [1,2]. La técnica de MLPA basada en la reacción en cadena de la polimerasa que permite el estudio multigenómico (aproximadamente 115 genes) de los tumores utiliza tres kits de sondas diseñados y validados por los diversos miembros de la ENQUA (European Neuroblastoma Quality Control Assessment)-del que somos miembros- y elaborados por la empresa MRC-Holland. La puesta a punto de la técnica en el diagnóstico genético de rutina capaz de detectar las alteraciones genéticas recurrentes del neuroblastoma ha sido posible por una parte, a la validación a nivel interno que hemos hecho en nuestro laboratorio, gracias a la ayuda concedida en el año 2009 por la Fundación de la Asociación Española contra el Cáncer, comparando los resultados obtenidos por FISH para diferentes marcadores con los resultados obtenidos con la técnica de MLPA y por otra, a la validación a nivel europeo que reveló una concordancia excelente de los resultados entre los laboratorios participantes [3,4]. La incorporación de las técnicas de alto rendimiento como la técnica de hibridación genómica comparada basada en matrices de cDNA (aCGH) o los arrays de polimorfismos de nucleótido simple (aSNP) están permitiendo completar el perfil genético del tumor con el fin de investigar nuevas variables genéticas [5,6].

Desde septiembre de 2011 se ha abierto un estudio europeo ("**European Low and Intermediate Risk Neuroblastoma**", LINES), cuya coordinación está subvencionada por la Comisión de la Unión Europea ("7th Framework Programme"), patrocinado por el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Fe, que incluye a todos los pacientes con neuroblastoma que no son de alto riesgo, con una estratificación en dos grupos en función de la biología tumoral y de la presentación clínica. El estudio genético debe realizarse en los laboratorios de referencia nacional mediante técnicas de FISH y multi/pangenómicas (MLPA, aCGH o aSNP).

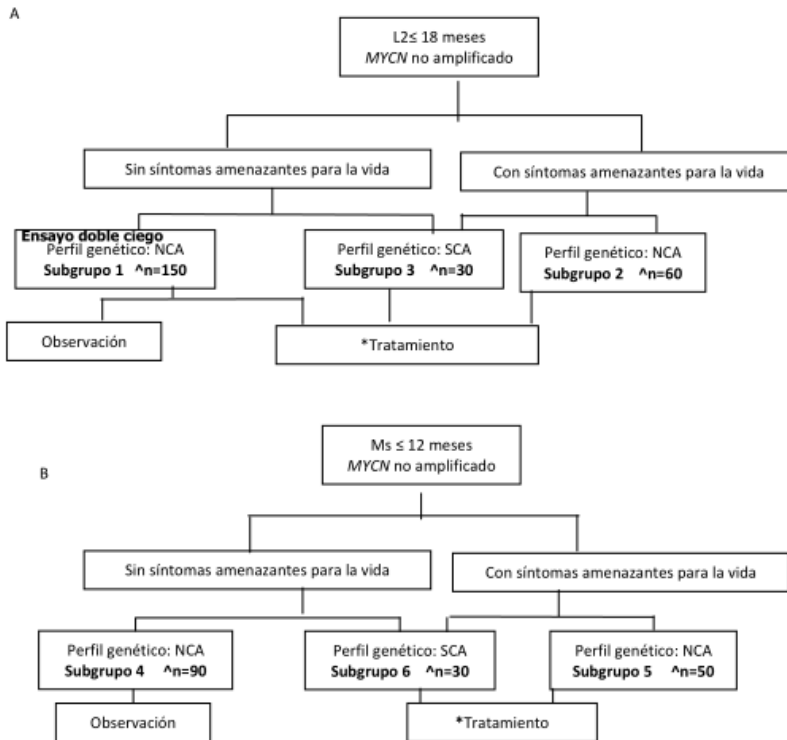
Los laboratorios de referencia nacional que son los incluidos en la ENQUA, utilizamos una nomenclatura y procedimientos comunes y hemos superado diferentes ensayos de calidad. En España es nuestro laboratorio el encargado de llevar a cabo los estudios genéticos de los tumores neuroblásticos españoles. Una vez obtenido el resultado genético del tumor de un paciente, el estudio LINES obliga a enviar los datos obtenidos a todos los miembros de la ENQUA para su revisión y validación. Si el resultado es aceptado por dichos miembros debe incorporarse a una base de datos europea común (SIOPEN- R-NET) para la estratificación terapéutica del paciente.

Regiones cromosómicas de interés, también llamadas alteraciones genéticas recurrentes o típicas, que tienen repercusión clínica y son de conocimiento obligatorio en el estudio LINES: amplificación del gen MYCN, delección de 1p, 3p, 4p y/o 11q y ganancia de 1q, 2p y/o 17q.

1.- Grupo de bajo riesgo (Figura 1).

Los criterios de inclusión de un paciente en el grupo de bajo riesgo son, entre otros, que el tumor no tenga el MYCN amplificado tras su análisis por FISH, así como que la edad de diagnóstico sea ≤ 18 meses en el caso de los tumores localizados (L2) o ≤ 12 meses para los tumores con metástasis en piel y/o hígado y/o médula ósea pero no en hueso, pulmón, pleura o sistema nervioso central (Ms). El estudio requiere en este grupo de pacientes el conocer en las células neuroblásticas el estado de al menos 7 regiones cromosómicas o genes con repercusión clínica. En el caso de que la técnica utilizada sea la MLPA y el resultado no sea interpretable o no esté claro, es necesario repetir el análisis con una técnica pangenómica (aCGH o aSNP). En los pacientes con tumores con SCA en alguna de las 7 regiones cromosómicas de interés se mantiene la terapia, mientras que la terapia se reduce e incluso se elimina (ensayo doble ciego) si los cambios son numéricos (presencia de NCA).

En este grupo de pacientes se pretende mantener una supervivencia superior al 90% en todos los pacientes, disminuyendo la intensidad de la quimioterapia e incluso eliminándola en aquellos con tumores neuroblásticos que tengan características biológicas favorables (presencia de NCA) y modificando la quimioterapia en aquellos pacientes con tumores con características biológicas negativas (presencia de SCA).



Perfil genético obtenido en el Laboratorio Nacional de Referencia:

- NCA: presencia de alteraciones cromosómicas numéricas (solo ganancias y/o pérdidas cromosómicas completas)
- SCA: Presencia de cualquier alteración cromosómica segmentaria recurrente en el neuroblastoma (deleción de 1p, 3p, 4p o 11q; ganancia de 1q, 2p, 17q) con o sin alteraciones cromosómicas numéricas.
- No resultado: puede ser debido a diferentes causas:
 - Bajo porcentaje de células tumorales en la muestra
 - Técnica multi-pangenómica no evaluable
 - Resultado pronósticamente no informativo cuando las alteraciones cromosómicas segmentarias no tienen implicación clínica conocida.

^Número de pacientes que se pretende reclutar en 5 años

*Diferente en cada uno de los subgrupos

Figura 1. Criterios de inclusión de los pacientes en el grupo de bajo riesgo. Subagrupación de los pacientes según la presentación clínica y la biología del tumor. (A) Estadío L2. (B) Estadío M

En este grupo de pacientes se pretende mantener una supervivencia superior al 90% en todos los pacientes, disminuyendo la intensidad de la quimioterapia e incluso eliminándola en aquellos con tumores neuroblásticos que tengan características biológicas favorables (presencia de NCA) y modificando la quimioterapia en aquellos pacientes con tumores con características biológicas negativas (presencia de SCA).

2.- Grupo de riesgo intermedio (Figura 2).

Este grupo incluye pacientes con estadío L2 (>18 meses y ≤10 años), L1 (≤10 años) y M (≤ 12 meses). El diagnóstico anátomo-patológico es esencial en los pacientes con estadío L2 y la ploidía es un criterio de inclusión en el grupo de pacientes con estadío L1. Todos los pacientes necesitan un resultado del perfil genómico del tumor aunque en este grupo el tratamiento es independiente del perfil genómico obtenido. El conocimiento del perfil pangenómico nos permitirá determinar, tras finalizar el estudio, si el perfil genómico completo o alguna alteración cromosómica concreta presenta valor pronóstico en este grupo de

pacientes y debe ser considerado en tratamientos futuros. Como en el grupo de bajo riesgo, los análisis biológicos del tumor deben realizarse en el laboratorio de referencia nacional.

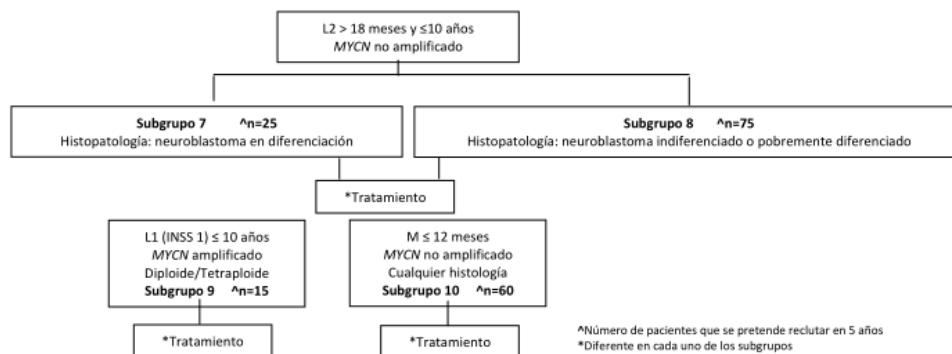


Figura 2. Criterios de inclusión de los pacientes en el grupo riesgo intermedio. Subagrupación de los pacientes dependiente de la histología del tumor

El objetivo en este grupo es confirmar los resultados obtenidos por estudios anteriores llevados a cabo en este grupo de pacientes (EUNS e INES 99.3) manteniendo supervivencias superiores al 80% con un tratamiento multidisciplinar adecuado.

Dentro del grupo con **alto riesgo de recaída** (“High Risk”, HR), definido como pacientes mayores de 1 año o de 18 meses con neuroblastoma MYCN amplificado o enfermedad diseminada, actualmente no existe ningún marcador pronóstico molecular que pueda determinar qué pacientes probablemente sobrevivirán y curarán de su enfermedad y cuales sucumbirán a la enfermedad en menos de 18 meses (ultraHR), a pesar de tener una buena respuesta inicial. Puesto que la mayoría de estos pacientes tendrán tumores con alto número de SCA, es muy inverosímil que esto se pueda utilizar para identificar los pacientes que recaigan.

El uso de técnicas de alta resolución está permitiendo la detección de nuevas alteraciones genéticas en los tumores neuroblásticos como la cromotripsis (ruptura del DNA de 1 o varios cromosomas en múltiples segmentos pequeños) y el cambio en el número de copias focales y escasas (FSCA) [7,8] que podrían tenerse en cuenta para instaurar tratamientos más personalizados, más eficientes y menos tóxicos.

Referencias

1. Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, Mosseri V, Ribeiro A, et al. (2009) Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 27: 1026-1033.
2. Schleiermacher G, Janoueix-Lerosey I, Ribeiro A, Klijanienko J, Couturier J, et al. (2010) Accumulation of segmental alterations determines progression in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 28: 3122-3130.

3. Ambros IM, Brunner B, Aigner G, Bedwell C, Beiske K, et al. (2011) A Multilocus Technique for Risk Evaluation of Patients with Neuroblastoma. Clin Cancer Res 17: 792-804.
4. Villamon E, Piqueras M, Berbegall AP, Tadeo I, Castel V, et al. (2011) Comparative study of MLPA-FISH to determine DNA copy number alterations in neuroblastic tumors. Histol Histopathol 26: 343-350.
5. Capasso M, Devoto M, Hou C, Asgharzadeh S, Glessner JT, et al. (2009) Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. Nat Genet 41: 718-723.
6. Maris JM (2010) Recent advances in neuroblastoma. N Engl J Med 362: 2202-2211.
7. Kumps C, Fieuw A, Mestdagh P, Menten B, Lefever S, et al. (2013) Focal DNA Copy Number Changes in Neuroblastoma Target MYCN Regulated Genes. PLoS One 8: e52321.
8. Molenaar JJ, Koster J, Zwijnenburg DA, van Sluis P, Valentijn LJ, et al. (2012) Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neurogenesis genes. Nature 483: 589-593.

OBJETIVOS

El proyecto conlleva una parte con una aplicación traslacional directa y otra de investigación básica. El objetivo general del proyecto es conocer al diagnóstico en todos los tumores neuroblásticos, con una resolución efectiva de 31Kb, los cambios en el número de copias del DNA que en un futuro permitirá instaurar terapias más personalizadas.

Los objetivos concretos son:

1. Poder continuar con la aportación del perfil genómico utilizando la técnica de aSNP en los tumores neuroblásticos de los pacientes españoles candidatos a ser incluidos en los estudios europeos de estratificación terapéutica destinados a pacientes con riesgo de recaída bajo/intermedio (LINES: “European Low and Intermediate Risk Neuroblastoma”) o alto (HR: “High Risk”).
2. Poder estudiar retrospectivamente el perfil genético completo de los tumores neuroblásticos de pacientes con riesgo bajo/intermedio de recaída que hayan sido diagnosticados con anterioridad a la apertura de dicho estudio (septiembre de 2011) para buscar cambios en el número de copias del DNA tumoral imposibles de detectar con el estudio semigenómico realizado previamente.

El estudio prospectivo implica:

- Aportar los datos genéticos necesarios para la inclusión y estratificación terapéutica de los pacientes en los diferentes estudios. La precisión de la técnica de aSNP es superior a las técnicas de MLPA y aCGH y su validación más rápida. La estratificación terapéutica en el grupo de pacientes de bajo riesgo de recaída (subgrupos 1 a 6) es dependiente del perfil genético del tumor y tiene como objetivo final la eliminación de la quimioterapia en los pacientes con neuroblastoma de biología favorable (presencia de alteraciones cromosómicas numéricas) mediante un ensayo de doble ciego en el subgrupo 1 (Figura 1); así

como modificar el tratamiento quimioterápico en aquellos con tumores con una biología desfavorable (presencia de alteraciones cromosómicas segmentarias). Para ello, los resultados genéticos tumorales obtenidos deben ser revisados y validados por los diferentes miembros de la ENQUA y posteriormente incorporados a la base de datos europea SIOPEN-R-NET. Además, nuestro laboratorio como miembro de la ENQUA debe participar en la revisión y validación de los resultados genéticos de los tumores neuroblásticos europeos a incluir en el estudio LINES del resto de países que participan en los estudios y ensayos.

- Detección, gracias al uso de aSNP, de cambios en el número de copias del DNA tumoral (focales escasas y/o múltiples) que puedan ser útiles para los pacientes con alto riesgo de recaída o mayor riesgo de refractariedad, con el fin de poder tenerlas en cuenta en protocolos de estratificación terapéutica futuros. Analizar a nivel europeo, una vez cerrado el estudio LINES y HR, si el perfil genómico completo o alguna alteración cromosómica concreta presenta valor pronóstico.

El estudio retrospectivo permitirá:

Determinar el número y/o tipo de alteraciones cromosómicas focales con valor pronóstico. Los resultados genéticos podrán ser analizados en combinación con los datos clínicos del paciente y con los resultados del estudio prospectivo.

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Para el estudio prospectivo se calcula que al Centro de Referencia Español de Estudios Biológicos del Neuroblastoma se remitirán en 3 años unos 75 casos de neuroblastoma de riesgo alto y unos 150 casos de riesgo bajo/intermedio.

El estudio prospectivo comprende:

1. Estudio del estado del gen MYCN y de la integridad de 11q por FISH en células improntadas y/o sección completa en parafina. Se utilizarán sondas de DNA específicas para el estudio del estado del gen MYCN (MYCN (2p24)/LAF (2q11), Kreatech, Biotechnology) y del brazo q del cromosoma 11 (MLL (11q23)/SE11, Kreatech, Biotechnology).

2. Determinación del contenido de DNA tumoral mediante citometría estática. Su resultado además de ser un criterio de inclusión de los pacientes en el subgrupo 9 del estudio LINES (Figura 2), permitirá una mejor interpretación de los resultados genéticos obtenidos mediante la técnica pangenómica.

3. Extracción del DNA de las muestras tumorales con $\geq 60\%$ de células tumorales mediante el protocolo de extracción con sal común en el caso de muestras tumorales congeladas o a través de protocolos específicos para muestras parafinadas. El análisis de la integridad del DNA se observará tras realizar una electroforesis en gel de agarosa y posterior tinción del gel con bromuro de etidio. La cantidad y calidad del DNA obtenido se medirá con un espectrofotómetro NanoDrop.

4. Estudio del perfil genético completo mediante aSNP de Illumina “HumanCytoSNP-12 v2.1 DNA Analysis BeadChip Kit” para el análisis de DNA de muestras tumorales congeladas o “HumanCytoSNP FFPE-12 v2.1 DNA

Analysis BeadChip Kit” para DNA extraído de tumores incluidos en parafina. Estos “cytochips ” analizan unos 300.000 SNP permitiendo tener una gran cobertura del genoma detectando alteraciones cromosómicas que no pueden ser detectadas por otras técnicas. Para el análisis de las muestras se utilizará el protocolo recomendado por el fabricante.

5. Digitalización de los arrays a través del sistema HiScanSQ (Illumina).
6. Análisis de los resultados de los aSNP mediante 2 programas informáticos recomendados por Illumina: KaryoStudio y GenomeStudio.
7. Interpretación de los resultados genéticos obtenidos e identificación de las posibles regiones alteradas.
8. Diagnóstico del perfil genético de los tumores utilizando la nomenclatura definida a nivel europeo.
9. Introducción de los datos genéticos en la base de datos de nuestro laboratorio (NeuPAT). Además se completará en dicha base de datos toda la información clínica del paciente, así como los resultados anatómo-patológicos de la muestra.
10. Inclusión de los datos en la base de datos SIOPEN-R-NET tras su validación.
11. Nuestro laboratorio, como miembro de la ENQUA, participará en la revisión de los resultados genéticos obtenidos en los tumores neuroblásticos de pacientes del resto de países europeos.
12. Análisis de los resultados a nivel europeo cuando se cierren los estudios. En el caso de los tumores de los pacientes del grupo de bajo riesgo (subgrupos 1 al 6 del estudio LINES), donde los resultados genéticos son indispensables para la estratificación terapéutica, hay que tener en cuenta que se plantean diferentes opciones para obtener un resultado satisfactorio en el caso de que el análisis genético no se pueda interpretar correctamente o no se detecte ningún tipo de alteración. Las diferentes posibilidades son las siguientes: repetir el análisis con otra técnica multi/pangenómica; extraer DNA de una nueva pieza tumoral con $\geq 60\%$ de células tumorales; enviar el DNA a otro laboratorio de un miembro de la ENQUA para su reanálisis; o realizar la técnica de FISH para conocer el estado de las 7 regiones cromosómicas requeridas en el estudio.

Estudio retrospectivo:

De las 1200 muestras tumorales recibidas desde 1992-2011 en el Departamento de Patología como Centro de Referencia Nacional procedentes de diversos hospitales españoles hemos seleccionado 100 tumores primarios (sin tratamiento quimioterápido previo) de pacientes de riesgo bajo/intermedio con $\geq 60\%$ de células neuroblásticas. De todos los sujetos cuyos tumores se han seleccionado para el estudio se dispone de datos diagnósticos (INSS), terapéuticos y evolutivos que constan en la Central de Datos del Grupo de Neuroblastoma situada en el Hospital Infantil La Fe de Valencia. El resto de datos biológicos (anatomía patológica, FISH, MLPA, ploidía) de la muestra tumoral estarán incluidos en la base de datos NeuPAT.

Cabe destacar que en el estudio retrospectivo no se han incluido pacientes con riesgo alto de recaída ya que nuestro grupo ha solicitado un proyecto de

investigación a la Conselleria d'Educació de la Generalitat Valenciana para tal fin.

PLAN DE TRABAJO; CRONOGRAMA

El estudio prospectivo que comprende varios análisis, se realizará a medida que se vayan registrando los pacientes en los estudios y se vayan recibiendo las muestras en el laboratorio.

1. FISH: el análisis se realizará en el momento del diagnóstico. En el caso del estudio LINES, el resultado de estado del gen MYCN debe ser enviado al oncopediatra antes de 10 días desde la entrada de la muestra al laboratorio de referencia nacional.
2. Ploidía: el contenido de DNA tumoral se analizará de forma rutinaria al diagnóstico de los tumores incluidos en este proyecto. En el estudio LINES la ploidía debe ser informada en el subgrupo 9 en un máximo de 3 semanas desde la recepción de la muestra en el laboratorio.
3. Selección de muestras y extracción de DNA: selección de los tumores con $\geq 60\%$ de células tumorales tras el informe del patólogo miembro de nuestro equipo. El diagnóstico anátomo-patológico se realiza de manera rutinaria tras la entrada de la muestra tumoral al laboratorio y tenemos conocimiento del porcentaje de células tumorales en la muestra, así como el grado de diferenciación neuroblástica, antes de 10 días hábiles tras la entrada de la biopsia. En las muestras que cumplan el requisito de porcentaje de células neuroblásticas se extraerá el DNA, llevando a cabo la determinación de la cantidad, calidad e integridad del DNA. Este proceso requiere un mínimo de 2 días de trabajo. Para aumentar la efectividad del proceso llevará a cabo la extracción simultánea de varias muestras.
4. aSNP: el análisis de las muestras (12 muestras como mínimo simultáneamente) mediante los microarrays y la digitalización requiere un mínimo de 3 días de trabajo. En el caso de que la estratificación terapéutica dependa de estos resultados, como es el caso de los pacientes incluidos en el grupo de bajo riesgo, los resultados deben ser informados al oncopediatra en un plazo máximo de 4 semanas, incluida la revisión de los mismos por los diferentes miembros de la ENQUA. Para el resto de pacientes en los que los resultados pangenómicos tumorales no son decisivos para la estratificación terapéutica (pacientes del grupo de riesgo intermedio) el plazo para informar es de 8 semanas.
5. Revisión de los resultados genéticos de los tumores neuroblásticos europeos: la revisión se realizará inmediatamente vía web a medida que nos vayan llegando los resultados desde los diferentes países miembros de la ENQUA.
6. En el estudio retrospectivo durante los 2 primeros años de proyecto se llevará a cabo el análisis genético por aSNP y la recogida de datos clínicos, terapéuticos y evolutivos de todos los enfermos y su introducción en la base de datos NeuPAT, para así en la tercera anualidad poder relacionar los datos pangenómicos obtenidos con el resto de datos mediante un análisis adecuado.

IMPORTANCIA DEL TRABAJO EN ONCOLOGÍA

La consecución del proyecto va a permitir:

-Aportar de manera muy precisa los datos genéticos de las 7 regiones cromosómicas de interés en el neuroblastoma, cuyo conocimiento es necesario para la estratificación terapéutica en el grupo de pacientes con bajo riesgo de recaída.

De esta manera se disminuye la intensidad de la quimioterapia e incluso se elimina en los pacientes con neuroblastoma de características biológicas favorables y se modificará el tratamiento en aquellos cuyo tumor tenga características biológicas negativas, manteniendo un nivel alto de supervivencia.

Los resultados obtenidos tienen una aplicación inmediata porque la información validada del estado de las 7 regiones cromosómicas de interés será utilizada por los oncólogos pediátricos para dirigir la terapia más adecuada al paciente, siguiendo las directrices del estudio europeo LINES, mejorando la calidad de vida del paciente y disminuyendo el riesgo por quimiotoxicidad.

- Conocer nuevas alteraciones genéticas de pequeño tamaño (<2Mb) en los tumores neuroblásticos con posible interés en la progresión tumoral y/o respuesta al tratamiento permitirá su aplicación como indicadores pronósticos en la estratificación terapéutica de los pacientes afectados de neuroblastoma en un futuro consiguiendo tratamientos más personalizados y más eficaces.
- En el caso concreto de los pacientes con riesgo alto de recaída, donde no se conoce marcador pronóstico molecular que nos oriente sobre la progresión del tumor en el paciente, el estudio mediante aSNP puede elucidar la presencia de alteraciones genómicas, tales como la cromotripsis o cambios en el número de copias del DNA focales, recientemente descritas, que permitan detectar dentro de este grupo de pacientes aquellos con mayor riesgo de refractariedad para considerarse desde el inicio del tratamiento.

IMPLICACIONES ÉTICAS

Dado el empleo de material biológico humano en este proyecto y del uso de información clínica relevante, el proyecto contará con la aprobación de los comités éticos de investigación clínica (CEIC) de los correspondientes hospitales, respetando la ley orgánica de protección de datos (LOPD 15/99), la declaración de Helsinki, la conferencia internacional de armonización para las buenas prácticas médicas (Directiva 2001/20EC), el convenio del Consejo de Europa relativo a los Derechos Humanos y la Biomedicina y la declaración universal de la UNESCO sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos. Es de destacar que buena parte de las actividades propuesta forman parte de colaboraciones preexistentes, para las que se cuenta con la aprobación de los CEIC de los hospitales involucrados.

HISTORIAL CIENTÍFICO DEL GRUPO RECEPTOR

Componentes del Grupo

<p>IP SENIOR (DIRECTOR DEL PROYECTO) NOMBRE: Rosa Noguera Salvá PUESTO: Catedrática Histología, Fac. Medicina y Odontología, Universidad de Valencia CORREO ELECTRÓNICO: rosa.noguera@uv.es TELÉFONO: 96.398.39.48</p>
<p>NOMBRE: Samuel Navarro Fos PUESTO: Catedrático Anatomía Patológica, Fac. Medicina y Odontología, Universidad de Valencia CORREO ELECTRÓNICO: Samuel.navarro@uv.es TELÉFONO: 96.3864100 ext 52469</p>
<p>NOMBRE: Ana Pilar Berbegall Beltrán PUESTO: Técnico Superior Investigación, Fac. Medicina y Odontología, Universidad de Valencia CORREO ELECTRÓNICO: ana.berbegall@uv.es TELÉFONO: 96.386.41.00 ext 52467</p>
<p>NOMBRE: Irene Tadeo Cervera PUESTO: Técnico Soporte Investigación, Fac. Medicina y Odontología, Universidad de Valencia CORREO ELECTRÓNICO: irene.tadeo@uv.es TELÉFONO: 96.386.41.00 ext 52467</p>
<p>NOMBRE: Susana Martín Vañó PUESTO: Estudiante predoctoral, Fac. Medicina y Odontología, Universidad de Valencia CORREO ELECTRÓNICO: susana.martín@uv.es TELÉFONO: 96.386.41.00 ext 52467</p>
<p>NOMBRE: Víctor Zúñiga Zaragoza PUESTO: Estudiante predoctoral, Fac. Medicina y Odontología, Universidad de Valencia CORREO ELECTRÓNICO: zuzavic@uv.es TELÉFONO: 96.386.41.00 ext 52467</p>
<p>NOMBRE: Maite Blanquer Meceiras PUESTO: Estudiante predoctoral, Fac. Medicina y Odontología, Universidad de Valencia CORREO ELECTRÓNICO: mablanma@alumni.uv.es TELÉFONO: 96.386.41.00 ext 52467</p>

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN Y PUBLICACIONES en los últimos 5 años

Desde 1992 el grupo participa en diferentes protocolos terapéuticos del neuroblastoma encargándose de los datos genéticos y patológicos como Centro de Referencia Nacional de dichos estudios recibiendo material tumoral de los casos registrados en los diferentes estudios clínicos. Se han creado a nivel europeo diferentes subcomités para la inclusión de los pacientes en dichos estudios. El Dr. S. Navarro forma parte del Subcomité de Patología y la Dras. Noguera y Berbegall del Subcomité de Biología que se responsabiliza de la validación de los datos genéticos con implicaciones terapéuticas (“European Neuroblastoma Quality Control Assessment” ENQUA). Los diferentes miembros de la ENQUA han llevado a cabo un importante trabajo enfocado a la estandarización de protocolos, interpretación de resultados y la puesta en marcha de una nomenclatura común que exprese los resultados genéticos obtenidos por las diferentes técnicas. Desde el 2003, el grupo forma parte del sistema de las redes temáticas de investigación, actualmente RETICS, cuyo objetivo es la aplicación del diagnóstico molecular y de la investigación traslacional al tratamiento y diagnóstico de los pacientes de oncología pediátrica. El equipo contribuye activamente en la red europea (SIOPEN-R-NET) además de colaborar científicamente, entre otros, con el laboratorio de Genética dirigido por el Prof. F. Speleman (Univ. Ghent, Bélgica) y con el de Medicina Molecular dirigido por el Prof. Sven Pählman (Univ. Malmö, Suecia). Desde 2007 se ha determinado el perfil genético tumoral de más de 550 muestras de tumores neuroblásticos mediante MLPA, validando los resultados con otras técnicas moleculares. Todo ello gracias a diferentes fondos nacionales públicos (Instituto de Salud Carlos III y Conselleria de Sanitat) y privados (Fundación de la Asociación Española contra el Cáncer). La persona contratada como Técnico Superior de Investigación a través del proyecto concedido por la Asociación Española contra el Cáncer, D^a Ana Pilar Berbegall, en los 2 últimos años de proyecto ha realizado dos estancias de 4 meses en total en el laboratorio del profesor Tommy Martinsson (Departamento de Genética Clínica, Instituto de Biomedicina, Academia Sahlgrenska de la Universidad de Gotemburgo, Suecia) gracias a dos ayudas concedidas por la RTICC. Esta colaboración permitió la detección de cambios en el número de copias en el conjunto del genoma tumoral completo de forma precisa y detallada mediante arrays de SNP (Affymetrix 250K GeneChip) en aproximadamente 100 muestras. Además, nos ha permitido adquirir la experiencia suficiente para poner en práctica dicha técnica en nuestro laboratorio, de tal forma que ya hemos analizado otras 100 muestras en nuestro laboratorio con resultados satisfactorios. En los últimos años, el grupo ha iniciado una nueva línea de investigación para estudiar los tumores como tejidos funcionalmente interconectados y dependientes del microambiente que nos ha llevado a trabajar con el equipo del Dr. Álvaro (Hospital Verge de la Cinta, Tortosa) y del Dr. García (Hospital General de Ciudad Real). Esta investigación se ha visto definitivamente respaldada mediante la concesión en 2010 del proyecto “Modelo in silico de la hiperestructura de los tumores neuroblásticos.



Integración génica, microscópica y clínica” (PI10/15, ISCIII), que estamos desarrollando en colaboración con el Dr. Dopazo (Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia).

MEMORIA DE LAS PARTIDAS PRESUPUESTARIAS SOLICITADAS

Costes de Personal

- Contrato de personal técnico: titulado superior doctor a jornada completa:
35.000€/año

* Según Tabla Salarial ISCIII Adjunta (pág 5: Guía de ayuda de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud)

Costes de Ejecución

Adquisición de bienes y contratación de servicios (inventariable, fungible y otros gastos):

- aSNP: para 100 casos 15.000€/año
- Sondas FISH (Hibridación Fluorescente in situ):
 - NMYC para 100 casos 3.000€/año
 - 11q: para 100 casos. 3.000€/año
- Extracciones y reactivos: 1.000€/año

Total Costes Anuales: 57.000€/año

Publicaciones

1. Pietras A, Gisselsson D, Ora I, Noguera R, Beckman S, Navarro S, Pålman S. High levels of HIF-2alpha highlight an immature neural crest-like neuroblastoma cell cohort located in a perivascular niche. *J Pathol.* (2008) 214: 482-488.
2. Villamón E, Piqueras M, Mackintosh C, Alonso J, de Alava E, Navarro S, Noguera R. Comparison of different techniques for the detection of genetic risk-identifying chromosomal gains and losses in neuroblastoma. *Virchows Arch.* (2008) 453: 47-55.
3. Noguera R, Machado I, Piqueras M, Lopez-Guerrero JA, Navarro S, et al. Tissue microarrays: applications in study of p16 and p53 alterations in Ewing's cell lines. *Diagn Pathol.* (2008) 3 Suppl 1. S27.
4. Piqueras M, Navarro S, Castel V, Cañete A, Llombart-Bosch A, Noguera R. Analysis of biological prognostic factors using tissue microarrays in neuroblastic tumors. *Pediatr Blood Cancer* (2009) 52: 209-14.
5. Löfstedt T, Fredlund E, Noguera R, Navarro S, et al. HIF-1alpha induces MXI1 by alternate promoter usage in human neuroblastoma cells. *Exp Cell Res.* (2009) 315:1924-36.
6. Combaret V, Hogarty MD, London WB, McGrady P, Iacono I, Brejon S, Swerts K, Noguera R et al. Influence of neuroblastoma stage on serum-based detection of MYCN amplification. *Pediatr Blood Cancer* (2009) 53:329-31.
7. Noguera R, Fredlund E, Piqueras M, Pietras A, Beckman S, Navarro S, Pålman S. HIF-1alpha and HIF-2alpha are differentially regulated in vivo in neuroblastoma: high HIF-1alpha correlates negatively to advanced clinical stage and tumor vascularization. *Clin Cancer Res.* (2009) 15:7130-6.
8. Subramaniam MM, Piqueras M, Navarro S, Noguera R. Aberrant copy numbers of ALK gene is a frequent genetic alteration in neuroblastomas. *Hum Pathol.* (2009) 40:1638-42.
9. Pietras A, Hansford LM, Johnsson AS, Bridges E, Sjölund J, Gisselsson D, Rehn M, Beckman S, Noguera R, Navarro S, et al. HIF-2alpha maintains an undifferentiated state in neural crest-like human neuroblastoma tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2009) 106:16805-10.
10. Machado I, Noguera R, Pellin A, Lopez-Guerrero JA, Piqueras M, Navarro S, Llombart-Bosch A. Molecular diagnosis of Ewing sarcoma family of tumors: a comparative analysis of 560 cases with FISH and RT-PCR. *Diagn Mol Pathol.* (2009) 18:189-99.
11. Vermeulen J, De Preter K, Naranjo A, Vercruyse L, Van Roy N, Hellemans J, Swerts K, Bravo S, Scaruffi P, Tonini GP, De Bernardi B, Noguera R, Piqueras M, Cañete A, Castel V, et al. Predicting outcomes for children with neuroblastoma using a multigene-expression signature: a retrospective SIOPEN/COG/GPOH study. *Lancet Oncol.* (2009) 10:663-71.
12. Petrov SV, Machado I, Boulytcheva IV, Noguera R, Pellin A, Bacchini P, Bertoni F, Llombart-Bosch A. New approaches in the diagnosis of small-cell round tumors of bone and soft tissue. *Arkh Patol.* (2009) 71:34-40.
13. Álvaro T, Noguera R, Fariñas F. La matriz Extracelular: morfología, función y biotensegridad (parte I). *Revista Española de Patología* (2009) 42: 249-261.

14. Castel V, Villamón E, Cañete A, Navarro S, Ruiz A, Melero C, Herrero A, Yáñez Y, Noguera R. Neuroblastoma in adolescents: genetic and clinical characterization. *Clin Transl Oncol.* (2010) 2:49-54.
15. Machado I, Noguera R, Santonja N, Donat J, Fernandez-Delgado R, Acevedo A, Baragaño M, Navarro S. Immunohistochemical Study as a Tool in Differential Diagnosis of Pediatric Malignant Rhabdoid Tumor. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* (2010) 18(2): 150-58.
16. Castel V, Segura V, Cañete A. Treatment of high-risk neuroblastoma with anti-GD2 antibodies. *Clin Transl Oncol.* 2010 12(12):788-93.
17. Bautista F, Gómez-Chacón J, Costa E, Moreno L, Cañete A, Muro MD, Velazquez J, Castel V. Retained intravascular fragments after removal of indwelling central venous catheters: a single institution experience. *J Pediatr Surg.* 2010 45(7):1491-5. *Surg (Q2).* A
18. Mayordomo E, Machado I, Giner F, Kresse SH, Myklebost O, Carda C, Navarro S, Llombart-Bosch A. A tissue microarray study of osteosarcoma: histopathologic and immunohistochemical validation of xenotransplanted tumors as preclinical models. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* (2010)18:453-61.
19. Faus C, Roda D, Frasson M, Roselló S, García-Granero E, Flor-Lorente B, Navarro S. The role of the pathologist in rectal cancer diagnosis and staging and surgical quality assessment. *Clin Transl Oncol.* (2010) 12:339-45.
20. Machado I, Navarro S, et al. Ezrin immunohistochemical expression in chondrosarcomas, osteosarcomas and Ewing sarcoma family of tumors. *Virchows Arch* (2010) 457:87-9.
21. Mestdagh P, Fredlund E, Pattyn F, Schulte JH, Muth D, Vermeulen J, Kumps C, Schlierf S, De Preter K, Van Roy N, Noguera R, et al. MYCN/c-MYC-induced microRNAs repress coding gene networks associated with poor outcome in MYCN/c-MYC-activated tumors. *Oncogene.* (2010) 29:1394-404.
22. Grau E, Martínez F, Orellana C, Cañete A, Yáñez Y, Oltra S, Noguera R, Hernández M, Castel V. Epigenetic alterations in disseminated neuroblastoma tumour cells: influence of TMS1 gene hypermethylation in relapse risk in NB patients *J Cancer Res Clin Oncol.* (2010) 136:1415-21.
23. Noguera R, Villamón E, Berbegall A, Machado I, Giner F, Tadeo I, Navarro S, Llombart-Bosch A. Gain of MYCN region in a Wilms tumor derived xenotransplanted cell line. *Diagnostic molecular pathology* (2010) 19: 33-39.
24. Mestdagh P, Fredlund E, Pattyn F, Rihani A, Van Maerken T, Vermeulen J, Kumps C, Menten B, De Preter K, Schramm A, Schulte J, Noguera R, et al. J.An integrative genomics screen uncovers ncRNA T-UCR functions in neuroblastoma tumours. *Oncogene* (2010) 29:3583-92.
25. Kumps C, Van Roy N, Heyrman L, Goossens D, Del-Favero J, Noguera R, Vandesompele J, Speleman F, De Preter K. Multiplex Amplicon Quantification (MAQ), a fast and efficient method for the simultaneous detection of copy number alterations in neuroblastoma. *BMC Genomics* (2010) 11:298.
26. Machado I, Alberghini M, Giner F, Corrigan M, O'Sullivan M, Noguera R, Pellin A, Bertoni F, Llombart-Bosch A. Histopathological characterization of

- small cell osteosarcoma with immunohistochemistry and molecular genetic support. *A study of 10 cases. Histopathology* (2010) 57: 162-67.
27. Oberthuer A, Hero B, Berthold F, Juraeva D, Faldum A, Kahlert Y, Asgharzadeh S, Seeger R, Scaruffi P, Tonini GP, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G, Vandesompele J, Vermeulen J, Speleman F, Noguera R, Piqueras M et al. Prognostic impact of gene expression-based classification for neuroblastoma. *J Clin Oncol.* (2010) 28:3506-15.
 28. De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, Zabrocki P, Porcu M, Westerhout EM, Lakeman A, Vandesompele J, Hoebeek J, Van Maerken T, De Paepe A, Laureys G, Schulte JH, Schramm A, Van Den Broecke C, Vermeulen J, Van Roy N, Beiske K, Renard M, Noguera R, et al. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res.* (2010) 16:4353-62.
 29. Álvaro T, Noguera R, Fariñas F. La matriz extracelular: de la mecánica molecular al microambiente tumoral (parte II). *Revista Española de Patología* (2010) 43:24-32.
 30. Villamón E, Piqueras M, Berbegall AP, Tadeo I, Castel V, Navarro S, Noguera R. Comparative study of MLPA-FISH to determine DNA copy number alterations in neuroblastic tumors. *Histol Histopathol* (2011) 26: 343-350.
 31. Berthier A, Navarro S, et al. PINK1 displays tissue-specific subcellular location and regulates apoptosis and cell growth in breast cancer cells. *Hum Pathol* (2011) 42:75-87.
 32. Frasson M, Garcia-Granero E, Roda D, Flor-Lorente B, Roselló S, Esclapez P, Faus C, Navarro S, Campos S, Cervantes A. Preoperative chemoradiation may not always be needed for patients with T3 and T2N+ rectal cancer. *Cancer* (2011) 117:3118-25.
 33. Calabuig-Fariñas S, López-Guerrero JA, Navarro S, Machado I, Poveda A, Pellín A, Llombart-Bosch A. Evaluation of prognostic factors and their capacity to predict biological behavior in gastrointestinal stromal tumors. *Int J Surg Pathol* (2011) 19:448-61.
 34. Subramaniam MM, Navarro S, Llombart-Bosch A. Immunohistochemical study of correlation between histologic subtype and expression of epithelial-mesenchymal transition-related proteins in synovial sarcomas. *Arch Pathol Lab Med* (2011) 135:1001-9.
 35. Machado I, Navarro S, López-Guerrero JA, Alberghini M, Picci P, Llombart-Bosch A. Epithelial marker expression does not rule out a diagnosis of Ewing's sarcoma family of tumours. *Virchows Arch* (2011) 459:409-14.
 36. Rubie H, De Bernardi B, Gerrard M, Canete A, Ladenstein R, Couturier J, Ambros P, Munzer C, Pearson AD, Garaventa A, Brock P, Castel V, Valteau-Couanet D, Holmes K, Di Cataldo A, Brichard B, Mosseri V, Marquez C, Plantaz D, Boni L, Michon J. Excellent outcome with reduced treatment in infants with nonmetastatic and unresectable neuroblastoma without MYCN amplification: results of the prospective INES 99.1. *J Clin Oncol.* 2011 29:449-55.
 37. López-Guerrero JA, Machado I, Scotlandi K, Noguera R, Pellín A, Navarro S, Serra M, Calabuig-Fariñas S, Picci P, Llombart-Bosch A. Clinicopathological significance of cell cycle regulation markers in a large

- series of genetically confirmed Ewing's Sarcoma Family of Tumors. *Int J Cancer*. (2011): 1139-1150.
38. Grau E, Martínez F, Orellana C, Canete A, Yáñez Y, Oltra S, Noguera R, Hernandez M, Bermúdez JD, Castel V. Hypermethylation of apoptotic genes as independent prognostic factor in neuroblastoma disease. *Mol Carcinog*. (2011) 50:153-62.
 39. Machado I, Noguera R, Mateos EA, Calabuig-Fariñas S, López FI, Martínez A, Navarro S, Llombart-Bosch A. The many faces of atypical Ewing's sarcoma. A true entity mimicking sarcomas, carcinomas and lymphomas. *Virchows Arch* (2011) 458:281-290.
 40. Berthier A, Piqueras M, Villamón E, Berbegall A, Tadeo I, Castel V, Navarro S, Noguera R. Anaplastic lymphoma kinase expression in neuroblastomas and its relationship with genetic, prognostic, and predictive factors. *Hum Pathol*. (2011) 42:301-2.
 41. Lundberg G, Sehic D, Lämsberg JK, Ora I, Frigyesi A, Castel V, Navarro S, Piqueras M, Martinsson T, Noguera R, Gisselsson D. Alternative lengthening of telomeres-An enhanced chromosomal instability in aggressive non-MYCN amplified and telomere elongated neuroblastomas. *Genes Chromosomes Cancer*. (2011) 50:250-62.
 42. Giner F, Machado I, Noguera R, Villamon E, Pellin A, Calabuig-Fariñas S, Peydro-Olaya A, Navarro S, Llombart-Bosch A. The epithelial mesenchymal transition process in wilms tumor: a study based on a xenograft model. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. (2011) 19:369-75.
 43. Gómez-Mateo M del C, Piqueras M, Pålman S, Noguera R, Navarro S. Prognostic value of SOX2 expression in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. (2011) 50:374-7.
 44. Ambros IM, Brunner B, Aigner G, Bedwell C, Beiske K, Bénard J, Bown N, Combaret V, Couturier J, Defferrari R, Gross N, Jeison M, Lunec J, Marques B, Martinsson T, Mazzocco K, Noguera R, Schleiermacher G, Speleman F, Stallings R, Tonini GP, Tweddle DA, Valent A, Vicha A, Roy NV, Villamon E, et al. A multilocus technique for risk evaluation of patients with neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. (2011) 17:792-804.
 45. Piqueras M, Navarro S, Cañete A, Castel V, Noguera R. How to minimise the effect of tumour cell content in detection of aberrant genetic markers in neuroblastoma. *Br J Cancer*. (2011) 105:89-92.
 46. Piqueras M, Navarro S, Cañete A, Castel V, Noguera R. Prognostic value of artial genetic instability in neuroblastoma with ≤50% neuroblastic cell content. *Histopathology*. (2011) 9:22-30.
 47. Yáñez Y, Grau E, Oltra S, Cañete A, Martínez F, Orellana C, Noguera R, Palanca S, Castel V. Minimal disease detection in peripheral blood and bone marrow from patients with non-metastatic neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. (2011) 137:1263-72.
 48. Schleiermacher G, Michon J, Ribeiro A, Pierron G, Mosseri V, Rubie H, Munzer C, Bénard J, Auger N, Combaret V, Janoueix-Lerosey I, Pearson A, Tweddle DA, Bown N, Gerrard M, Wheeler K, Noguera R, Villamon E, Cañete A, Castel V, et al. Segmental chromosomal alterations lead to a higher risk of relapse in infants with MYCN-non-amplified localized

- unresectable/disseminated neuroblastoma (a SIOPEN collaborative study). *Br J Cancer*. (2011) 105:1940-8.
49. De Preter K, Mestdagh P, Vermeulen J, Zeka F, Naranjo A, Bray I, Castel V, Chen C, Drozynska E, Eggert A, Hogarty MD, Lzycka-Swieszewska E, London WB, Noguera R, Piqueras M, et al. miRNA expression profiling enables risk stratification in archived and fresh neuroblastoma tumor samples. *Clin Cancer Res*. (2011) 17:7684-92.
50. Fieuw A, Kumps C, Schramm A, Pattyn F, Menten B, Antonacci F, Sudmant P, Shulte JH, Roy NV, Vergult S, Buckley PG, Paepe AD, Noguera R, et al. Identification of a novel recurrent 1q42.2-1qter deletion in high risk MYCN single copy 11q deleted neuroblastomas. *Int J Cancer*. (2012) 130:2599-606.
51. Noguera R, Nieto OA, Tadeo I, Fariñas F, Alvaro T. Extracellular matrix, biotensegrity and tumor microenvironment. An update and overview. *Histol Histopathol*. (2012) 27:693-705.
52. Frasson M, Faus C, Garcia-Granero A, Puga R, Flor-Lorente B, Cervantes A, Navarro S, Garcia-Granero E. Pathological evaluation of mesocolic resection quality and ex vivo methylene blue injection: what is the impact on lymph node harvest after colon resection for cancer? *Dis Colon Rectum* (2012) 55:197-204.
53. Illueca C, Machado I, Cruz J, Almenar S, Noguera R, Navarro S, Llombart-Bosch A. Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor: a report of 3 new cases, 1 with sarcomatous myxofibrosarcoma component and another with unreported soft tissue palpebral location. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. (2012) 20:96-101.
54. Navarro S, Piqueras M, Villamón E, Yáñez Y, Balaguer J, Cañete A, Noguera R. New prognostic markers in Neuroblastoma. *Expert Opinion* (2012) 6:555-557.
55. Villamón E, Berbegall AP, Piqueras M, Tadeo I, Castel V, Djos A, Martinsson T, Navarro S, Noguera R. Genetic instability and intratumoral heterogeneity in neuroblastoma with MYCN amplification plus 11q deletion. *PlosOne* (2013) 8.
56. Villamón E, Piqueras M, Meseguer J, Blanquer I, Berbegall AP, Tadeo I, Hernández V, Navarro S, Noguera R. NeuPAT: an intranet database supporting translational research in neuroblastic tumors. *Computers in Biology and Medicine*. (2013). En prensa.