

Analisis de la expresi3n y la funci3n del receptor sensor de calcio en tumores del desarrollo

Carla Casal3 Albacete



Aquesta tesi doctoral est3 subjecta a la llic3ncia Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.

Esta tesis doctoral est3 sujeta a la licencia Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. Espa3a de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.



Universidad de Barcelona

Facultad de Biología

Programa de doctorado en Biomedicina

**“Análisis de la expresión y la función del receptor
sensor de calcio en tumores del desarrollo”**

Laboratorio para el diagnóstico y la investigación
en tumores del desarrollo

Hospital Sant Joan de Déu- Fundació Sant Joan de Déu

Carla Casalà Albacete
Abril, 2013



Universidad de Barcelona

Facultad de Biología

Programa de doctorado en Biomedicina

**“Análisis de la expresión y la función del receptor
sensor de calcio en tumores del desarrollo”**

Memoria que presenta Carla Casalà Albacete para optar al grado
de doctora por la Universidad de Barcelona

VºBº de la directora de tesis
Dra. Carmen de Torres Gómez-Pallete

VºBº de la tutora de tesis
Dra. Adela Mazo Sánchez

La doctoranda
Carla Casalà Albacete

“...els angelets t’han salvat perquè faràs algo bo pels nens...”

Àvia Jose, Hospital Sant Joan de Déu, Febrero 1983

“...este será el primer éxito de muchos...felicidades...”

Alberto Bernaldo de Quirós, 20 Febrero 2011

ÍNDICE

ÍNDICE

Introducción.	1
1. El receptor sensor de calcio.	3
1.1. La proteína CaR.	5
1.2. El gen humano <i>CaR</i> . Estructura y transcritos.	7
1.3. Mutaciones del gen <i>CaR</i> .	9
1.4. Variantes polimórficas del gen <i>CaR</i> .	11
1.4.1. Polimorfismos del exón 7 del gen <i>CaR</i> .	13
1.4.2. Variantes de la región reguladora del gen <i>CaR</i> .	15
1.5. Vías de señalización activadas por <i>CaR</i> .	15
1.6. Expresión y función de <i>CaR</i> en tejidos no neoplásicos.	18
1.7. Expresión y función de <i>CaR</i> en cáncer.	20
2. Los tumores neuroblásticos (TN).	23
2.1. Susceptibilidad genética a desarrollar neuroblastoma.	25
2.2. Comportamiento clínico y tratamiento.	26
2.3. Alteraciones genéticas y factores predictores de pronóstico.	27
2.3.1. Alteraciones genéticas.	28
Aneuploidia.	
Pérdida del cromosoma 1.	
Amplificación del oncogén <i>MYCN</i> .	
Ganancia del cromosoma 17.	
Pérdida del cromosoma 11.	
2.3.2. Factores predictores de pronóstico en neuroblastoma.	30
Edad al diagnóstico.	
Estadio clínico.	
Clasificación anatómo-patológica.	
2.4. Líneas celulares de neuroblastoma.	36
2.5. CaR y PTHrP en tumores neuroblásticos.	37

3. Genes supresores de tumores.	39
3.1. Tipos de genes implicados en el cáncer.	39
3.2. Mecanismos genéticos de regulación transcripcional.	40
3.2.1. Pérdidas alélicas.	41
Hibridación genómica comparada: aCGH.	
Hibridación fluorescente <i>in situ</i> : I-FISH.	
3.3. Mutaciones y polimorfismos.	42
3.4. Mecanismos epigenéticos de regulación transcripcional.	45
3.4.1. Histonas.	45
Inhibición de la desacetilación de las histonas.	
3.4.2. Metilación.	47
Ensayos de desmetilación con el agente 5-aza-2' desoxicitidina (Aza).	
Tratamiento epigenético combinado.	
3.4.3. Modificaciones epigenéticas de los tumores neuroblásticos.	53
3.4.4. Técnicas de análisis del estado de metilación.	54
3.5. Ensayos de sobreexpresión.	56
Hipótesis y objetivos.	
1. Hipótesis.	61
2. Objetivos.	61
Objetivo general.	
Objetivos específicos.	
Resultados	
1. El receptor sensor de calcio está silenciado por mecanismos genéticos y epigenéticos en los neuroblastomas desfavorables y su reactivación induce apoptosis dependiente de ERK1/2.	67
2. Asociación de polimorfismos en el gen del receptor sensor de calcio con la evolución clínica de los neuroblastomas.	91

	Índice
Discusión.	105
Conclusiones.	121
Bibliografía.	127
Abreviaciones.	157
Anexo:	
1. Informe de la directora de tesis acreditando la contribución de la doctoranda a los artículos que sustentan la tesis.	163
Agradecimientos.	169

INTRODUCCIÓN

1. EL RECEPTOR SENSOR DE CALCIO.

El receptor sensor de calcio (CaR o CaSR, del inglés *calcium-sensing receptor*) es un receptor acoplado a proteínas G (*G-protein coupled receptor*, GPCR) que se encuentra expresado en numerosos tejidos del organismo y en algunas neoplasias. El gen fue clonado en 1993 a partir de glándulas paratiroides bovinas (Brown et al, 1993) y dos años más tarde a partir de glándulas paratiroides humanas (Garret et al, 1995). La principal función de este receptor es detectar las fluctuaciones del calcio extracelular y regular consecuentemente la secreción de hormona paratiroidea (PTH) en las glándulas paratiroides y de calcitonina en las células C del tiroides. Estas dos hormonas realizan funciones opuestas con el fin de regular la calcemia y mantenerla dentro de un margen muy estrecho (8,8-10,8 mg/dL) (Devlin, 2004). Así, cuando aumenta la calcemia, se secreta calcitonina y ésta inhibe la resorción ósea y estimula la excreción urinaria de calcio. Por el contrario, cuando la calcemia disminuye, se secreta PTH, que promueve el aumento del calcio plasmático mediante el incremento de la resorción ósea, la reabsorción de calcio en los túbulos renales y la absorción intestinal de este catión (Hofer and Brown, 2003).

Esta estrecha regulación del **calcio** es necesaria para la homeostasis del organismo, ya que este catión divalente participa en numerosas funciones fisiológicas de extrema relevancia como son la transmisión sináptica, la coagulación o la contractilidad muscular. En cáncer, el calcio toma parte en procesos que contribuyen a determinar el destino final de la célula, como son la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (Roderick y Cook, 2008).

Aunque el calcio extracelular se considere el **ligando o activador** por excelencia de CaR, hay diferentes estímulos que pueden modular la actividad de este receptor incluyendo otros cationes divalentes, metales, aminoácidos,

antibióticos, la fuerza iónica y variaciones en el pH entre otros (Brown y McLeod, 2001; Brown et al, 1993; Magno et al, 2011) (**Tabla 1**). Los agonistas fisiológicos y farmacológicos de CaR se pueden dividir entre los que activan directamente al receptor, también llamados activadores de tipo I, y los moduladores alostéricos, o activadores de tipo II, que se unen en la región transmembrana e inducen un cambio conformacional del receptor que lo torna más sensible a los cambios de las concentraciones de los verdaderos agonistas, como el calcio (Magno et al, 2011; Hofer y Brown, 2003).

Tabla 1. Ligandos del receptor sensor de calcio.

1. Tipo I	Agonistas directos	
Cationes divalentes endógenos	Mg ²⁺ y Ca ²⁺	Brown y McLeod 2001
Agonistas	La ³⁺ > Gd ³⁺ > Be ²⁺ > Ca ²⁺ = Ba ²⁺ > Sr ²⁺ > Mg ²⁺	Riccardi 2002
Metales	Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Fe ²⁺ , Ni ²⁺ , Pb ²⁺	Hofer y Brown, 2003
Poliaminas	espermina > espermidina >> putrecina	Quinn et al, 1997
Antibióticos	neomicina > tobramicina > gentamicina > kanamicina	McLarnon et al, 2002
Polipéptidos	Péptidos β-amieloides, poliaminas, péptidos glutámicos (<i>Kukomi</i>)	Magno et al, 2011
Estrés iónico y cambios de pH		Brown y McLeod 2001; Quinn et al, 2004
2. Tipo II	Moduladores alostéricos	
Positivos		
L-Aminoácidos	L-Phe = L-Trp > L-His > L-Ala > L-Glu >> L-Arg = L-Leu	Young y Rozengurt, 2002
Glutación		Bandyopadhyay et al, 2010
Calcimiméticos	Cinacalcet, NPS-R568, NPS-467, calindol	Nemeth et al, 2004 Ward y Riccardi, 2012
Negativos		
Calcilícticos	NPS-2143, NPS-53574, Calhex 231, Ronacaleret	Triverdi et al, 2008 Ward y Riccardi, 2012

1.1. La proteína CaR.

CaR es un miembro de la familia 3 o C de la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (Brown et al, 1993). Esta familia también incluye a ocho receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR1-8), las subunidades de los receptores ácidos γ -aminobutíricos (GABA_{B1} y GABA_{B2}), algunos receptores del gusto (T1R1, T1R2 y T1R3), el receptor de L- α -aminoácidos del grupo 6 subtipo A (GPCR6A) y siete receptores huérfanos (Brown y McLeod, 2001; Hofer y Brown, 2003).

CaR consta de una cadena polipeptídica de 1.078 o 1.085 aminoácidos, en función de la isoforma que se exprese (Garret et al, 1995; Brown et al, 1993). Contiene tres **regiones estructurales** claramente diferenciadas: (a) Un extremo amino-terminal formado por 612 residuos que constituye el dominio extracelular de la proteína; (b) un dominio de anclaje a la membrana formado por siete hélices transmembrana, característico de todos los GPCRs y (c) un extremo carboxilo-terminal intracitoplasmático formado por 216 aminoácidos (Brown et al, 1993; Bai, 2004).

El dominio **extracelular** es estructuralmente similar a los motivos *Venus-Flytrap* de las proteínas de unión periplasmáticas bacterianas (Brown y McLeod, 2001). Este dominio, en el cual tiene lugar la interacción con el calcio, consiste en una estructura con una lámina β central flanqueada por dos lóbulos con α -hélices conectados por tres cadenas (**Figura 1**) (Wellendorph y Bräuner-Osborne, 2009). En este dominio, se hallan residuos críticos para la localización en la membrana celular y para la actividad biológica del receptor, así como la región responsable de la conexión con los dominios transmembrana (Bai et al, 1998; Magno et al, 2011).

El dominio **transmembrana** (TM) incluye siete regiones hidrofóbicas que forman hélices unidas por *loops* alternos intra y extracelulares (Garret et al,

1995). Este dominio participa en la dimerización del receptor a través de interacciones no covalentes en el dominio TM5 y actúa como transductor de señales. La unión al ligando en el dominio extracelular provoca un cambio conformacional de los dominios TM3 y TM4 que induce la activación de proteínas G a través de los *loops* intracelulares 2 y 3 (Bai, 2004). Los moduladores alostéricos se unen a este dominio actuando como agonistas o antagonistas (Bai, 2004).

Figura 1.

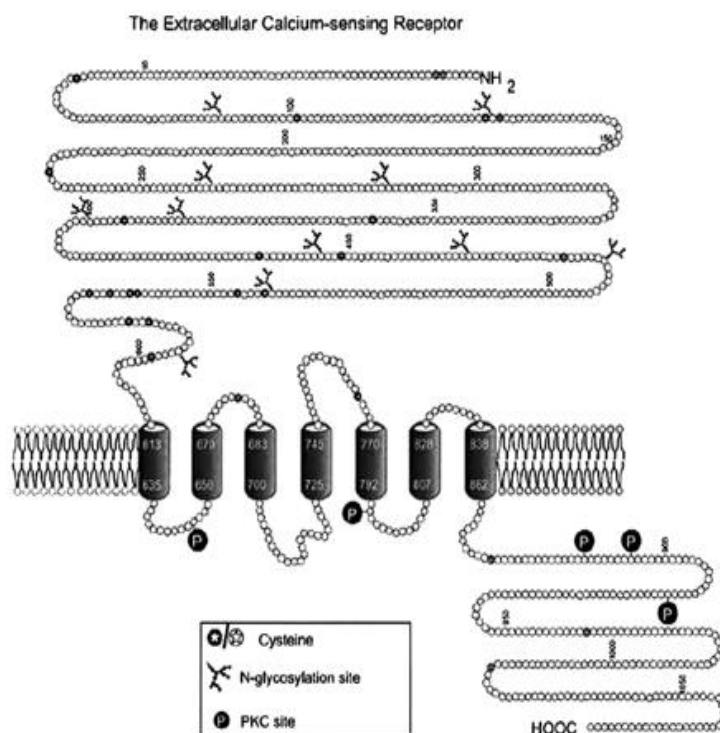


Figura 1. Estructura de la proteína CaR. En la figura están indicados los puntos de N-glicosilación, las cisteínas y los puntos de fosforilación de proteína quinasa C o PKC (Brown y McLeod, 2001).

CaR se expresa en la membrana en forma de **homodímeros**, siendo esta su forma funcional habitual. También se ha detectado CaR formando **heterodímeros** con otros miembros de su familia de GPCRs, como mGluR1 y mGluR5 (Gama et al, 2001). La formación de los dímeros ocurre en el retículo

endoplasmático por uniones covalentes y no covalentes, y es un proceso estabilizado por la unión al ligando (Magno et al, 2011). Las uniones covalentes se realizan a través de puentes disulfuro entre dos cisteínas localizadas en un bucle entre 2 α -hélices del dominio extracelular, mientras que las uniones no covalentes incluyen las uniones hidrofóbicas entre leucinas de los dominios transmembrana (Zhang et al, 2001; Jensen et al, 2002; Pidasheva et al, 2004). Estos dos tipos de uniones definen los dos dominios funcionales de CaR: el dominio extracelular y otro que incluye el tercer *loop* intracelular y la cola carboxilo-terminal (Brown y McLeod, 2001; Bai, 2004). Cuando se une el ligando, una de las hélices responsables de la formación de los puentes disulfuro sufre un cambio de conformación que permite la activación del receptor (Hofer y Brown, 2003; Bai, 2004).

Para la correcta localización subcelular de CaR así como para su funcionalidad, se requiere un proceso de glicosilación que ocurre en el aparato de Golgi (Ray et al, 1998). De este modo, existen dos formas de CaR, la forma no glicosilada y las dos formas glicosiladas: una N-glicosilada con carbohidratos con alto contenido en manosa (forma inmadura) y la otra con carbohidratos complejos (forma madura) (Bai et al, 1998).

1.2 El gen humano *CaR*. Estructura y transcritos.

El gen humano *CaR* se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 3, concretamente en la región 3q13.3-21 (Janicic et al, 1995). Se estructura a lo largo de 106894 pb, incluyendo las regiones reguladoras y las repeticiones (Brown y McLeod, 2001). Este gen está formado por **siete exones** de los cuales seis son codificantes (exones 2 a 7) (Pollak et al, 1993; Cole et al, 2009) y dos son exones 1 alternativos y no codificantes (exones 1A y 1B) (Garret et al, 1995) (**Figura 2**).

El exón 1A se halla precedido por el **promotor 1** (P1) que contiene cajas TATA y CAAT (-26 y -110 nucleótidos, respectivamente). El exón 1B está precedido por el **promotor 2** (P2) que es rico en dinucleótidos de citosina y guanina (CGs) (Chikatsu et al, 2000). Los dos promotores contienen elementos de respuesta a vitamina D (VDRE), (Sergeev et al, 2005), elementos de respuesta a NF- κ B (Canaff and Hendy, 2005) y elementos de respuesta a GCM (del inglés *Glial cells Missing*) (Mizobuchi et al, 2009).

Figura 2.

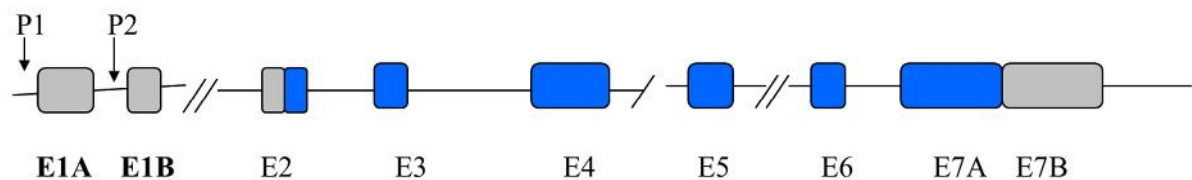


Figura 2. Esquema de los exones del gen *CaR*. En gris, se representan las zonas no codificantes y en azul los exones codificantes. P1 es el promotor 1 y P2 el promotor 2. E=exón. Modificado de Cole et al, 2009.

El exón 2 contiene 242 nucleótidos de la región 5' no transcrita, el codón de inicio (ATG), la señal de secuencia de péptido y los nucleótidos que codifican para el inicio del dominio extracelular. Los exones del 3 al 6 codifican para la mayor parte del dominio extracelular; y el exón 7 para el final del dominio extracelular, el dominio transmembrana y el dominio intracelular, responsable de la transducción de señal (Cole et al, 2009). Este último exón contiene además dos secuencias de poliadenilación (AATAAA) responsables del distinto tamaño de la región 3' no transcrita (177 o 1304 nucleótidos).

Existen varias **formas de *splicing* alternativo** del gen *CaR*. Entre ellas, se han descrito variantes que dan lugar a una proteína más corta, como las que difieren en la región 5' no transcrita y una mutación de *splicing* en la posición -1 del intrón 2 (IVS2-1 G>T) (D'Souza-Li et al, 2001). Además, se ha descrito una

inserción de 30 nucleótidos en el dominio extracelular que no parecen tener efecto sobre su funcionalidad (Garret et al, 1995; Brown y McLeod, 2001) y una variante sin el exón 3 que inactiva al receptor (Bradbury et al, 1998). Por último, en queratinocitos se describió una variante sin el exón 5 que da lugar a una delección con desplazamiento del marco lectura de 77 aminoácidos. Esta variante codifica para una proteína inactiva debido a que presenta un patrón de glicosilación inmaduro que impide su localización en la membrana celular (Oda et al, 1998; Chia-Ling et al, 2001). Durante el proceso de diferenciación de los queratinocitos, el transcrito de *CaR* original disminuye a favor de la variante de *splicing* sin el exón 5 (Chia-Ling et al, 2001), coincidiendo con una disminución de la sensibilidad al calcio de estas células (Oda et al, 1998). En estas células, sólo la forma completa de CaR es capaz de mediar el aumento de inositol trifosfato inducido por el calcio extracelular, mientras que la forma sin el exón 5 reduce esta respuesta (Oda et al, 1998). Posteriormente, se describió esta variante en condrocitos, riñón y pulmón, con la particularidad de que en condrocitos y células pulmonares en desarrollo, esta forma de *CaR* se localiza en membrana y es capaz de suplir la función de la forma completa del receptor (Rodríguez et al, 2005; Finney et al, 2011). En neuroblastoma, nuestro grupo describió la presencia de ambos transcritos sólo en estadios avanzados de diferenciación de las células neuroblásticas cuando la expresión de *CaR* es mayor (de Torres et al, 2009).

1.3 Mutaciones del gen *CaR*.

El **genotipo** es el conjunto de genes que posee una célula y que determina la expresión de los rasgos característicos de cada tipo celular (fenotipo). Los genes pueden presentar variaciones en su secuencia que modifican su expresión o funcionalidad y que juegan un papel muy importante en la etiología de algunas enfermedades, entre ellas el cáncer.

Las **mutaciones** son cambios permanentes y heredables en la secuencia de ADN que dan lugar a una modificación de la función de un gen y que normalmente se asocian a un fenotipo perjudicial (Lodish et al, 2000). Se trata de variantes con elevada penetrancia y con una frecuencia de aparición del alelo más raro de menos del 1% de la población.

Se han descrito numerosas mutaciones que generan ganancia o pérdida de función de CaR. Las primeras son responsables de la hipocalcemia con hipercalcemia autosómica dominante (Hendy et al, 2000). Las mutaciones que provocan pérdida de función de CaR pueden hallarse en heterocigosis y dar lugar al hiperparatiroidismo familiar con hipercalcemia, mientras que en homocigosis causan el hiperparatiroidismo neonatal severo (Pollak et al, 1993; Janicic et al, 1995).

Se han descrito más de 130 mutaciones inactivadoras y 71 activadoras agrupadas principalmente en los exones 3, 4, 6 y 7 (Pidasheva et al, 2004; ver www.casrdb.mcgill.ca). Las mutaciones inactivadoras están repartidas a lo largo de toda la proteína. Se trata de mutaciones de cambio de sentido, sin sentido, de *splicing* y deleciones/inserciones (Pidasheva et al, 2004). Sin embargo, las mutaciones que generan ganancia de función no se distribuyen al azar (Hu et al, 2005): el 52% se encuentran en la región responsable de la homodimerización del dominio extracelular (Zhang et al, 2001; Al-Salameh et al, 2011) aumentando la hipersensibilidad al calcio y provocando que el receptor está activado constitutivamente (Jensen et al, 2002; Hofer y Brown, 2003); el 42% están localizadas en la región transmembrana (TM), agrupándose en el dominio TM6 y TM7 (23% y 30% de las mutaciones TM, respectivamente) (Hendy et al, 2000, Pidasheva et al, 2004) y provocando variaciones en la activación de CaR por unión a proteínas G (Ward et al, 2004). Sólo el 6% de las mutaciones activadoras se encuentran en el dominio intracelular (Lazarus et al, 2011, Cole et al, 2009).

1.4. Variantes polimórficas del gen *CaR*.

Además de las mutaciones, se han identificado **variantes genéticas** de *CaR*. Un **polimorfismo de nucleótido simple** (SNP) es una variación en la secuencia de un locus determinado que se presenta en al menos un 1% de la población (Risch, 2000) (ver sección 3.2.2).

Los **polimorfismos no sinónimos** de la región codificante, consisten en la sustitución de una base que causa una alteración en la traducción de un codón, afectando a la funcionalidad de la proteína resultante. Un SNP no sinónimo de sentido erróneo (*missense*) resulta en un cambio de aminoácido que afecta la función de la proteína, mientras que un SNP no sinónimo sin sentido provoca la aparición de un codón de parada y, por tanto, una proteína más corta. Cuando la variación en la secuencia no provoca ningún cambio de aminoácido o no tiene ningún efecto fenotípico detectable, se denomina **polimorfismo sinónimo** o silente (Savas y Liu, 2009).

Los SNPs de la misma región cromosómica no se heredan al azar, sino que se transmiten en combinaciones de alelos que forman bloques de **haplotipos** (Gabriel et al, 2002; Erichsen y Chanock, 2004). Un bloque de haplotipos es una combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma entre los que no ocurre recombinación y que, por tanto, se heredan conjuntamente, en bloque.

Se han descrito más de 450 SNPs del gen *CaR* que se dividen en 3 bloques de haplotipos localizados en el extremo 5' y 3' reguladores, y en el dominio codificante. El primer bloque (33 kb) consiste en los seis primeros SNPs del gen *CaR* que se localizan en la región 5' no transcrita, los dos promotores y una porción del primer intrón. El segundo bloque (28 kb) consiste en 4 SNPs e incluye gran parte del intrón 1. Por último, el tercer bloque (32 kb)

se localiza entre el tercer intrón y la parte inicial de la región 3' no transcrita e incluye 4 SNPs (Vezzoli et al, 2010).

Figura 3.

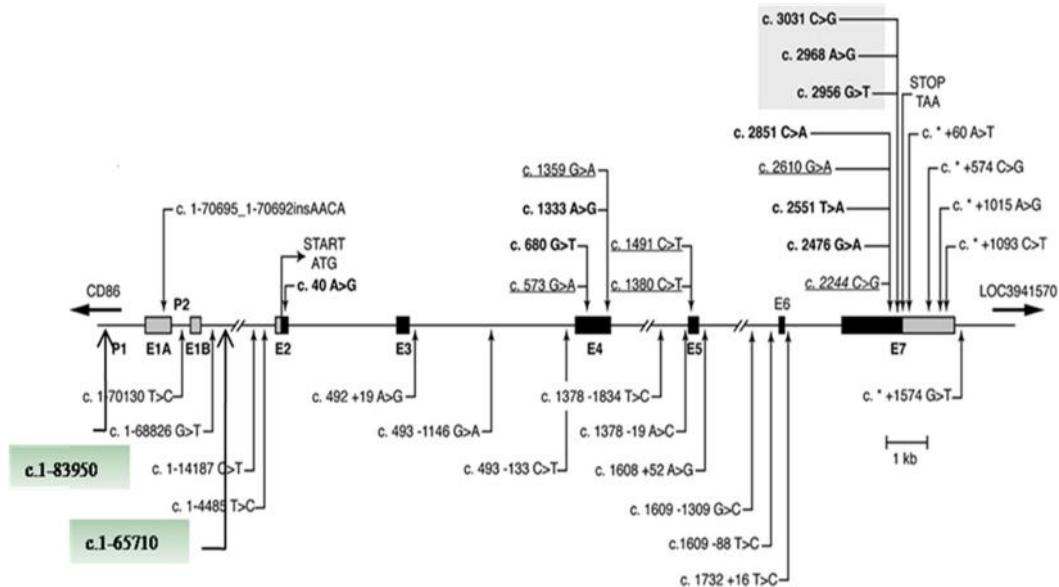


Figura 3. Polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) del gen *CaR*. Se representan los exones codificantes (2-7) en negro y los exones no codificantes en gris. Los SNPs codificantes se representan en la parte superior y los no codificantes en la parte inferior de la línea. Los SNPs sin sentido se representan en negrita y los silenciosos están subrayados. Los SNPs del exón 7 y de la región reguladora mejor estudiados se representan en un cuadro gris y en verde, respectivamente (Yun et al, 2007).

La mayoría de los polimorfismos de *CaR* se encuentran en la región intrónica después del exón 2 y son no sinónimos (Yun et al, 2007). Entre los SNPs encontramos variantes sin sentido neutras que no son comunes en la población general como T14A (c.40A>G, rs199515839) en el exón 2 o A826T (c.2551 T>A, rs201328344) y C851S (c.2581T>A, rs200777304) en el exón 7 (Baron et al, 1996; Yun et al, 2007). Además, en pacientes con adenoma de paratiroides esporádico se ha identificado el polimorfismo A826T en la región transmembrana (Cetani et al, 1999).

También se han identificado variantes exónicas sinónimas o silenciosas y variantes intrónicas que podrían afectar la funcionalidad o la expresión de *CaR* (Yun et al, 2007). En el exón 1A, se ha descrito el polimorfismo rs10576069 (c.1-70695_1-70694) debido a la inserción/delección del tetranucleótido (AACA) que causa una inserción/delección de 339 pb y es bastante frecuente en la población (Yun et al, 2007). También se postula, que el SNP del intrón 1 rs1501899 puede afectar el splicing del ARNm o este SNP está en desequilibrio de ligamiento con otros SNPs afectando la actividad de CaR (Vezzoli et al, 2011).

1.4.1. Polimorfismos del exón 7 del gen *CaR*.

Las tres variantes polimórficas no sinónimas más relevantes desde el punto de vista funcional se localizan en el exón 7 y codifican para cambios no conservativos de aminoácidos en la cola amino-terminal de la proteína (**Figura 3**). Se trata de los cambios c.2956 G>T (A986S, rs1801725), c.2968 A>G (R990G, rs1042636) y c.3031 G>C (Q1011E, rs1801726) (Hendy et al, 2000; Yun et al, 2007). En el codón 986, la alanina hidrofóbica apolar es substituida por una serina polar pero sin carga dando lugar a una variante que genera una pérdida de función de CaR. En el codón 990, la arginina con carga positiva es substituida por una glicina polar sin carga dando lugar a una variante con ganancia de función. Por último, en el codón 1011 una glutamina polar sin carga es substituida por un ácido glutámico cargado negativamente. De momento, no se conoce el efecto promovido por este cambio (Harding et al, 2006; Yun et al, 2007). Estos polimorfismos se presentan con diferente frecuencia en distintos grupos étnicos. Así, el alelo minoritario del SNP rs1801725 (986S) es el más frecuente en caucásicos, el alelo 990G es más común en poblaciones asiáticas y el alelo 1011E es más frecuente en poblaciones de origen africano (Yun et al, 2007).

Estas tres variantes genéticas de *CaR* (A986S, R990G y Q1011E) son de especial interés ya que se ha descrito asociación entre la presencia de algunos de estos polimorfismos y la predisposición genética a desarrollar patologías diversas como alteraciones minerales y óseas, hipertensión o diabetes (Yun et al, 2007). Así, por ejemplo, el polimorfismo **rs1801725** (A986S), que promueve una disminución moderada de la actividad de *CaR*, fue asociado con la variación en los niveles de calcio sérico en pacientes con hipercalcemia e hipocalciuria (Cole et al, 1999; Miedlich et al, 2001; Scillitani et al, 2004; He et al 2012), así como con mayor riesgo de desarrollar hiperparatiroidismo primario (Kapur et al, 2010) y enfermedad arterial coronaria (März et al, 2007).

Por otro lado, el polimorfismo **rs1042636** (R990G), que genera una forma de *CaR* con ganancia de función, también fue asociado a cambios en los niveles de calcio sérico en pacientes con hipercalcemia y nefrolitiasis (Vezzoli et al, 2011). Finalmente, el SNP **rs1801726** (Q1011E), que es común en población con ancestros africanos, se ha relacionado con aumento en los niveles de calcio y de hormona paratiroidea en pacientes con hiperparatiroidismo primario (Miedlich et al, 2001).

Se ha analizado la posible asociación de estos tres SNPs con la susceptibilidad a desarrollar algunas neoplasias. Así, por ejemplo, el polimorfismo **rs1801725** se ha asociado a un mayor riesgo de desarrollar adenoma de paratiroides en varones caucásicos (Miedlich et al, 2001) y cáncer colorectal en población húngara (Bácsí et al, 2008). Además, se halló que la presencia de uno o más alelos minoritarios de las tres variantes (986S, 990G, 1011E) se asocia significativamente a la reducción en el riesgo de desarrollar adenoma colorectal avanzado (Peters et al, 2004). Unos años más tarde, el mismo grupo describió la asociación de las variantes de *CaR* con el cáncer de colon proximal sin relación con el de localización distal (Dong et al, 2008).

En el cáncer de próstata, a diferencia del cáncer de paratiroides y colon (ver sección 1.6), el aumento en la actividad de *CaR* se asocia a mal pronóstico. La presencia del alelo minoritario de rs1801725 en pacientes con cáncer de próstata se ha relacionado con progresión de la enfermedad cuando los niveles de vitamina D son bajos (Shui et al, 2013). Por último, la presencia del alelo minoritario de rs1801726 se ha asociado a formas menos agresivas de cáncer de próstata en población afroamericana (Schwartz et al, 2010), aunque serán necesarios análisis en poblaciones más amplias para corroborar estos datos.

1.4.2. Variantes de la región reguladora del gen *CaR*.

La región reguladora del gen *CaR* incluye la región 5' no transcrita, los promotores y los intrones 1A y 1B. Se han descrito dos SNPs en esta región (rs7652589 y rs1501899) potencialmente asociados a la variación en la expresión del receptor (Vezzoli et al, 2010) (**Figura 3**). Un análisis bioinformático sugirió que la presencia de estos SNPs podría afectar la unión de factores de transcripción que normalmente activarían *CaR*, provocando una disminución en la expresión del receptor (Vezzoli et al, 2012). Estas dos variantes se asocian además al fenotipo de los pacientes con hiperparatiroidismo acompañado de aumento en la susceptibilidad de desarrollar nefrolitiasis (Vezzoli et al, 2011).

1.5. Vías de señalización activadas por *CaR*.

La región de unión a ligando del dominio extracelular de *CaR* así como la unión de los dos receptores a través de los dominios transmembrana y las interacciones de estos dominios con proteínas G son importantes para la correcta señalización de *CaR* (Hofer y Brown, 2003; Bai, 2004). Como es común en los GPCRs, la señalización se inicia por la activación de proteínas G heterotriméricas. Se ha demostrado que *CaR* se une a la pareja $G\alpha_{i/0}$ y $G\alpha_{q/11}$

(Brown y McLeod, 2001; Hofer y Brown, 2003; Ward, 2004) y algunos los datos sugieren que también puede interactuar con $G\alpha_{12/13}$ (Saidak, 2009) y con $G\alpha_s$ (Mamillapalli et al, 2008). A continuación, las vías de señalización que se activan como consecuencia de la interacción con las proteínas G (**Figura 4**) parecen variar considerablemente de un tipo de célula a otra (Mamillapalli et al, 2008; Ward y Riccardi, 2012).

El acoplamiento de CaR con $G\alpha_{i/0}$ y $G\alpha_{q/11}$ se asocia con la activación de la fosfolipasa C (PLC), un aumento transitorio del segundo mensajero inositol-3-fosfato (IP3) y la liberación del calcio almacenado en el compartimiento intracelular activando a PKC (Brown y McLeod, 2001; Hofer y Brown, 2003; Ward, 2004). Este acoplamiento también se asocia al inicio de las cascadas de MAPK (del inglés *mitogen-activated protein kinase family*), incluyendo las serina/treonina quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) 1 y 2, la quinasa 38 (p38MAPK) y la quinasa activada por estrés c-Jun N-terminal (JNK) (Kifor et al, 2001; Ward, 2004).

La vía de ERK1/2 se activa a través de la vía de PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa), PKC y filamina (Ward 2004; Hobson et al, 2003), así como por la activación de receptores tirosina quinasa a través de la cascada de señalización de la proteína de unión a GTP de bajo peso molecular, p21 Ras (Smajilovic y Tfelt-Hansen 2007). La señal de activación de Ras-Raf fosforila y activa a MEK 1/2 (MAPK/ERK quinasa). Finalmente, se activa ERK 1/2, que una vez fosforilado, es capaz de localizarse en el núcleo uniéndose al ADN y regulando procesos celulares como la diferenciación, proliferación, apoptosis y ciclo celular (Chang y Karin, 2001).

Figura 4.

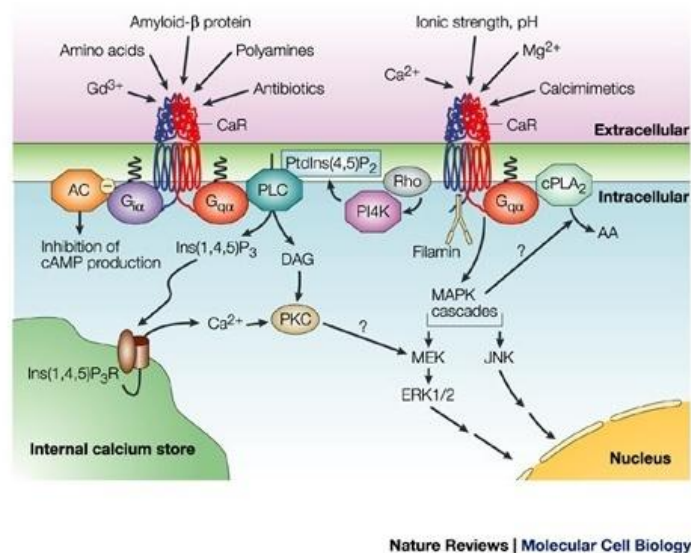


Figura 4. Vías de señalización activadas por el receptor sensor de calcio (Hofer y Brown, 2003)

Además de la vía de PLC, CaR activa otras dos fosfolipasas: fosfolipasa D (PLD) y fosfolipasa A₂ (PLA₂). Esto promueve la formación de ácido fosfatídico y ácido araquidónico respectivamente. La vía de PLD está relacionada con la vía de Rho y con el acoplamiento con $G_{\alpha_{12/13}}$ (Huang et al, 2004) y la vía de PLA₂ se activa por acoplamiento a G_q (Ward, 2004) y parcialmente por activación de PKC (Magno et al, 2011).

En algunos tipos celulares como HEK-293, células paratiroides y hepatocitos, la activación de CaR disminuye las concentraciones de AMPc a través de la inhibición de la adenilato ciclasa por acoplamiento a G_{α_i} . Se cree que no es una vía importante en la regulación de la secreción de PTH (Hofer y Brown, 2003; Ward, 2004) pero sí lo es en la habilidad de CaR para aumentar la secreción de *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP, ver más abajo) en células de cáncer de mama (Mamillapalli et al, 2008).

Por último, CaR en su cola intracelular interacciona con filamina A y con las proteínas que controlan su degradación. Estas últimas son las quinasas asociadas a proteínas G (GRKs) como dorfina, la molécula asociada a SH3 (AMSH) y las β -arrestinas (Magno et al, 2011; Smajilovic y Tfelt-Hansen 2007; Rey et al, 2005). Dorfina interacciona con la cola carboxilo-terminal de CaR y reconoce los monómeros disfuncionales del receptor en el retículo endoplasmático, promoviendo la ubiquitinización y degradación de las moléculas de CaR inmaduras por el proteosoma (Huang et al, 2006). La interacción con filamina A es necesaria para la señalización del receptor a través de la vía de ERK1/2 (Awata et al, 2001), JNK, PI4K (fosfatidilinositol-4-quinasa) y Rho (Huang et al, 2004 y 2006), así como para evitar su degradación (Zhang y Breitwieser, 2005). Además, la interacción de filamina A con caveolina 1, explica la localización de CaR en invaginaciones regiones ricas en colesterol, las denominadas caveolas (Hofer and Brown, 2003; Ward, 2004).

1.6. Expresión y función de CaR en los tejidos no neoplásicos.

El receptor *CaR* se expresa predominantemente en la glándula **paratiroides**, donde suprime la secreción de PTH (Brown et al, 1993), restringe la proliferación de las células paratiroides (Brown, 2007; Magno et al, 2011) e inhibe su tumorigénesis (Saidak et al, 2009).

La expresión de *CaR* también es elevada en el **riñón**, donde limita la reabsorción de calcio protegiendo frente a la hipercalcemia (Kantham et al, 2009). Este receptor, se halla expresado a lo largo de las nefronas con un patrón de expresión diferenciado que podría explicar su función especializada en cada segmento (Morgan et al, 2011; Ba y Friedman, 2004; Riccardi y Brown, 2010).

En el **hueso**, la activación de *CaR* induce un aumento de la proliferación, diferenciación y mineralización en osteoblastos (Dvorak et al, 2004) y una inhibición de la reabsorción ósea e inducción de diferenciación y apoptosis de los osteoclastos (Chang et al, 2008). Además, en la **médula ósea** adulta, *CaR* es capaz de estimular la correcta localización de las células madre hematopoyéticas en su nicho (Lam et al, 2011).

En la **glándula mamaria**, la expresión de *CaR* es reducida y constante durante el desarrollo puberal. Sin embargo, durante la lactancia su expresión es máxima en las células del epitelio de los ductos, regulando el transporte de calcio a la leche e induciendo aumento de la proliferación (Russo et al, 1989; VanHouten et al, 2004). *CaR* parece tener también un papel en la regulación de la maduración meiótica de los **oocitos** (de Santis et al, 2009).

Se ha descrito expresión de *CaR* en gran parte del **tracto gastrointestinal** (Justinich et al, 2008). En el colon sano, hay un gradiente en la expresión de *CaR* en las criptas colónicas que coincide con los niveles de calcio: las células indiferenciadas que proliferan rápidamente en la base de la cripta no expresan *CaR*, mientras que las células gradualmente más diferenciadas que ascienden a lo largo de la cripta presentan un nivel más alto de expresión, siendo este máximo en la parte más alta de esta, donde las células ya han alcanzado su estado de diferenciación final (Varani, 2011; Hebert et al, 2004).

En la **piel**, *CaR* media la diferenciación y apoptosis de los queratinocitos inducida por el calcio y estimula la expresión de E-cadherina regulando la formación de las uniones celulares adherentes del epitelio maduro (Tu et al, 2001). La expresión de *CaR* está regulada durante el desarrollo. Así, *CaR* se expresa en las células epiteliales en desarrollo o en respuesta a una lesión y su expresión disminuye cuando las células están en etapas de diferenciación terminal (Arabzadeh et al, 2009).

Durante el desarrollo postnatal del cerebro (1-3 semanas), la expresión de CaR es elevada en neuronas y células gliales, en las que regularía la proliferación y secreción de PTHrP. Se le ha adjudicado también un papel en enfermedades como el Alzheimer o la epilepsia (Bandyopadhyay et al, 2010), aunque estos datos son todavía poco concluyentes.

En el **pulmón**, la expresión de *CaR* es máxima durante el desarrollo embrionario durante el cual contribuye a la morfogénesis de este órgano. En cambio *CaR* no se expresa en el pulmón maduro (Finney et al, 2011).

CaR contribuye también al desarrollo cardíaco, así como a su función y homeostasis (Tfelt-Hansen et al, 2006). Se ha detectado la expresión de *CaR* (proteína y ARNm) en la microvasculatura endotelial del corazón y en los miocitos, en los que se ha relacionado su expresión con la inducción de apoptosis y la respuesta a hipoxia (Sun et al, 2006). También se ha descrito expresión de *CaR* en el ventrículo y la aurícula del corazón donde participa en el proceso de excitación-contracción del corazón (Tfelt-Hansen et al, 2006). Además, en los vasos sanguíneos *CaR* controla el tono muscular y la presión arterial (Smajilovic y Tfelt-Hansen, 2007).

Por último, se ha identificado también expresión de *CaR* en las **papilas gustativas**. Al parecer, *CaR* tendría un papel en la capacidad para detectar el gusto del calcio y de los aminoácidos (denominado gusto "*kokumi*") (revisado en Wellendorph et al, 2010).

1.7. Expresión y función de CaR en cáncer.

Se ha descrito expresión de *CaR* en diversas neoplasias, pero este receptor parece ejercer funciones distintas en función del contexto celular en el que se halla (Saidak et al, 2009). En cuanto a las neoplasias de paratiroides, el tejido por excelencia donde se expresa *CaR*, se ha descrito que los niveles de

expresión de este GPCR se hallan disminuidos en las hiperplasias y en los adenomas, mientras que en los carcinomas se halla casi completamente abolida su expresión (Romoli et al, 1999; Witteveen et al, 2011). Cuando se ha analizado si las mutaciones contribuyen a la inactivación genética de *CaR* en estas neoplasias, no se ha podido detectar ninguna (Hosokawa et al, 1995; Cetani et al, 1999).

Figura 5.

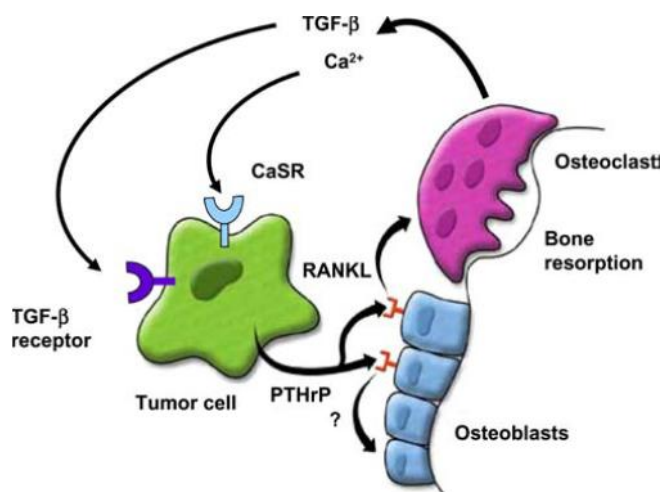


Figura 5. Esquema que describe el círculo vicioso propuesto para explicar el papel de CaR y PTHrP como ventaja biológica para las células que conforman las metástasis óseas (Liao y McCauley, 2006).

Pero es el contexto de las metástasis óseas de algunas neoplasias donde se ha invocado una función de CaR más crucial en cáncer. El microambiente óseo proporciona condiciones favorables para el crecimiento de varios tipos de cáncer debido a los factores liberados durante la remodelación ósea (transforming growth factor (TGFβ), Insulin-like growth factor 1 (IGF-I), parathyroid hormone-related peptide (PTHrP), platelet-derived growth factor (PDGF)...etc.). Estos factores atraen a las células tumorales facilitando el inicio y desarrollo de las metástasis (Saidak et al, 2009). En este proceso, parece jugar un papel relevante PTHrP. Este péptido fue identificado como un factor

producido por algunos tumores causantes de la hipercalcemia maligna paraneoplásica (Suva et al, 1987). En algunos tipos de tumores, PTHrP es secretado por las células tras la activación de CaR inducida por el elevado calcio extracelular del microambiente óseo (Dittmer et al, 2006; Gessi et al, 2007; Liao y McCauley, 2006; Tfelt-Hansen et al, 2003). PTHrP estimula además la remodelación ósea, proceso que a su vez provoca la liberación de factores de crecimiento como TGF β . Este círculo vicioso (Figura 5) se ha descrito principalmente en metástasis óseas de cáncer de mama y próstata (Yano et al, 2004; Journé et al, 2004).

Se ha sugerido que la activación de *CaR* contribuye a la patogénesis de varios tipos de cáncer pancreático endocrino, incluyendo insulinomas, gastrinomas y tumores vasoactivos intestinales secretores de polipéptidos como los tumores carcinoides (Saidak et al, 2009). También se ha descrito *CaR* en la línea de astrocitoma U87 y en meningiomas (Chattopadhyay et al, 2000).

En **cáncer de colon**, la expresión de *CaR* en carcinomas diferenciados está disminuida con respecto al epitelio colónico normal y se halla prácticamente ausente en carcinomas indiferenciados, agresivos (Chakrabarty et al, 2005; Varani et al, 2011). Debido a que el aumento de calcio disminuye la proliferación e incrementa la diferenciación de las células epiteliales del colon, se cree que la disminución de la expresión o pérdida de la funcionalidad de *CaR* contribuye a la indiferenciación y proliferación anormales de estas células, y por tanto a la progresión del cáncer de colon (Saidak et al, 2009; Bhagavathula et al, 2005).

Nuestro grupo fue el primero en describir la expresión de CaR y PTHrP en un **tumor del desarrollo: los tumores neuroblásticos** (de Torres et al, 2009).

2. LOS TUMORES NEUROBLÁSTICOS (TN).

En 1865, el patólogo alemán Rudolf Ludwig Karl Virchow describió por primera vez el aspecto histológico de los tumores neuroblásticos como “distensiones nodulares de la glándula suprarrenal con dos o tres tumefacciones del tamaño de un guisante o cereza, que surgían de la medula suprarrenal” (Virchow, 1865). No fue hasta 1910 cuando el Dr. James Homer Wright emplea por primera vez el término “neuroblastoma” (NB) (Wright, 1910; Rothenberg et al, 2009).

Los tumores neuroblásticos (TN) son los tumores **sólidos extracraneales** más comunes en la infancia. Si se consideran todas las enfermedades neoplásicas de la edad pediátrica, sólo se hallan precedidos en frecuencia por las leucemias, los tumores del sistema nervioso central (SNC) y los linfomas (Mora y Gerald, 2004).

Los TN incluyen a los neuroblastomas (NB), ganglioneuroblastomas (GNB) y ganglioneuromas (GN). Representan aproximadamente el 40% de todos los tumores sólidos durante los primeros 4 años de la vida (Castleberry 1997; Schwab et al, 2003; Ora and Eggert, 2011) y son los responsables del 15% de todas las muertes por cáncer en niños (Kaatsch, 2010). La incidencia de esta enfermedad se sitúa en torno a un caso por cada 7000 recién nacidos vivos (Brodeur y Maris, 2002; Gatta et al, 2012). El 90% se diagnostican antes de los 5 años y la edad media al diagnóstico de 17 meses (Maris, 2010; Howman-Giles et al, 2007).

Los TN se originan a partir de células precursoras derivadas de la cresta neural ya comprometidas en las vías de diferenciación del sistema nervioso simpático. Por motivos aún desconocidos, sufrirían una alteración durante el proceso de diferenciación normal y quedarían retenidas en un estadio de

indiferenciación y gran capacidad para proliferar (Mora y Gerald, 2004; van Noesel 2012).

El origen embrionario de los TN explica el espectro de localizaciones anatómicas que pueden presentar estas lesiones tumorales (Ora and Eggert, 2011) (**Figura 6**). Mayoritariamente, el tumor primario se localiza en la médula suprarrenal, seguido de los ganglios simpáticos abdominales, torácicos, cervicales y pélvicos (Berthold y Simon 2005; Mora et al, 2006) (**Figura 6**). Más del 60% de los pacientes presentan diseminación metastásica al diagnóstico, siendo la localización más frecuente en los ganglios linfáticos, médula ósea, hígado, piel, órbita y hueso. Infrecuentemente, pueden presentarse metástasis en pulmón o SNC (Brodeur y Maris, 2002; Castleberry, 1997; Kushner 2004).

Figura 6.

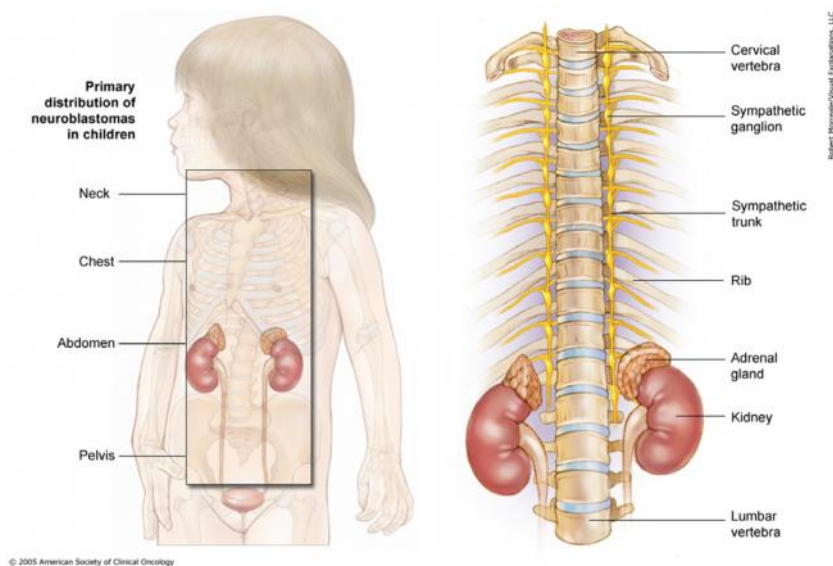


Figura 6. Localización anatómica de los TN. Adaptación de *American Society of Clinical Oncology*.

Los casos loco-regionales tienen en general un pronóstico excelente, pero la mortalidad global de los NB metastásicos continúa siendo muy elevada (30-40%), a pesar de los avances terapéuticos y los últimos protocolos de quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia (Maris, 2010; Brodeur y Maris, 2002; Schilling et al, 2002; Gatta et al, 2012).

2.1. Susceptibilidad genética a neuroblastoma.

La mayoría de los NBs ocurren de manera esporádica. Sólo un 2% de casos aproximadamente se presentan en forma de asociación familiar con un patrón de transmisión autosómico dominante. Estos pacientes tan poco frecuentes tienen una edad media de presentación menor (9 meses) y una mayor probabilidad de desarrollar tumores multifocales. Las mutaciones en el gen *ALK* (del inglés *anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase*) y en el gen *PHOX2B* (del inglés *paired-like homeobox 2b*) explican la mayoría de casos de NB familiar (revisado en Fisher y Tweddle, 2012; Mosse et al, 2004).

No se conoce con exactitud el origen o causa de los NB de presentación esporádica. En los últimos años, se han acumulado evidencias que parecen indicar que la transformación maligna de los precursores del sistema nervioso periférico que finalmente dan lugar a estos tumores dependería de la acumulación de variantes comunes de ADN, que de manera individual tienen un efecto modesto sobre la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad (Maris, 2010). Entre ellos, se encuentran polimorfismos en *FLJ22536* (6p22) (del inglés *long intergenic non-protein coding RNA 340*) (Maris, et al 2008); *BARD1* (2q35) (del inglés *BRCA-1-associated RING domain-1*) (Capasso et al, 2009), *LMO1* (11p15) (del inglés *LIM domain only 1*) (Wang et al, 2011), *HACE1* (del inglés *HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase 1*) y *LIN28B* (6q16) (LIN homólogo 28) (Diskin et al, 2012).

Algunos polimorfismos contribuirían no tanto a la aparición de estos tumores sino a su comportamiento biológico. Así, SNPs en el gen *LMO1* se asocian con un fenotipo más agresivo (Wang et al, 2011). También, un polimorfismo en el promotor de la citoquina pro-inflamatoria IL6 (interleucina 6), responsable de un aumento en la expresión de este gen, ha resultado ser un marcador de pronóstico independiente para supervivencia global y libre de eventos en NB de alto riesgo (Lagmay et al, 2009).

Otros polimorfismos, en cambio, parecen asociarse a un fenotipo más benigno. Entre ellos, los SNPs del gen *DUSP12* (del inglés *dual-specificity phosphatase 12 gene*), *DDX4* (del inglés *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 isoform*), *IL31RA* (del inglés *interleukin-31 receptor precursor 4*) y *HSD17B12* (del inglés *hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12*) (Nguyen et al, 2011).

2.2. Comportamiento clínico y tratamiento.

Los TN pueden presentar un comportamiento clínico muy variable que incluye la regresión espontánea, la maduración o diferenciación y la proliferación agresiva local acompañada de diseminación metastásica (Ambros et al, 1995; Mora y Gerald, 2004; Brodeur et al, 1984 y 2003).

Existen tumores neuroblásticos con capacidad de experimentar una **regresión espontánea** completa en ausencia de cualquier intervención terapéutica (D'Angio et al, 1971, Schwab et al, 2003). La involución espontánea es un fenómeno bien documentado en NB estadio 4S (Teitz et al, 2000; Maris et al, 2010) así como en algunos tumores loco-regionales sin terapia citotóxica. El NB estadio 4S es una enfermedad metastásica (estadio 4) especial (S por *special* en inglés) que se diagnostica en lactantes menores de 1 año cuyo tumor primario se acompaña de diseminación a hígado, piel y médula ósea (con un

grado de infiltración <10%) pero sin afectación del hueso ni amplificación del oncogén *MYCN* (D'Angio et al, 1971; ver más abajo). Estos pacientes pueden ser tributarios sólo de observación clínica estrecha mientras tiene lugar la regresión, o bien precisar de una mínima quimioterapia que ayude a inducir este proceso.

Los TN **loco-regionales** pueden tener la capacidad de diferenciarse o **madurar**, lo cual limita su progresión. Estos tumores pueden requerir sólo extirpación quirúrgica, y se asocian con índices de supervivencia excelentes (Mora et al, 2006; Ambros et al, 2009). Sin embargo, existe un subgrupo de tumores loco-regionales que muestran una evolución clínica agresiva. Se han descrito algunas de las alteraciones genético-biológicas asociadas con esta evolución más desfavorable de los tumores loco-regionales, como se explica más adelante (Maris, 2010).

Este subgrupo de NB loco-regionales agresivos y los NB **metastásicos** o estadio 4, muestran un comportamiento clínico agresivo y bajos índices de supervivencia (Mora et al, 2006; Ambros et al, 2009). Por este motivo, precisan de un complejo abordaje terapéutico que incluye quimioterapia, cirugía, radioterapia, megaterapia seguida de rescate con progenitores hematopoyéticos, inmunoterapia y fármacos inductores de diferenciación.

2.3. Alteraciones genéticas y factores predictores de pronóstico.

Se han descrito diversas alteraciones genéticas y moleculares asociadas a la gran diversidad de comportamientos clínicos del NB. Las aberraciones genéticas mejor caracterizadas hasta la fecha son las alteraciones de la ploidía, las translocaciones desequilibradas, las deleciones o ganancias de regiones cromosómicas recurrentes y la amplificación del oncogén *MYCN* (Ambros et al, 1996; Brodeur et al, 1984; Bown et al, 1999, Mora et al, 2000; Maris et al, 2007).

2.3.1. Alteraciones genéticas.

Aneuploidía.

La aneuploidía es la alteración en el contenido de ADN o en el número de cromosomas y es un hallazgo frecuente en numerosas entidades neoplásicas (Pui et al, 1989; Kilpatrick et al, 1994; Gordon et al, 2012).

Los TN loco-regionales de pronóstico favorable presentan un cariotipo hiperploide (cuasi-triploide) con un número modal de cromosomas en el rango de la triploidía (de 58 a 80 cromosomas) con pocas aberraciones estructurales. Por otro lado, los TN metastáticos tienen un cariotipo cuasi-diploide (de 44 a 57 cromosomas) o cuasi-tetraploides (81 a 103 cromosomas), con cambios cromosómicos estructurales evidentes (Kaneko y Cohn 2000; Mora et al, 2001; Maris et al, 2007). La ploidía ha sido recientemente incluida como marcador de pronóstico en el sistema de clasificación del Grupo Internacional de Riesgo en Neuroblastoma (INRG) (Ambros et al, 2009; Maris, 2010).

Pérdida del cromosoma 1.

La pérdida parcial del brazo corto del cromosoma 1 (1p) es una delección que comprende desde la región 1p32 hasta 1p terminal (Brodeur et al, 1981), siendo la pérdida de 1p36 la alteración más común (Schwab et al, 2003). La región 1p36.31 es la delección más pequeña descrita (Okawa et al, 2008). Los estudios citogenéticos clasificaron esta anomalía como marcador de mal pronóstico en NB asociado a la amplificación del oncogén *MYCN* (Hayashi et al, 1989). Varios estudios han identificado genes supresores de tumores en el brazo distal del cromosoma 1 (1p36), aunque no se ha podido demostrar que ninguno de estos genes por sí mismo sea suficiente para desencadenar la tumorigénesis del NB (Okawa et al, 2008; White et al, 2005).

Amplificación del oncogén *MYCN*.

La amplificación del oncogén *MYCN* (del inglés, *v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived*), que se halla localizado en el cromosoma 2p24, está presente en un 25% de los TN. Esta alteración genética se asocia de manera significativa con NB agresivos que muestran rápida progresión del tumor y tasas de supervivencia muy bajas (Alaminos et al, 2003 y 2005; Segeer et al, 1985; Brodeur et al, 1984). La amplificación de *MYCN* se presenta en forma de anomalías citogenéticas como los cuerpos cromatínicos (*double minutes* o DMs) o las regiones cromosómicas de tinción homogénea (*homogeneously staining regions* o HSR) (Lundberg et al, 2008; VanDevanter et al, 1990, Prochazka et al, 2010; Moreau et al, 2006). Además, se asocia con la delección del cromosoma 1p (Hayashi et al, 1989).

El gen *MYCN* codifica para una proteína que juega un papel importante en la formación de tejidos y órganos durante el desarrollo embrionario (Hatton et al, 2006). Se trata de un factor de transcripción que contiene dominios bHLH (del inglés *Basic Helix-loop-helix*) y que regula la transcripción de genes implicados en funciones cruciales para la proliferación y supervivencia de la células del NB, como el ciclo celular, apoptosis, síntesis de poliaminas o la angiogénesis (Bell et al, 2010; Bowen y Chung, 2009).

Ganancia del cromosoma 17.

La ganancia del cromosoma 17 se halla presente en más del 60% de los NB primarios (Abel et al, 1999). Esta ganancia puede consistir en un cromosoma 17 entero (tetrasomía), ganancias aisladas del segmento distal del brazo largo 17q21-qter o translocaciones desequilibradas entre 17q y otros cromosomas como el 1p característico de los NB de alto riesgo (Bown et al, 2001; Lastowska et al, 1997). De esta forma, generalmente, la ganancia de la porción distal de 17q se asocia con la pérdida de 1p36 (Abel et al, 1999, Savelyeva et al, 1994).

Pérdida del cromosoma 11.

La pérdida de heterocigosidad (*loss of heterozigosity* o LOH) a nivel del brazo corto del cromosoma 11, concretamente en la región 11q23, está presente en mas de un 35% de los TN (Attiyeh et al, 2005; Ora y Eggert, 2011). Esta alteración cromosómica se correlaciona con pérdidas cromosómicas en 14q23-32 y en 3p25.3-p14.3 e inversamente con la pérdida en 1p36 (Brodeur 2003, van Noesel and Versteeg, 2004). Se asocia con NB agresivos y con la ganancia del cromosoma 17q (Ambros et al, 2009). Además, en pacientes sin amplificación de *MYCN*, es un factor predictor de pronóstico independiente (Ora y Eggert, 2011).

2.3.2. Factores predictores de pronóstico en neuroblastoma.

Los datos clínicos al diagnóstico que son factores predictores de pronóstico de manera independiente para los pacientes con TN incluyen la edad, el estadio clínico y la clasificación anatomo-patológica (Maris et al, 2007; Mora et al, 2006; Ora y Eggert, 2011).

Edad al diagnóstico.

La edad al diagnóstico es un factor pronóstico en NB (Breslow y McCann, 1971; Mora et al, 2006; Maris et al, 2007). Los lactantes menores de dieciocho meses con tumores loco-regionales o con tumores diseminados, tienen mejor pronóstico que los niños mayores de esta edad.

Por otro lado, los pacientes mayores de 5 años con tumores metastásicos tienen mal pronóstico pero se comportan de forma menos agresiva comparado con los mismos tumores diagnosticados en niños entre año y medio y 5 años de edad (Mora et al, 2006; Maris 2010; Evans y D'Angio, 2005).

Estadio clínico.

El estadio clínico 4 o neuroblastoma metastásico se asocia sistemáticamente con una peor supervivencia global y libre de eventos que los otros estadios loco-regionales y el estadio 4s (Maris, 2010; Ambros et al, 2009).

En 1971, Evans y colaboradores propusieron un sistema de estadiaje clínico de los TN que dividía a los pacientes en cuatro estadios, del 1 al 4, además de un estadio 4S, según el grado de extensión local del tumor primario y de las metástasis (Evans et al, 1971). Unos años más tarde se propusieron nuevos criterios de estadiaje basados en una evaluación clínica, radiográfica y quirúrgica, conocido como INSS (del inglés, *International Neuroblastoma Staging System*) (Brodeur et al, 1993) :

- **Estadio 1.** Tumor localizado con excisión macroscópica completa, con enfermedad residual microscópica o sin esta; ganglios linfáticos ipsilaterales representativos, microscópicamente negativos para el tumor (como los nódulos adheridos al tumor primario y extirpado junto con éste, pueden ser positivos).
- **Estadio 2A.** Tumor localizado con excisión macroscópica incompleta; ganglios linfáticos ipsilaterales representativos, negativos para el tumor microscópicamente.
- **Estadio 2B.** Tumor localizado con escisión macroscópica completa o sin esta; ganglios linfáticos ipsilaterales no adherentes, positivos para el tumor. Los ganglios linfáticos contralaterales agrandados deben ser negativos microscópicamente.

- **Estadio 3.** Tumor irreseccable unilateral, infiltrante más allá de la línea media, con afectación de los ganglios linfáticos regionales o sin esta; o tumor unilateral localizado con compromiso de los ganglios linfáticos regionales contralaterales; o tumor en la línea media con extensión bilateral por infiltración (irreseccable) o por afectación del ganglio linfático. La línea media está determinada por la columna vertebral. Los tumores que se originan en un lado y cruzan la línea media deben infiltrarse sobre esta o hacia el lado opuesto de la columna vertebral.
- **Estadio 4.** Todo tumor primario con diseminación a ganglios linfáticos distantes, huesos, la médula ósea, hígado, piel u otros órganos, con excepción de lo definido para el estadio 4S.
- **Estadio 4S.** Tumor primario localizado, como se define para el estadio 1, 2A o 2B, con diseminación limitada a la piel, el hígado o la médula ósea (circunscrito a lactantes menores de 18 meses). La afectación medular debe ser mínima (o sea, <10% de células nucleadas totales identificadas como malignas por biopsia de hueso o por aspirado de médula ósea). Una afectación más extensa de la médula ósea se consideraría como enfermedad en estadio IV. Los resultados de la exploración con MIBG en caso de que se efectúe, deben ser negativos para la enfermedad en la médula ósea.

Clasificación anatómo-patológica.

Histológicamente, los TN están compuestos de dos tipos celulares: las células neuroblásticas, de estirpe neural, y las células estromales de tipo Schwann, que son de estirpe glial. Según la proporción en que se hallan los dos tipos celulares y del grado de diferenciación de los neuroblastos, los TN se

clasifican en grupos con características histológicas específicas (Shimada y Roald 2000) (**Figura 7**) que son:

- Los **neuroblastomas** (NB): Son los TN más **indiferenciados**, ya que están formados en su mayoría por neuroblastos y tienen poca presencia (<50%) de células de Schwann. Estos tumores se clasifican en tres categorías morfológicas según el grado de diferenciación neuronal de las células neuroblásticas. Así, el NB **indiferenciado** está formado por células neuroblásticas indiferenciadas con un citoplasma escaso y núcleos redondos que pueden presentar varios nucléolos. Los neuroblastos son inmaduros ya que no presentan ningún signo de diferenciación como presencia de fondo fibrilar eosinófilo (neuropilo), ni agrupación de las células en nidos neuroblásticos o rosetas. El NB **pobrementemente diferenciado** está formado por un 5% de neuroblastos que muestran algún indicio de diferenciación y presencia de neuropilo o formación de rosetas. Por último, el NB **en diferenciación** está formado por más del 5% de neuroblastos con signos de diferenciación (núcleolo prominente y citoplasma grande) y se acompañan de neuropilo abundante.

Figura 7.

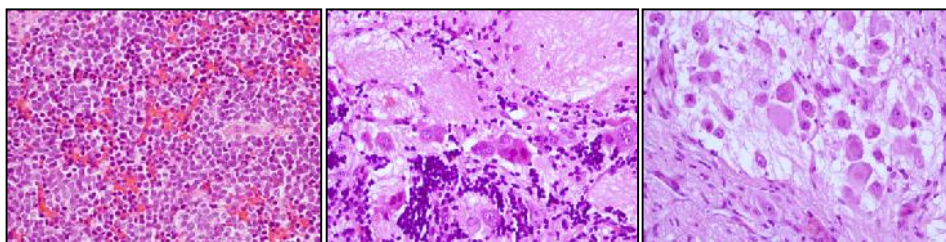


Figura 7. Fotografías de secciones de tumores fijados con formalina y embebidos en parafina tras ser teñidas con hematoxilina-eosina. Se ilustra así la morfología celular de los tumores neuroblásticos (40X). De izquierda a derecha: Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma y ganglioneuroma.

El **ganglioneuroblastoma (GNB)** es un tumor con un nivel intermedio de diferenciación, compuesto por células ganglionares, un contenido de más del 50% de células de Schwann y células neuroblásticas en distintos grados de diferenciación. El GNB de tipo nodular está formado por dos componentes macroscópicamente diferenciados: uno o más nódulos formados por neuroblastos indiferenciados pobres en estroma, y un GNB rico en estroma o un GN.

Los **ganglioneuromas (GN)** son los TN con un nivel de diferenciación más avanzado. Están compuestos por más de un 50% de células de Schwann, pero también contienen neuroblastos en diferenciación y células ganglionares.

En 1984, Shimada y colaboradores propusieron una clasificación con capacidad pronóstica que dividía a los TN en tumores favorables o desfavorables. Esta clasificación se basa en el contenido de células de Schwann, el grado de diferenciación de los neuroblastos, el índice de mitosis/cariorrhexis y la edad del paciente al diagnóstico (Shimada et al, 1984). A partir de este método, en 1999 se adoptó la clasificación histológica internacional del NB (INPC, del inglés *International Neuroblastoma Pathology Classification*) (Shimada et al, 1999; Shimada y Roald 2000) (**Tabla 2**).

La presencia de estroma, células de Schwann y neuroblastos en diferenciación se ha asociado a tumores de mejor pronóstico, mientras que los tumores indiferenciados y pobres en estroma están asociados a enfermedad más agresiva (Peuchmaur et al, 2003; Shimada et al, 2001).

Tabla 2. Clasificación histopatológica INPC, tabla modificada de Shimada et al. (1999)

Tipo /subgrupo por edad	Histología /MKI	Grupo pronóstico
Neuroblastoma	Pobre en estroma	Favorable
	Tumor pobremente diferenciado o en diferenciación con índice mitosis/cariorexis bajo o intermedio	Favorable
	Tumor indiferenciado/ pobremente diferenciado o con índice mitosis/cariorexis intermedio/alto	Desfavorable
1,5-5 años	Tumor indiferenciado o con índice mitosis/cariorexis alto	Favorable
	Tumor en diferenciación y índice mitosis/cariorexis bajo	Desfavorable
>5 años	Todos los tumores	Desfavorable
Ganglioneuroblastoma	Tumor intermedio (rico en estroma)	Favorable
	Tumor nodular: compuesto por rico estroma/estroma dominante y pobre en estroma	Desfavorable
Ganglioneuroma	En maduración: bien diferenciado con estroma dominante	Favorable
	Maduro	Favorable

Durante el proceso de diferenciación, las células neuroblásticas sufren una parada parcial o completa de la proliferación celular así como cambios fenotípicos como la formación de neuritas en el caso de la diferenciación neural o extensión del citoplasma y aumento de adhesión en diferenciación hacia linaje glial. Además, se han detectado cambios en el patrón de expresión de marcadores biológicos típicos de células maduras. Cuando una célula se diferencia hacia linaje neural maduro, expresa proteínas neuroendocrinas como sinaptofisina, cromogranina A o enolasa. También se sobreexpresa tirosina

hidroxilasa (TH), enolasa específica de neurona y proteínas que forman parte del citoesqueleto neural maduro como β -III-tubulina (también llamada Tuj1), la cadena larga del neurofilamento (NFL) o GAP43 (Edsjö et al, 2007; Walton et al, 2004; Miettinen et al, 1998; Hoehner et al, 1998). Por otro lado, en el proceso de diferenciación glial aumenta la expresión de genes y proteínas como S100 β , vimentina, CD44 o PMP22 (del inglés *peripheral myelin protein 22*) (Ross et al, 2002; Brodeur y Maris, 2002)

Las vías metabólicas dependientes de los receptores neurotróficos o tirosina quinasa TrkA, B y C son cruciales para el desarrollo y maduración normales de las células del sistema nervioso periférico en formación. La elevada expresión de TrkA y TrkC en los TN se encuentra más frecuentemente en los casos de pronóstico favorable, mientras que la sobreexpresión de TrkB se correlaciona con la amplificación de *MYCN* y con un pronóstico desfavorable (Hoehner et al, 1995; Light et al, 2012).

2.4. Líneas celulares de NB.

Al igual que ocurre con otros tipos de tumores malignos humanos, se han establecido en cultivo varios tipos de líneas celulares a partir de NB humanos (Biedler et al, 1973). El uso de este tipo de líneas *in vitro* está ampliamente aceptado como modelo de investigación en cáncer (Mora y Gerald 2004).

Se han descrito tres subtipos de líneas celulares de NB: el subtipo N (neuroblástico), el subtipo S (adherente al substrato) y el subtipo I (intermedio) (Ross et al, 1983).

Las **células de tipo N** (neuroblásticas) son líneas que se asemejan a las células neurales precursoras, ya que presentan una morfología neuroblástica: son células pequeñas, redondas, con una relación núcleo/citoplasma grande, y procesos neuríticos, que varían en número y longitud (Mora y Gerald 2004; Ross y Spengler 2007; Walton et al, 2004).

Las **células de tipo S** son grandes y aplanadas, muy adherentes al substrato, con un gran núcleo ovalado, un citoplasma abundante y no presentan neuritas. Presentan propiedades melanocíticas, Schwannian y/o, musculares, pero no neuronales (Mora y Gerald, 2004; Walton et al, 2004).

Las **células de tipo I**, presentan características intermedias entre células N y células S. Son células pequeñas, aplanadas, con un número variable de procesos neuríticos y con un citoplasma relativamente escaso. Estas líneas celulares de NB son las que han mostrado mayor capacidad proliferativa *in vitro* y tumorigénica *in vivo* (Ross et al, 2007).

2.5. CaR y PTHrP en tumores neuroblásticos.

Nuestro grupo describió por primera vez la expresión de *CaR* y *PTHrP* en un tumor del desarrollo. Contrariamente a lo esperable en función de los datos publicados con respecto a su participación en algunas neoplasias del adulto, estos dos genes no se encontraron expresados en NB con capacidad de generar metástasis óseas, sino que se hallaron expresados en TN diferenciados, de buen pronóstico, y en modelos de diferenciación inducida (de Torres et al, 2009). Concretamente, describimos que *CaR* se halla expresado en los TN con algún grado de diferenciación (NB pobremente diferenciados y en diferenciación, GNB y GN), pero no se expresa en los NB indiferenciados. En la cohorte analizada, la expresión de *CaR* correlacionaba con factores de buen

pronóstico en TN (edad al diagnóstico <1 año, estadio 1, 2 y 4S, bajo riesgo clínico y clasificación anatómo-patológica favorable).

Asimismo, la expresión de *PTHrP* era significativamente más elevada en GNB y GN que en NB ($P < 0.0001$). Más aún, CaR y PTHrP no se hallaban sólo expresados en TN en proceso espontáneo de diferenciación, sino que su expresión se incrementaba en procesos de diferenciación inducida, tanto en los pacientes (NB indiferenciados al diagnóstico que presentaban morfología diferenciada tras ser sometidos a quimioterapia) como en modelos *in vitro*. En este último caso, la expresión de CaR se hallaba significativamente incrementada en líneas celulares de NB expuestas brevemente a ácido retinoico, lo cual concordaba con su expresión en NB en inicio de diferenciación, mientras que CaR y sobre todo *PTHrP* se hallaban sobre-expresados en modelos de inducción de diferenciación glial, en paralelismo con su sobre-expresión en tumores ricos en estroma de Schwann, GNB y GN.

3. GENES SUPRESORES DE TUMORES.

La transformación neoplásica es un fenómeno multifactorial que se origina a consecuencia de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que interactúan en los diversos estadios de la generación y progresión de un tumor (Hanahan y Weinberg, 2000 y 2011; Baylin y Jones, 2011). Estas alteraciones contribuyen a la oncogénesis alterando el control del ciclo celular, la proliferación y diferenciación celular, así como la capacidad de invasión y diseminación metastásica (Herman y Baylin, 2003; Sharma et al, 2010; Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011).

3.1. Tipos de genes implicados en el cáncer.

Las mutaciones causantes de los procesos que conducen a la aparición de un cáncer tienen lugar en tres tipos de genes: proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del ADN (Trent, 1999; Vogelstein y Kinzler, 2004).

Los **proto-oncogenes** son genes que regulan la expresión de genes esenciales en el control del crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular (Bishop, 1996). Cuando estos genes sufren alteraciones en sus patrones de expresión, mutaciones o un reordenamiento cromosómico que da lugar a una proteína inductora de un fenotipo tumoral se denominan **oncogenes** (Haber y Fearon, 1997; Albertson et al, 2003)

Los **genes de reparación del ADN** tienen la función de asegurar la integridad de la información genética corrigiendo los errores en la secuencias del ADN debidos a errores de la ADN polimerasa o a mutagénicos (Lengauer et al, 1998; Hsieh y Yamane, 2008). Las mutaciones de estos genes son recesivas e implican una replicación y reparación del ADN ineficaces.

Los **genes supresores de tumores (GST)** tienen la función de controlar el ciclo celular evitando la proliferación incontrolada (Bishop, 1996). Los GST son recesivos en cuanto a la generación de tumores, puesto que necesitan la alteración de los dos alelos del gen para contribuir a la transformación neoplásica de la célula. Actualmente se conocen numerosos GST (McNeish et al, 2004; Sharma et al, 2010; Manhani et al, 1997) algunos de los cuales se han encontrado alterados en NB (Liu et al, 2011; Henrich et al, 2011).

En 1971, Knudson propuso la teoría del “*double hit*” o doble evento para explicar la inactivación de los GST, concretamente del gen del retinoblastoma (*RB1*). Según el modelo propuesto por este autor, un GST sufre dos alteraciones para ser inactivado: un primer evento (habitualmente una mutación) que inactiva un alelo en línea germinal, seguido de la inactivación somática del segundo alelo (Knudson, 1971). La inactivación del segundo alelo se puede producir por varios mecanismos como alteraciones cromosómicas que afecten a múltiples loci (deleción, recombinación mitótica o pérdida por no disyunción cromosómica) o por un evento restringido a un locus (inactivación alélica por factores epigenéticos, mutaciones puntuales o deleciones que afectan al gen) (Albertson et al, 2003; Devilee et al, 2001).

3.2. Mecanismos genéticos de regulación transcripcional.

La ausencia de expresión de un gen puede ser debida a distintos factores, como la pérdida o deleción de un cromosoma o de una región cromosómica, mutaciones, polimorfismos, o la inactivación por procesos epigenéticos, entre otros (Albertson et al, 2003; Devilee et al, 2001).

3.2.1. Pérdidas alélicas.

La **pérdida de heterocigosidad** (LOH) es el proceso de pérdida de una copia alélica parental, resultando en una deleción hemicingótica (una copia del locus) o en disomía uniparental cuando el segmento delecionado es reemplazado por la duplicación del homólogo (Wilkins y LaFramboise, 2011). La LOH es uno de los procesos que describe la inactivación del segundo alelo según la teoría de Knudson. Por ello, el hallazgo frecuente de LOH en una región cromosómica en un tipo de tumor determinado, indica que esta región puede albergar algún GST implicado en la génesis del tumor (Brodeur, 2003; Teitz et al, 2000; van Noesel y Versteeg, 2004; Abel et al, 1999; Bown et al, 2001; Okawa et al, 2007).

Para estudiar las pérdidas alélicas se pueden utilizar diferentes metodologías, entre ellas la hibridación genómica comparada (CGH) y la técnica de hibridación *in situ* (FISH) (Diskin et al, 2009).

- **Hibridación genómica comparada (CGH).** Esta técnica permite analizar alteraciones genéticas desbalanceadas de segmentos cromosómicos, como las duplicaciones y/o deleciones y translocaciones y/o inversiones de cromosomas balanceados (Kallioniemi et al, 1992). En el contexto de cáncer, se utiliza para detectar ganancias/pérdidas de grandes regiones cromosómicas con una aproximación global, de todo el genoma (Heim y Mitelman, 1989; Diskin et al, 2009; Combaret et al, 2011; Wolf et al, 2010).
- **Hibridación fluorescente *in situ* (FISH).** Esta es una técnica que permite detectar o confirmar anomalías génicas o cromosómicas que generalmente están más allá de la capacidad de resolución de la citogenética de rutina. Es más sensible que la CGH para detectar alteraciones no presentes en todas las células, puesto que permite

examinar uno a uno los núcleos de un tumor, mientras que la CGH analiza el ADN obtenido de un conjunto de células. El método se basa en la hibridación del ADN desnaturalizado de la muestra con la sonda de interés, marcada con un fluorocromo, que hibridará con la secuencia complementaria en la muestra. La señal emitida por la sonda se observa mediante un microscopio de fluorescencia, clasificando la muestra según la presencia o ausencia de la señal (revisado en Speicher y Carter, 2005). Las sondas son pequeñas secuencias de nucleótidos, complementarias a la secuencia de interés del ADN de la muestra. Con estas sondas se pueden visualizar alteraciones estructurales o numéricas tanto en núcleos en interfase como en metafase, y detectar microdeleciones específicas o identificar material extra de origen desconocido (Fix et al, 2008). En células en interfase, la FISH (iFISH) se usa para determinar el número de copias de uno o varios cromosomas, así como para detectar algunas reorganizaciones específicas que son características de ciertos tipos de cáncer, como la ganancia de la región 17q en TN (Combaret et al, 2011). En los estudios de pérdidas alélicas se cohibridan las células con una sonda centromérica y una sonda específica para el gen de interés (Kaneko y Cohn 2000; Pui et al, 1989). En función del número de señales de cada sonda, se puede calcular el número de copias del gen, determinando deleción, monosomía o desequilibrio.

3.2.2. Mutaciones y polimorfismos.

Como se describe más arriba, las **mutaciones** son cambios permanentes y heredables en la secuencia de ADN que dan lugar a una modificación de la función de un gen y que normalmente se asocian a un fenotipo perjudicial (Lodish et al, 2000). Se trata de variantes con elevada penetrancia y con una frecuencia de aparición del alelo más raro de menos del 1% de la población.

En los **polimorfismos de nucleótido simple** (SNPs), las variantes alélicas difieren en un solo nucleótido y son responsables de más del 90% de las variaciones del genoma (el 10% restante son causadas por inserciones o deleciones y polimorfismos de secuencia simple). Para que una variación pueda clasificarse como polimorfismo, el alelo minoritario debe detectarse en más de 1% de la población. La mayoría de los polimorfismos son silentes (es decir, sin repercusiones fenotípicas) (Erichsen y Chanock, 2004), pero pueden afectar a la secuencia codificante o reguladora produciendo cambios importantes en la estructura de la proteína o en el mecanismo de regulación de la expresión del gen.

La historia de recombinación entre una pareja de SNPs se puede estimar usando la medida de asociación alélica (D') (Daly et al, 2001). Así, se define que una pareja de SNPs está asociada o en desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium* o DL) cuando en una población los alelos en dos loci distintos se transmiten juntos a los gametos de forma más frecuente de lo esperado, siendo el valor de asociación alélica $D' > 0,98$ (consistente con falta de recombinación a lo largo de la evolución). Contrariamente, se determina una alta evidencia de recombinación cuando la D' es menor a 0,9. Otra medida de desequilibrio de ligamiento la proporciona el coeficiente de correlación r^2 (Hill y Robertson, 1968) que varía entre 0 y 1, siendo el valor 1 el de un DL máximo.

El genoma está organizado en distintos bloques de desequilibrio de ligamiento flanqueados por regiones en los que la recombinación ha ido marcando la historia de la muestra (Erichsen y Chanock, 2004; Gabriel et al, 2002). Tanto la frecuencia de SNPs como la extensión del DL presentan variaciones entre las poblaciones, existiendo variantes propias de cada población (Carlson et al, 2003).

Figura 8.

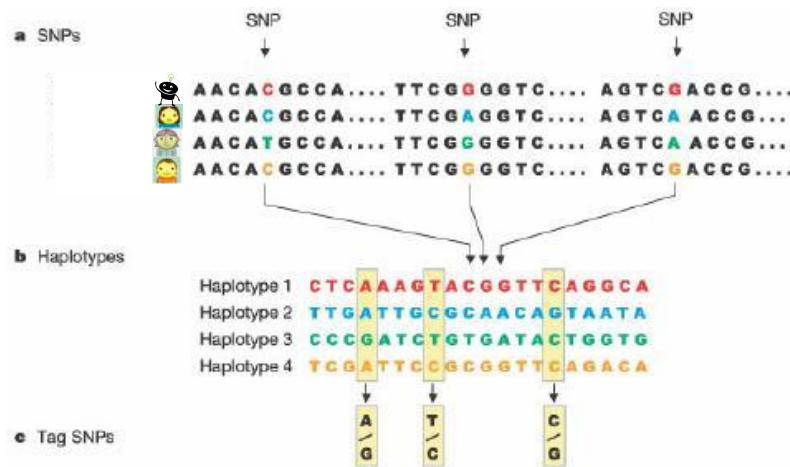


Figura 8. SNPs y haplotipos. **A SNPs:** Se muestra una secuencia de ADN con 4 versiones de la misma región cromosómica. En la secuencia hay tres bases que muestran variación. Cada SNP tiene 2 posibles alelos, por ejemplo el primer SNP tiene los alelos citosina (C) y timina (T). **B Haplotipos:** Se muestra el haplotipo de cada persona del aparatado A. **C.** SNPs diana para identificar variaciones de haplotipos. *The International Hap Map Project 2003*

Los estudios de asociación de los SNPs se basan en la comparación de las frecuencias genotípicas y/o alélicas de pacientes con una enfermedad con un grupo independiente de individuos control (Solé et al, 2006). Estos estudios permiten analizar SNPs de genes candidatos en DL o estudiar todo el genoma en busca de los genes responsables de una enfermedad. En cáncer, estos estudios se pueden dividir en dos categorías, los estudios que pretenden determinar si un SNP está asociado a desarrollar una enfermedad (o loci asociados a susceptibilidad) (Capasso et al, 2009; Maris, et al 2008) y aquellos que investigan si un determinado SNP se encuentra asociado con el pronóstico de una enfermedad y por tanto podría contribuir a determinar su fenotipo (Wang et al, 2011).

3.3. Mecanismos epigenéticos de regulación transcripcional.

El término epigenética, acuñado por C. H. Waddington en los años 40 (Waddington, 1942), hace referencia al conjunto de modificaciones bioquímicas del ADN que son heredables y que no involucran cambios en su secuencia de nucleótidos. Las modificaciones epigenéticas incluyen la metilación de las citosinas (C) en los dinucleótidos citosina-guanina (CG), modificaciones post-transcripcionales en las histonas, incorporación de variantes de histonas y nucleosomas así como los microARNs no codificantes (Sharma et al, 2010; Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011; Dawson y Kouzarides, 2012).

3.3.1. Histonas.

El ADN genómico se encuentra condensado en el núcleo estructurado en forma de **cromatina**, siendo esta estructura fundamental para la regulación de la expresión génica. Las unidades básicas de la cromatina son los nucleosomas, constituidos por un octámero de histonas (dos unidades de H2A, H2B, H3 y H4), envueltos por 146 pares de bases (pb) de ADN. A su vez, los nucleosomas se empaquetan más debido a la proteína enlazadora de histonas H1 y a proteínas no histonas que forman un complejo compacto denominado nucleoproteína (Clapier y Cairns, 2009; Baylin and Jones, 2011). La cromatina se puede clasificar según la actividad transcripcional y la replicación del ADN en dos subtipos denominados eucromatina (cromatina transcripcionalmente activa) y heterocromatina (cromatina transcripcionalmente inactiva) (Nair y Kumar, 2012; Dawson y Kouzarides, 2012)

Las histonas son estructuras moleculares que participan en la regulación de la expresión génica. El patrón de modificaciones post-transcripcionales de las histonas en su cola amino-terminal contribuye a determinar la estructura de

la cromatina regulando la transcripción de los genes. Estas modificaciones incluyen la acetilación, metilación, ubiquitinización y fosforilación (Rodríguez-Paredes and Esteller, 2011; Dawson y Kouzarides, 2012). La acetilación y la fosforilación de las histonas están relacionadas con un aumento de la transcripción génica y, concretamente la acetilación se asocia con el silenciamiento aberrante de genes en cáncer (Esteller, 2007b; Dawson y Kouzarides, 2012; Kim et al, 2006). Por otra parte, la metilación de las histonas puede activar o reprimir la transcripción génica dependiendo de qué residuo y de qué histona sea metilada (Mosammamarast y Shi, 2010; Baylin y Jones, 2011). Las distintas modificaciones combinadas generan el código epigenético de las histonas que afecta la transcripción génica y la reparación del ADN (Esteller 2008; Nair y Kumar, 2012; Cedar y Bergam, 2009).

Inhibición de la desacetilación de las histonas.

El restablecimiento del patrón normal de acetilación mediante **inhibidores de las desacetilasas de histonas** (HDACi) en líneas celulares tumorales tiene efectos antineoplásicos. Dichos efectos son promovidos por la capacidad de estos fármacos para reactivar la expresión de distintos genes, entre los cuales se hallan los genes supresores de tumores (Esteller 2007; Sharma et al, 2010; Dawson y Kouzarides, 2012). Los HDCAi inducen diferenciación, disminución de la proliferación celular, apoptosis, inhibición de la angiogénesis y de metástasis, así como incremento de la sensibilidad a la quimioterapia (Sharma et al, 2010; Rodríguez-Paredes and Esteller, 2011). Estos fármacos pueden ser clasificados en cuatro grupos según su naturaleza química: ácidos hidroxámicos (tricotatina A, *suberoylanilide hydroxamic acid* o SAHA), péptidos cíclicos (romidespina), derivados de benzamidas (MS-275) y ácidos grasos de cadena corta (ácido valproico, butirato de sodio) (Esteller 2007b; Kim et al, 2006; Rodríguez-Paredes y Esteller 2011).

La tricostatina A (TSA) es un antibiótico antifúngico producido por *Streptomyces platenses*. Fue el primer ácido hidroxámico al que se le atribuyeron funciones de HDCAi (Yoshida et al, 1990), ya que inhibe de forma reversible la actividad de las HDAC provocando una acumulación de histonas acetiladas y activando así la transcripción génica (Mühlethaler-Mottet et al, 2008; Yoshida et al, 1990; Hurtubise et al, 2008). Este fármaco provoca paro del ciclo celular, induce diferenciación y transforma la morfología celular en cultivo (Mühlethaler-Mottet et al, 2008). Los genes cuya expresión se ve restaurada tras el tratamiento con TSA (Cameron et al, 1999) son susceptibles de estar silenciados epigenéticamente mediante acetilación de histonas (Yoshida et al, 1990).

3.3.2. Metilación.

La metilación del ADN es una modificación covalente mediante la cual se incorpora un grupo metilo (CH_3) en la posición 5' del anillo de pirimidina de una citosina, generando la 5-metilcitosina (mC) durante la fase S del ciclo celular. Esta reacción está mediada por la familia de enzimas denominadas ADN-metiltransferasas (DNMT, del inglés, *Mammalian DNA methyltransferases*) que catalizan la transferencia de un grupo metilo a la citosina a partir del substrato S-adenosil-metionina (SAM) (**Figura 9**) (Espada y Esteller, 2010; Sharma et al, 2010).

Esta familia de enzimas incluye la DNMT1, cuya función es copiar y mantener el patrón de metilación durante la replicación del ADN uniéndose a cadenas de ADN parcialmente metiladas; la DNMT2 con función todavía desconocida aunque presenta capacidad para unirse a secuencias de ADN independientemente del estado de metilación de las mismas; y la DNMT3, que

puede actuar sobre cadenas de ADN semi-metiladas o no metiladas y cuya función es establecer “*de novo*” el patrón de metilación del ADN en células embrionarias y células no diferenciadas (Espada y Esteller 2010; Dawson y Kouzarides, 2012).

Figura 9.

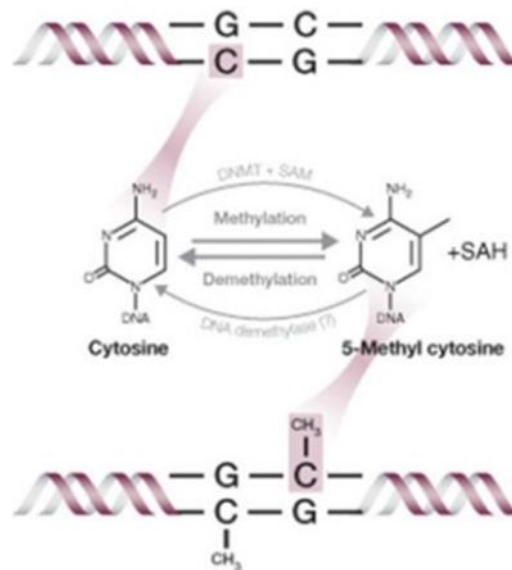


Figura 9. Reacción de metilación. DNMTs: enzimas ADN metiltransferasas, SAM: S-adenosil-metionina y SAH: 5-adenosil homocisteína (www.caymanchem.com)

La metilación del ADN ocurre mayoritariamente en las islas CpG localizadas en el extremo 5' cerca del inicio de la transcripción. Las islas CpG son regiones de ADN de al menos 500 pb ricas en secuencias repetitivas de citosina-guanina (CGs). En ellas, la ratio entre el número de dinucleótidos CGs observados con respecto a los esperados es superior a 0,6 (revisado en Goll y Bestor, 2005). Estas regiones, asociadas a las regiones promotoras en un 76% de los genes del genoma humano, tienen un papel importante en la regulación de la expresión génica (Alaminos et al, 2004; Sharma et al, 2010; Jones y Baylin 2007). Se han descrito también islas CpG en regiones intrónicas y en extremos 3' de diferentes genes (Sharma et al, 2010; Herman et al, 2003).

La hipermetilación de la isla CpG de una región promotora es un mecanismo de regulación transcripcional que contribuye al silenciamiento de un gen (Sharma et al, 2010; Herman et al, 2003; Deaton y Bird, 2012). Este mecanismo ha cobrado una especial relevancia en cáncer durante los últimos años (Herman y Baylin, 2003; Dawson y Kouzarides, 2012).

La transcripción génica está modulada por la metilación del ADN mediante dos mecanismos, uno directo y otro indirecto. La modulación directa se produce por una interferencia física ya que, al hallarse hipermetilada una región del promotor, este cambio físico-químico impide la unión de los factores de transcripción en aquella región. La modulación indirecta se produce cuando las proteínas específicas de unión a los dinucleótidos CG metilados bloquean la interacción de los factores de transcripción con el ADN (Sharma et al, 2010; Pikaard, 2013).

La metilación del ADN contribuye a la inactivación de genes durante el desarrollo embrionario, en los procesos de diferenciación de los tejidos, en la inactivación del cromosoma X y en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica (revisado en Lawor and Thiele, 2012). Las islas CpG están asociadas a genes específicos de tejido y a genes constitutivos (*housekeeping genes*). Su estado de metilación varía en distintos tejidos. En los genes regulados por impronta génica y en los genes inactivados en el cromosoma X, se produce una hipermetilación monoalélica de estas regiones responsables de su silenciamiento (revisado en Goll y Bestor, 2005). Por otra parte, la hipermetilación actúa como el segundo *hit* necesario para el inicio del proceso tumoral según la teoría del Knudson silenciando el alelo activo del gen supresor de tumores, del cual el otro alelo se halla mutado o perdido mediante LOH (Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011). Así, se ha descrito que la hipermetilación aberrante de regiones promotoras de genes supresores de tumores juega un

papel importante en el desarrollo y progresión de distintos tipos de cáncer, confiriendo una ventaja selectiva a las células neoplásicas (Alaminos et al, 2004; Hernando et al, 2004; Sharma et al, 2010). Entre los genes descritos como GST se encuentran el gen *RB1*, *MLH1* (homólogo de mutL-1), *CDKN2A* (quinasa inhibidora ciclina dependiente 2A) o *VHL* (von Hippel-Lindau) (Sharma et al, 2010). También pueden ser silenciados mediante hipermetilación factores de transcripción o genes de reparación del ADN que provocaran el silenciamiento de sus genes diana (Rodriguez-Paredes y Esteller, 2011).

Figura 10.

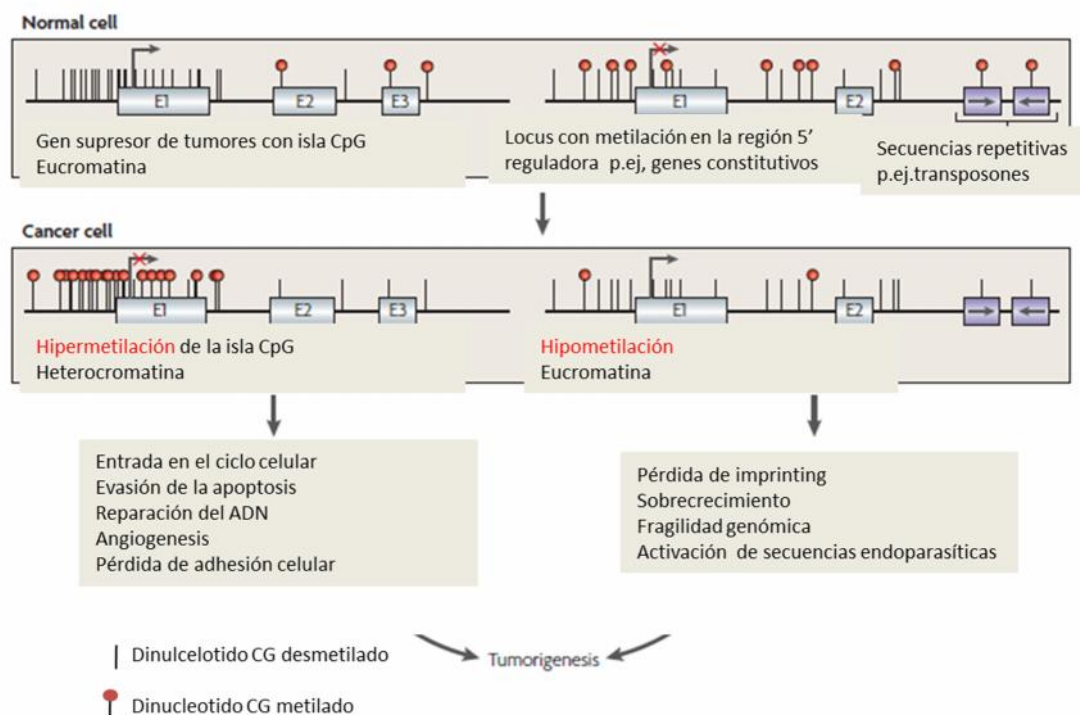


Figura 10. Patrón de metilación del ADN en células normales y tumorales. Modificado de Esteller 2007.

En términos de metilación del ADN, las células tumorales presentan una hipometilación global del genoma y una hipermetilación específica de islas CpG en los promotores de determinados genes (Esteller 2007; Rodríguez-Paredes y Esteller, 2011). Estos promotores específicos no se hallan hipermetilados en tejidos no neoplásicos (Dawson y Kouzarides, 2012).

En general, la hipometilación ocurre predominantemente en las zonas de ADN repetitivo y se asocia a inestabilidad cromosómica, pérdida de la impronta génica y reactivación de proto-oncogenes (Esteller 2008; Baylin y Jones, 2011).

Los estudios de metilación del ADN se han focalizado en el análisis de genes aislados. Sin embargo, en algunos tipos de tumores se ha descrito que la hipermetilación de determinados genes localizados en distintos puntos de genoma sucede simultáneamente. Este fenómeno se ha definido como **fenotipo hipermetilador de islas CpG** o CIMP y se asocia a peor supervivencia en múltiples neoplasias (Issa, 2004; Baylin y Jones, 2011). En NB, se ha descrito metilación aberrante en distintos genes implicados en ciclo celular, reparación del ADN, resistencia a fármacos, apoptosis, diferenciación, angiogénesis y metástasis, hallándose también asociado el fenotipo hipermetilador con un mal pronóstico, como describimos más adelante (Abe et al, 2005; Yang et al, 2010; Baylin y Jones, 2011).

La hipermetilación de las islas CpG también afecta la expresión de ARNs no codificantes, responsables de la transformación maligna (Baylin y Jones, 2011) así como a secuencias conservadas localizadas antes y después de la región promotora, denominados CpG *shores*. Estos hallazgos indican que la hipermetilación no siempre está relacionada con el silenciamiento

transcripcional y que la distribución espacial de la metilación del ADN es vital en la regulación transcripcional (Dawson y Kouzarides, 2012).

Ensayos de desmetilación con el agente 5-aza-2'desoxicitidina (Aza)

El agente desmetilante 5-aza-2'desoxicitidina (Aza) es un análogo de la citosina que se incorpora en el ADN durante la replicación de la célula. Inhibe la metilación del ADN atrapando las enzimas DNMT de manera covalente, lo que conduce a una reactivación de la expresión génica (Christman 2002; Sharma et al, 2010; Cowan et al, 2010). Este fármaco evita la unión de las proteínas de unión a islas CpG metiladas (El Osta et al, 2002) e incrementa la acetilación de la histona H3 en la lisina 9 a la vez que disminuye su metilación, normalizando la relación acetilación/metilación lo cual contribuye a restaurar la expresión génica (Dawson y Kouzarides, 2012). Actúa específicamente en la fase S y retrasa el ciclo celular favoreciendo la diferenciación y la inhibición del crecimiento celular (Kantarjian e Issa 2005). Es una de las drogas desmetilantes más usadas en los ensayos celulares *in vitro* (Esteller 2007) y muchos trabajos avalan su acción como reactivador de la expresión génica (Cameron et al, 1999; Christman 2002; Hizaki et al, 2011) también en líneas celulares de NB (Alaminos et al, 2004).

Tratamiento epigenético combinado.

La metilación aberrante de las islas CpG conjuntamente con la modificación en las histonas son mecanismos reversibles de inactivación génica. Esto ha llevado a explorar combinaciones terapéuticas de agentes desmetilantes de ADN y de HDACi que pudieran tener efectos anti-tumorales. En algunos casos, la combinación de ambos fármacos ha resultado más efectiva que los tratamientos por separado, ya que la re-expresión de algunos genes supresores

de tumores solo ocurre cuando se combinan ambos fármacos (Cameron et al, 1999; Zhu y Otterson, 2003; Hurtubise et al, 2008; Rodriguez-Paredes and Esteller, 2011).

3.3.3. Modificaciones epigenéticas en tumores neuroblásticos.

En TN se han descrito genes cuya expresión se halla controlada, entre otros mecanismos, mediante modificaciones epigenéticas. Por ejemplo, el silenciamiento mediante hipermetilación del promotor del gen de la caspasa 8 (*CASP8*) (Fulda et al, 2001) y el del factor de transcripción *FOXO3* que regula la expresión de *CASP8* (Geiger et al, 2012). También se ha descrito hipermetilación del promotor de *RARS2* (Alaminos et al, 2004), *SCNN1A*, *PRKCDBP*, *KRT19* (Carén et al, 2011), *EMP3* (Alaminos et al, 2005), *NSD1* (Berdasco et al, 2009), $14.3.3\sigma$ (Banelli et al, 2005), *RASSF1A* (van Noesel and Versteeg, 2004), *CCND2* (Alaminos et al, 2004); los receptores del factor de necrosis tumoral *DR4*, *DR5*, *DCR1*, *DCR2* (Teitz et al, 2000; van Noesel et al, 2003) y algunos genes supresores tumorales como *TP73*, *HOXA9*, *TMS1*, *THBS-1* y *FOLH1* (Alaminos et al, 2004; Banelli et al, 2005; Yang et al, 2010).

Se han descrito varios mecanismos epigenéticos a través de los cuales *MYCN* afecta a la transcripción génica, como son las modificaciones de las histonas, la metilación del ADN y la interacción con proteínas de unión a grupos metilo (He et al, 2013; Soufi et al, 2012). *MYCN* recluta a DNMT3, responsable de establecer *de novo* el patrón de metilación, en los promotores de los genes susceptibles de ser silenciados mediante hipermetilación en NB (Hervouet et al, 2009; Guccione et al, 2006; Cotterman et al, 2008). Además, interacciona con el complejo de proteínas Polycomb PRC2 (del inglés *polycomb repressor complex 2*) que actúa como represor epigenético y que se ha asociado con TN de histología indiferenciada y con la inactivación de genes supresores

de tumores en NB (revisado en He et al, 2013). Estos mecanismos pueden explicar la frecuente hipermetilación de algunos genes en NB con amplificación de este oncogén (He et al, 2013; Carén et al, 2011).

Algunos trabajos han mostrado que genes relacionados con la biología del neuroblasto pueden sufrir hipermetilación bajo determinadas circunstancias y que este fenómeno se asocia a progresión tumoral agresiva y un mal pronóstico vital para el paciente (Alaminos et al, 2004 y 2005; Yang et al, 2010; Carén et al, 2011). Así, por ejemplo, los promotores de los genes *TMS1* y *CCND2* están hipermetilados en tumores de estadio 4 pero no 4S, y la hipermetilación del promotor de *HOXA9* se asocia a aumento de mortalidad en pacientes mayores a 18 meses y en pacientes portadores de tumores sin amplificación de *MYCN* (Alaminos et al, 2004).

Sin embargo, no todos los genes silenciados mediante hipermetilación del promotor se asocian con peor pronóstico de los pacientes con TN. Y así, por ejemplo, el silenciamiento de *RARS2* mediante hipermetilación del promotor se asocia a formas benignas de TN como son los ganglioneuromas y no se detecta en los neuroblastomas agresivos (Alaminos et al, 2004).

3.3.4. Técnicas de análisis del estado de metilación.

Determinadas técnicas de biología molecular permiten analizar el estado de metilación de todo el genoma o de una región en particular.

El ADN puede ser modificado químicamente con bisulfito de sodio (Clark et al, 1994) con el fin de identificar citosinas metiladas y no metiladas (**Figura 11**). Este compuesto químico deamina las citosinas localizadas en una hebra de cadena simple de ADN, convirtiéndolas en uracilos, pero dejando los

residuos 5-metilcitosina (citosinas metiladas) sin modificar (Furuichi et al, 1970). Por tanto, este tratamiento introduce cambios específicos en la secuencia del ADN que dependen del estado de metilación inicial de las citosinas.

La conversión con bisulfito de sodio precede a diversas técnicas, tanto cuantitativas como cualitativas, que permiten el análisis del estado de metilación del ADN. Entre dichas técnicas, se encuentran *bisulphite-specific PCR (BSP)* o secuenciación de clones generados tras amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Frommer et al, 1992) y la **PCR específica de metilación (MSP)**. En este segundo método, se realiza un análisis mediante PCR utilizando cebadores diseñados para detectar específicamente alelos metilados y no metilados en el ADN modificado con bisulfito (Herman et al, 1996).

Figura 11.

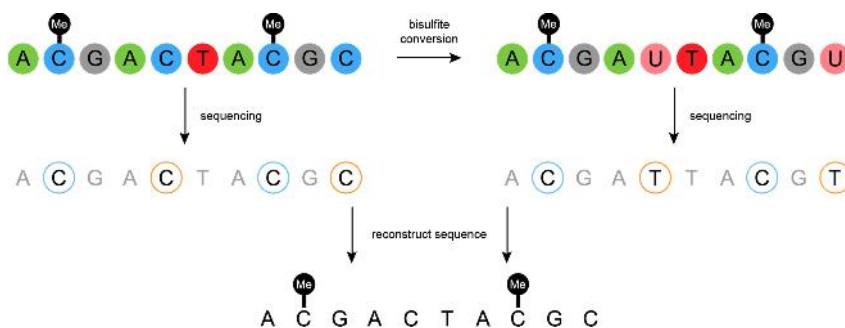


Figura 11. Modificación química del ADN con bisulfito. El bisulfito de sodio convierte las citosinas (C, azul) en uracilos (U, rosa). Las metil-C no se modifican. Durante la posterior amplificación por PCR los U se convierten en timinas (T) y las metil-C permanecen como C. (www.atdbio.com)

Existen otras técnicas para analizar el estado de metilación de una secuencia de ADN, como son la pirosecuenciación, la combinación de la conversión del ADN con bisulfito y el uso de otras técnicas como las enzimas de

restricción (COBRA (del inglés *Combined Bisulfite Restriction Analysis*), o la cuantificación de alelos metilados mediante PCR en tiempo real (MS-QPCR, del inglés *Methylation-Specific Quantitative PCR*). Para cuantificar el estado de metilación de múltiples genes a la vez se utilizan los *microarrays*, ya que ofrecen la posibilidad de estudiar las islas CpG de miles de genes en el mismo ensayo (Zilberman y Henikoff, 2007).

3.4. Ensayos de sobreexpresión.

Para analizar funcionalmente las consecuencias biológicas derivadas de la inactivación de un gen se pueden realizar ensayos de sobreexpresión génica. La transfección es la introducción de un gen en una célula eucariota mediante plásmidos, vectores víricos u otras herramientas de transferencia (Pellicer et al, 1980). Hay varios métodos para introducir ADN en una célula eucariota. Los más frecuentes son el uso de fosfato cálcico, DEAE-Dextrano, electroporación y lipofectina.

Un método muy eficiente de transfección es la inclusión del ADN en liposomas, pequeños cuerpos formados de una membrana en cierto modo similar a la membrana plasmática de la célula y que puede fusionarse con la misma, liberando el ADN al interior celular. En células eucariotas, la transfección basada en la interacción lípido-cación es la más comúnmente utilizada, ya que son más sensibles a este método (Grimm et al, 2004).

La transfección puede ser transitoria o estable. Para la mayoría de aplicaciones es suficiente que el gen transfectado se exprese transitoriamente. En este caso, el ADN introducido no se inserta en el genoma nuclear, perdiéndose cuando la célula entra en mitosis. Cuando se desea que el gen transfectado permanezca en el genoma de la célula y de su progenie, se debe efectuar una transfección estable. En primer lugar, el gen de interés tiene que

ser introducido en la célula, posteriormente en el núcleo y, finalmente, debe integrarse en el ADN. En este procedimiento, se transfecta en el mismo constructo un gen que proporciona a la célula la resistencia a un fármaco, normalmente un antibiótico. Cuando se añade al cultivo este fármaco, sólo serán capaces de proliferar aquellas células que han incorporado en su genoma los genes transfectados, y por tanto el gen de resistencia al fármaco, mientras que el resto morirá. Uno de los ejemplos de este mecanismo es la selección mediante G418 de células transfectadas con vectores que incluyen el gen de resistencia a neomicina (Southern y Berg 1982).

La modificación selectiva de la expresión de genes específicos supone un gran avance en el desarrollo de la biología celular y una herramienta muy útil en la investigación, ya que permite analizar funcionalmente la actividad biológica de los genes de interés. Las principales aplicaciones de la transfección estable son el análisis de la función génica y su regulación (Grimm 2004), la producción a gran escala de proteínas, el descubrimiento de nuevos fármacos y la terapia génica (Wurm 2004).

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS.

Teniendo en cuenta que el receptor sensor de calcio *CaR* se encuentra expresado en el sistema nervioso periférico normal y en los tumores neuroblásticos diferenciados, pero su expresión se halla muy reducida o ausente en neuroblastomas indiferenciados, la hipótesis principal planteada en esta tesis es que *CaR* ejerce funciones como gen supresor de tumores en el contexto de los tumores neuroblásticos. Por esta razón, se hallará silenciado mediante mecanismos genéticos y/o epigenéticos en los neuroblastomas indiferenciados, de comportamiento clínico agresivo. Asimismo, si la hipótesis principal es cierta, la restauración de la expresión de *CaR* en líneas celulares de neuroblastoma promoverá un efecto deletéreo sobre su capacidad de proliferación, supervivencia y/o tumorigénesis.

2. OBJETIVOS.

Objetivo general:

Analizar si el receptor sensor de calcio *CaR* ejerce funciones propias de un gen supresor de tumores en el contexto de los tumores neuroblásticos.

Objetivos específicos:

1. Analizar los mecanismos genéticos y/o epigenéticos potencialmente responsables de la inactivación del gen *CaR* en tumores neuroblásticos.

1.1 Analizar el estado de metilación del promotor 2 del gen *CaR* en las líneas de neuroblastoma y en tumores neuroblásticos.

- 1.1.1. Analizar el efecto del tratamiento con el agente desmetilante 5'aza-2'-desoxicitidina (Aza) y/o con el inhibidor de la desacetilación de las histonas tricostatina A (TSA) sobre el nivel de expresión del ARNm de *CaR* en líneas celulares de neuroblastoma.
 - 1.1.2. Analizar el estado de metilación del promotor 2 del gen *CaR* mediante PCR y secuenciación previa modificación del ADN con bisulfito sódico (*bisulphite-specific PCR* o BSP) y mediante PCR específica de metilación (MSP).
 - 1.2. Evaluar pérdidas alélicas de la región cromosómica 3q13-21, donde se localiza el gen humano *CaR*, en líneas celulares de neuroblastoma y en tumores neuroblásticos mediante hibridación *in situ* fluorescente.
 - 1.3. Analizar los tres polimorfismos funcionalmente relevantes del exón 7 del gen *CaR* (rs1801725, rs1042636 and rs1801726) en tumores neuroblásticos y en líneas celulares de neuroblastoma. Examinar su posible asociación con el fenotipo de los tumores neuroblásticos.
 - 2. Analizar los efectos promovidos por la sobreexpresión y activación de *CaR* sobre la capacidad de proliferación y tumorigénesis de líneas celulares de neuroblastoma que presenten silenciamiento de este gen mediante mecanismos epigenéticos.**
 - 2.1. Analizar el efecto de la sobreexpresión inducida y estable de *CaR* sobre el índice de proliferación de líneas celulares de neuroblastoma en las que se halla documentado silenciamiento de la expresión de este gen mediante hipermetilación de su promotor 2.
 - 2.2. Examinar la capacidad tumorigénica de las mencionadas líneas celulares de neuroblastoma en ratones inmunodeprimidos.

2.3. En dichas líneas celulares, analizar el efecto producido por la activación aguda de *CaR* mediante su ligando principal, el calcio. Evaluar la vía de señalización activada en este contexto.

RESULTADOS

1. El receptor sensor de calcio está silenciado mediante mecanismos genéticos y epigenéticos en neuroblastomas desfavorables y su reactivación induce apoptosis dependiente de ERK1/2.

Carla Casalà, Estel Gil, José Luis Ordóñez, Solange Miguel-Queralt, Eva Rodríguez, Patricia Galván, Cinzia Lavarino, Francina Munell, Enrique de Alava, Jaume Mora y Carmen de Torres.

Publicado en la revista *Carcinogenesis* 2013; 34(2):268-276

FI: 5.702 , Q1

Los neuroblastomas (NB), ganglioneuroblastomas y ganglioneuromas conforman el grupo de los tumores neuroblásticos (TN). Se trata de un grupo muy heterogéneo de tumores del desarrollo que pueden involucionar espontáneamente, desarrollarse como tumores loco-regionales o presentarse como NB metastásicos. Los TN más diferenciados desde el punto de vista histológico suelen asociarse a presentaciones clínicas de evolución favorable. Nuestro grupo describió que el receptor sensor de calcio (*CaR*) se encuentra expresado en TN diferenciados y de buen pronóstico, mientras que su expresión es muy reducida en los NB indiferenciados y desfavorables (de Torres et al, 2009).

En este trabajo, hemos analizado mecanismos genéticos y epigenéticos potencialmente responsables de la disminución de expresión de *CaR* en TN desfavorables. Hemos hallado que el gen *CaR* se haya silenciado hipermetilación de una isla CpG que engloba su promotor 2 en líneas celulares de NB con amplificación del oncogén *MYCN* y en un 25% de NB primarios. En los tumores examinados, la presencia de hipermetilación de esta isla CpG se correlacionaba estadísticamente con niveles de expresión de *CaR* por debajo de la mediana, así como con factores de mal pronóstico en NB como son la amplificación de *MYCN*, enfermedad metastásica, clasificación anatómopatológica desfavorable y edad al diagnóstico inferior a 18 meses.

El tratamiento con 5'aza-2'-desoxicitidina (Aza) y/o con tricostatina restauró la expresión de *CaR* en las líneas de NB con amplificación de *MYCN*. En una de ellas, se constató una reducción de citosinas metiladas en la isla CpG mencionada tras el tratamiento con Aza de manera concurrente con la restauración de la expresión de este gen. Este dato sería consistente con la hipótesis de que la hipermetilación de la región mencionada contribuye al control de la expresión de *CaR*.

Para realizar análisis de pérdidas alélicas de *CaR* mediante hibridación *in situ* fluorescente, se generó una sonda que hibrida específicamente con la región del cromosoma 3 donde se localiza el gen humano *CaR*. Se observó así un número variable de núcleos con monosomía del cromosoma 3 en más del 90% de los tumores primarios analizados.

Para determinar funcionalmente la relevancia de la inactivación epigenética de *CaR*, dos líneas celulares de NB con amplificación de *MYCN*, en las que se había documentado expresión indetectable de este gen e hipermetilación del promotor, fueron transfectadas establemente con pCMV-*CaR*-GFP o pCMV-GFP.

En las dos líneas testadas, los clones con sobreexpresión del receptor presentaron índices de proliferación *in vitro* significativamente inferiores. Asimismo, mostraron una capacidad prácticamente nula para generar xenoinjertos en ratones inmunodeprimidos.

Por último, cuando estas células con sobre-expresión de *CaR* fueron expuestas de manera aguda al calcio, el principal activador de este receptor, se produjo la muerte por apoptosis de estas células de NB, un fenómeno que resultó ser dependiente de la activación sostenida de ERK1/2.

Este conjunto de datos es congruente con la hipótesis de que el silenciamiento epigenético del gen *CaR* es un mecanismo relevante para la supervivencia y crecimiento de las células de NB.

The calcium-sensing receptor is silenced by genetic and epigenetic mechanisms in unfavorable neuroblastomas and its reactivation induces ERK1/2-dependent apoptosis

Carla Casalà¹, Estel Gil-Guiñón¹, José Luis Ordóñez², Solange Miguel-Queral¹, Eva Rodríguez¹, Patricia Galván¹, Cinzia Lavarino¹, Francina Munell³, Enrique de Alava^{2,4}, Jaume Mora¹ and Carmen de Torres^{1,*}

¹Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu and Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, ²Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (USAL-CIC), Salamanca, Spain, ³Institut de Recerca Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain and ⁴Salamanca University Hospital, Spain

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 932532100; Fax: +34 936009771; Email: cdetorres@hsjdbcn.org

Neuroblastic tumors (NTs) include the neuroblastomas, ganglioneuroblastomas and ganglioneuromas. We have reported previously that the calcium-sensing receptor is expressed in differentiated, favorable NTs but almost undetectable in unfavorable neuroblastomas. We have now detected hypermethylation of a particular region within the CpG island encompassing the *CaSR* gene promoter 2 in neuroblastoma cell lines and 25% primary neuroblastomas. Hypermethylation of this region was associated with reduced *CaSR* messenger RNA expression and several predictors of poor outcome in neuroblastomas, including *MYCN* amplification. Treatment with 5'aza-2-deoxycytidine and/or trichostatin A restored *CaSR* expression in *MYCN*-amplified cell lines. Following 5'aza-2-deoxycytidine exposure, decreased percentages of methylated CpG sites were observed at the above-mentioned region. By interphase fluorescence *in situ* hybridization, variable percentages of nuclei with monosomy of chromosome 3, where the human *CaSR* gene resides, were observed in more than 90% of primary NTs of all subgroups. Nuclei harboring this alteration were heterogeneously distributed among tumor cells. Ectopic overexpression of the calcium-sensing receptor in two *MYCN*-amplified neuroblastoma cell lines in which this gene is silenced by promoter hypermethylation significantly reduced their *in vitro* proliferation rates and almost abolished their capacity to generate xenografts in immunocompromised mice. Finally, upon acute exposure to calcium, the primary activator of this receptor, calcium-sensing receptor-overexpressing neuroblastoma cells underwent apoptosis, a process dependent on sustained activation of ERK1/2. These data would support the hypothesis that epigenetic silencing of the *CaSR* gene is neither an *in vitro* artefact in neuroblastoma cell lines nor an irrelevant, secondary event in primary NTs, but a significant mechanism for neuroblastoma survival.

Introduction

Neuroblastic tumors arise from precursor cells of the peripheral nervous system and include the neuroblastomas, ganglioneuroblastomas and ganglioneuromas. This is a highly heterogeneous group of developmental malignancies that may undergo spontaneous regression, expand as a confined mass or proliferate aggressively both locally and at distant sites (1,2). Several biological abnormalities have been associated with this variety of clinical presentations, including alterations

Abbreviations: Aza, 5'aza-2-deoxycytidine; CaSR, calcium-sensing receptor; FBS, fetal bovine serum; GPCR, G-protein coupled receptor; NT, neuroblastic tumor; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; RT-PCR, reverse transcription-PCR; TBP, TATA-box binding protein.

of ploidy, deletions or gains of recurrent chromosomal regions and the amplification of the *MYCN* oncogene (3–7).

Neuroblastic tumors are composed of different proportions of neuroblasts and non-neuronal, glial-like cells. Neuroblastoma cell lines reflect this cellular heterogeneity and three phenotypic variants have been characterized: Neuroblastic (N-type) cells, substrate-adherent (S-type) glial-like cells and cells with intermediate phenotype (I-type). The latter show features of both N-type and S-type cells, are able to differentiate along both lineages and have the highest tumor-forming capacities among the three subtypes (8,9).

Histologically, neuroblastic tumors with an advanced degree of differentiation are associated with good outcome (10). Some molecular pathways involved in neuroblastoma maturation processes have been uncovered (11–13). We have described that the calcium-sensing receptor (CaSR) is expressed in differentiated, favorable neuroblastic tumors, and it is upregulated upon differentiation induction (14).

The CaSR is a family C G-protein coupled receptor (GPCR) whose primary role is to regulate the secretion of parathyroid hormone to maintain calcium plasmatic concentrations within a very narrow range (15). The CaSR is also expressed in many tissues not involved in calcium metabolism and in a number of malignancies (16), but divergent and even opposite functions have been attributed to this receptor in different neoplasias. For instance, in prostate cancer models, CaSR activation has been associated with tumor cell proliferation and bone metastases (17). Conversely, in the parathyroid glands (18) and the colonic epithelium (19), the CaSR expression is high in differentiated normal cells, reduced in adenomas and almost abolished in highly proliferating, undifferentiated carcinomas. The reasons why this GPCR would act as an oncogene in some neoplasias but displays a pattern of expression reminiscent of a tumor-suppressor gene in others are presently unknown.

The human *CaSR* gene resides on the chromosomal region 3q13.3–21. It contains six coding exons and two alternatively transcribed first non-coding exons, 1A and 1B. They are, respectively, under the control of promoter 1 and promoter 2 (P2) and the latter has been described to lie in a GC-rich region (20). However, the mechanisms of transcriptional regulation responsible for decreased expression of the CaSR in some neoplasias compared with their normal counterparts are only partially understood.

We have analyzed genetic and epigenetic mechanisms potentially responsible for downregulation of the *CaSR* gene in neuroblastic tumors. Also, the *in vitro* and *in vivo* effects of its overexpression and activation have been examined.

Materials and methods

Patients and tumor samples

About 52 snap-frozen tumors from 41 patients diagnosed at Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona, were analyzed. Forty specimens were obtained at diagnosis, nine at second-look surgery and three at relapse. Selection criteria included histological diagnosis of neuroblastic tumor, ≥ 12 months of follow-up time and availability of frozen tumor fragments of good quality (viable tumor cell content $>70\%$) and quantity (to isolate DNA and RNA). Informed consent was obtained from patients/parents/legal guardians and procedures were approved by the Institutional Review Boards. Age at diagnosis, clinical stage (International Neuroblastoma Staging System), *MYCN* amplification status, International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) and time to follow-up were recorded.

Cell lines

Three N-type (LA-N-1, LA1-55n, SH-SY5Y), three I-type (SK-N-BE(2)-C, SK-N-JD, SK-N-LP) and two S-type (LA1-5s and SK-N-AS) neuroblastoma cell lines were used. They were kindly provided by Dr B. Spengler (Fordham University, New York) and Dr N.K.V. Cheung (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York). SK-N-AS was purchased from the European

Collection of Cell Cultures. Cells were grown in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA), 2mM L-glutamine, penicillin (100U/ml) and streptomycin (100 µg/ml), at 37°C and 5% CO₂. Mycoplasma PCR tests were routinely performed (Reactiva, Spain). Characterization of cell lines included analysis of *MYCN* status by quantitative PCR (qPCR) as described (21) and expression analysis of several transcripts to assess their phenotype according to reported data previously (see below).

In vitro treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine and/or trichostatin A

Neuroblastoma cell lines were exposed to 1 µM 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza) for 72h and/or with 100nM trichostatin A (TSA) for 12h (Sigma, St. Louis, MO). Vehicle-treated cells were processed simultaneously. Experiments were repeated at least twice independently.

RNA isolation, complementary DNA synthesis, PCR and qPCR

Total RNA was isolated using TriReagent (Sigma). Retrotranscription and PCR were performed as described (14). Quantitative PCR analyses were performed in a 7000 SDS system using gene-specific Assays on Demand and Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Relative expression levels were calculated according to the 2^{-ΔΔCt} method using *TATA-box binding protein (TBP)* as housekeeping gene. Only samples with a *TBP* Ct lower than 30 were used to ensure RNA and complementary DNA quality. *CaSR* mRNA levels in tumors were normalized to those of sample NT-35 and levels in transfected clones were normalized to clone SK-N-LP pCMV-CaSR-GFP-6. Transcript levels in cell lines were calculated relative to those of LA-N-1.

Bisulfite-specific PCR

Genomic DNA was bisulfite modified with Epitect Bisulfite kit (Qiagen, Hilden, Germany). Primers were designed with MethylPrimer Express software (Applied Biosystems) to analyze the entire CpG island (Supplementary Figure 1, available at *Carcinogenesis* Online). Primer sequences and PCR conditions are detailed in Supplementary Table 1, available at *Carcinogenesis* Online. BSP-2 was carried out to amplify a specific region of P2 (-129 to -434). When hypermethylation (>6% methylated CpG sites in ≥10 clones) of this fragment was detected, the entire CpG island was sequenced. PCRs were performed with Taq Gold polymerase (Applied Biosystems). PCR products were cloned using TA cloning kit (Invitrogen) and minipreps were generated to sequence 10–16 clones.

Methylation-specific PCR

Primers for detecting unmethylated and methylated alleles at P2 were designed at www.mspprimer.org (22). Genomic DNA from peripheral blood, brain and kidney were used as controls for unmethylated P2. Peripheral blood DNA from a healthy donor was treated with *SssI* methylase (New England Biolabs, Beverly, MA) to generate positive controls for methylated alleles. A denaturation step (94°C-9min) was followed by 34 cycles (94°C-20 s; annealing-20 s; 72°C-20 s) with different annealing temperatures for unmethylated and methylated alleles (primers and conditions in Supplementary Table 1, available at *Carcinogenesis* Online). PCR products were resolved in 3% agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized with a Kodak Logic-1500 system.

Interphase fluorescence in situ hybridization.

Interphase FISH analyses were performed by a dual-color procedure on methanol-acetone fixed cells and 2 µm sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tumors as described (23). Co-hybridizations were performed with a chromosome 3 centromeric probe (Kreatech, Amsterdam, The Netherlands) and a probe generated with BAC RP11-79M2 to hybridize with the human *CaSR* gene locus. After midprep purification, this probe was labeled by nick translation using Spectrum red deoxyuridine triphosphate (Vysis, Abbot Molecular, Germany). One hundred nuclei were evaluated in each tumor. Deletion was considered when only one copy of 3q13.3-21 was detected with at least two centromere copies (2:1, 3:1, etc); monosomy 3 when only one copy of 3q13.3-21 and one centromere copy were seen (1:1) and imbalance when at least two copies of 3q13.3-21 were observed with additional centromere copies (3:2, 4:2, etc). Cut-off value (15%) was defined in control tissues as mean percentage of nuclei with an alteration +3 standard deviations.

Stable transfections and in vitro proliferation assays

Two neuroblastoma cell lines (SK-N-LP and SK-N-JD) were transfected with pCMV-GFP or pCMV-CaSR-GFP (Origene, Rockville, MD) using Fugene-6 (Roche, Indianapolis, IN). After 15 days of G418 selection (800 µg/ml), single cell clones were generated by limiting dilutions and maintained in G418 (200 µg/ml). *CaSR* expression was monitored using reverse transcription (RT)-qPCR, western blot and direct fluorescence imaging. Immunoblots were carried out as described below, except for the *CaSR*-specific antibody (Acris, Aachen, Germany). Clones were further purified by cell sorting prior to proliferation assays. These were performed as described (24).

Mouse xenograft model

Four to six-week-old female athymic Nude-Foxn1 *nu/nu* mice (Charles Rivers) were used. Experiments were performed as described (25), except for the number of injected cells and a longer period of follow-up. Procedures were approved by the Institutional Animal Research Ethics Committee. Both flanks of each animal were injected subcutaneously with 10⁷ cells in Matrigel:phosphate-buffered saline (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Wild-type neuroblastoma cell lines (SK-N-LP and SK-N-JD) and pCMV-GFP clones (2 clones/cell line) were injected in right flanks and pCMV-CaSR-GFP clones (3 clones/cell line) in left flanks. Tumors were measured thrice a week. Forty days after injections, animals were killed and tumors were weighed. Half specimen was formalin-fixed, paraffin-embedded and the other part was flash frozen in liquid nitrogen.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical analysis of the *CaSR* was carried out as described (14). A similar protocol was followed to assess Ki67, synaptophysin, caspase-3 activation and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage using specific primary antibodies (Cell Signaling Technology, Danvers, MA).

In vitro activation of the CaSR: cell viability, apoptosis and ERK1/2 analyses

Wild-type SK-N-LP or SK-N-JD neuroblastoma cells, pCMV-GFP and pCMV-CaSR-GFP transfected clones were plated in RPMI-1640 10% FBS. Next day, cells were switched to calcium-free Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with bovine serum albumin (0.2% w/v), 4mM L-glutamine and 0.5mM CaCl₂ for 16h, followed by the same medium containing either 0.5 or 3mM CaCl₂ for 48h. Two pools of clones (pCMV-GFP and pCMV-CaSR-GFP) were prepared after checking a homogeneous behavior among clones with or without *CaSR* expression. Cell viability was measured with CellTiter96 Aqueous Cell proliferation Assay (Promega, Madison, WI). Absorbance was measured at 490nm in an E-max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). For each clone/cell line, proliferation rates were calculated as a fold increase of the absorbance measured at each time point relative to its corresponding absorbance at day 0 (determined 18h after plating).

To quantify apoptotic nuclei, cells were fixed with 2% paraformaldehyde and stained with 2 µg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) for 10min. Nuclei were visualized using a Nikon Eclipse TE2000-E microscope and a Hamamatsu ORCA-ER camera. Uniformly stained nuclei were scored as viable cells, whereas condensed or fragmented nuclei were scored as apoptotic using ImageJ-1.42q software.

Phosphorylation status of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), caspase-3 activation and PARP cleavage were analyzed by immunoblot. Following serum deprivation, cells were exposed to 0.5mM or 3mM CaCl₂. At indicated times, they were collected in ice-cold phosphate-buffered saline and lysed in 10mM Tris-HCl pH = 6.8, 1mM ethylenediaminetetraacetic acid, 150mM NaCl, 1% sodium dodecyl sulfate. About 30 µg protein were electrophoresed in 8–14% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes. Incubation with primary antibodies (ERK1/2, phospho-ERK1/2 Thr202/Tyr204, caspase-3 Asp175 and PARP Asp214 from Cell Signaling; GAPDH and βtubulin from Millipore, Temecula, CA) was followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Promega). Immunoreactive bands were detected with enhanced chemiluminescence reagents (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ). Selected experiments were performed with MEK inhibitor U0126 (Selleck Chemicals, Munich, Germany) applied 2h before serum deprivation and along calcium exposure.

Statistical analysis

The χ^2 test was used to assess the correlation of P2 hypermethylation or *CaSR* expression below the median with the clinical and biological subgroups. Comparison of means was performed by Mann-Whitney *U* or Student *t*-tests. Elapsed time from time of diagnosis to an event or the end of follow-up was used to compute event-free survival and overall survival (OS) probabilities, according to the method of Kaplan and Meier (26). The log-rank statistic was used to compare the event-free survival and OS probabilities between groups (27). The prognostic significance of variables was assessed by Cox proportional models (28). *P* < 0.05 was considered significant.

Results

Downregulation of the CaSR gene is associated with predictors of poor outcome in neuroblastoma

Levels of *CaSR* mRNA were analyzed in 40 primary tumors and in non-neoplastic tissues by RT-qPCR. In univariate analyses, *CaSR* mRNA levels below the median value were significantly associated with the histologic subgroup of undifferentiated neuroblastomas and with prognostic factors of poor outcome in neuroblastoma, including

MYCN amplification, clinical stage 4, age at diagnosis >18 months and unfavorable pathology (Table 1 and Supplementary Table 2, available at *Carcinogenesis* Online). Low expression of the *CaSR* was also associated with worse OS rates ($P = 0.026$), although this was not an independent prognostic factor in multivariate analyses (data not shown).

Since the exact normal counterpart of neuroblastic tumors is unknown, expression of the *CaSR* was examined in normal adrenal glands, where many of these tumors are located. Levels of *CaSR* mRNA in the available specimens were higher than the median value of the cohort (Supplementary Table 2, available at *Carcinogenesis* Online).

Among samples obtained at second-look surgery and relapse, levels of *CaSR* mRNA did not change in six of them compared with their matching primary tumors. However, a 2- to 30-fold increase of expression was seen in four specimens compared with corresponding primary tumors. Upregulation of the *CaSR* mRNA following treatment was only observed in specimens with morphological signs of cyto-differentiation (Supplementary Table 2, available at *Carcinogenesis* Online).

The CaSR gene promoter 2 is hypermethylated in MYCN-amplified neuroblastoma cell lines and unfavorable neuroblastic tumors

Eight neuroblastoma cell lines were used for these experiments, after analyzing their *MYCN* amplification status (Supplementary Table 3, available at *Carcinogenesis* Online) and expression of several transcripts, including the neuroblastoma-specific marker *PHOX2B* (Supplementary Figure 2, available at *Carcinogenesis* Online). Results were concordant with data reported previously.

Initially, *CaSR* mRNA was only detectable in LA-N-1 (Figure 1A). To select the optimum concentration of (Aza), LA1-55n cells were exposed to 1, 2.5 or 5 μ M Aza for 72 h. The highest level of *CaSR* re-expression was achieved with 1 μ M (Figure 1B). Treatment with this concentration of Aza and/or TSA restored *CaSR* expression in LA1-55n (Figure 1C), SK-N-LP (Figure 1D), SK-N-BE-2-C (Figure 1E), SK-N-JD and LA1-5s cell lines (data not shown) and increased the previously detected levels of *CaSR* mRNA in LA-N-1 (Figure 1F). However, *CaSR* expression remained undetectable in the non-amplified *MYCN* neuroblastoma cell lines SH-SY5Y and SK-N-AS (data not shown).

A search for CpG islands was conducted in the sequence *Homo sapiens calcium-sensing receptor gene, alternative promoters and exons 1A and 1B* (GenBank AY116081). Criteria included: Island size > 200 bp, GC content > 50% and observed versus expected CpG content > 0.6. A CpG island 1189 bp long was found encompassing the

last 139 bp of exon 1A (+436 to +641), the entire promoter 2, exon 1B and 170 bp in the flanking 3' untranslated regions.

In two non-neoplastic tissues in which the *CaSR* is expressed (kidney and brain), <6% methylated CpG sites (mC) were found across the CpG island, whereas variable percentages of mC were detected in LA-N-1, LA1-55n, SK-N-BE(2)-C, SK-N-JD, SK-N-LP and LA1-5s cell lines. In SH-SY5Y and SK-N-AS cells, only 10–19% mC were found in exon 1A, whereas P2 and the rest of the CpG island were unmethylated (Figure 2B, Supplementary Table 3, available at *Carcinogenesis* Online).

In primary tumors, P2 hypermethylation was detected in 10/40 (25%) cases (Supplementary Table 2, available at *Carcinogenesis* Online). In these specimens, the immediately preceding portion of exon 1A was also hypermethylated and some tumors had even higher percentages of mC in this location than in P2 (P2 will now indicate both regions). Conversely, <6% mC were found in the other regions of the CpG island. Hypermethylation of P2 was significantly associated with *CaSR* mRNA levels below the median value ($P = 0.003$), *MYCN* amplification, clinical stage 4, age at diagnosis >18 months, unfavorable pathology and the histologic subgroup of undifferentiated neuroblastoma (NB) (Table 1). Patients with hypermethylated P2 had a significantly worse OS than patients with unmethylated P2 ($P = 0.017$), but this was not an independent predictor of outcome in multivariate analyses.

Samples obtained at second-look surgery ($n = 9$) and relapse ($n = 3$) were also analyzed (Supplementary Table 2, available at *Carcinogenesis* Online). Hypermethylation of P2 had been previously found in five of their matching primary tumors. One of these cases had a similar level of *CaSR* expression before and after treatment, and the percentage of mC was slightly higher in the postchemotherapy sample (NT, 47) than in the primary tumor (NT, 2). In the other four patients, a 2- to 30-fold increase of the *CaSR* mRNA levels was observed after treatment. A modest reduction of mC was detected in two of these samples (NT, 46; NT, 51), whereas the percentage of mC was <6% in the other two (NT, 48; NT, 49).

A remarkable reduction of mC in P2 was also observed in LA1-55n cells exposed to Aza alone or in combination with TSA, whereas TSA alone did not modify the methylation status of this region (Figure 2C, Supplementary Table 3, available at *Carcinogenesis* Online).

To further assess the methylation status of P2, methylation-specific PCR was performed. In neuroblastoma cell lines and tumors with hypermethylated P2, bands for unmethylated and methylated alleles were detected (Figure 2D), except for those cases in which the majority of mC were located in exon 1A (Supplementary Tables 2 and 3, available at *Carcinogenesis* Online).

Table 1. Correlation of *CaSR* mRNA levels and *CaSR* gene promoter 2 methylation status with clinical and biological subgroups in neuroblastic tumors

	No. of patients	<i>CaSR</i> mRNA < median	<i>P</i> *	No. of patients	<i>CaSR</i> gene promoter 2 hypermethylation	<i>P</i> *
<i>MYCN</i> status						
Amplified	7	7 (100%)	0.005	7	4 (57.1%)	0.031
Nonamplified	31	13 (41.9%)		33	6 (18.2%)	
Clinical stage (INSS)						
Stage 4	10	8 (80%)	0.043	12	7 (58.3%)	0.001
Stages 1–4	28	12 (42.8%)		28	3 (10.7%)	
Age at diagnosis, months						
≤18	16	4 (25%)		17	1 (5.9%)	0.016
>18	22	16 (72.7%)	0.004	23	9 (39.1%)	
Pathology (INPC)						
Unfavorable	19	14 (73.7%)	0.009	21	8 (38%)	0.044
Favorable	19	6 (31.6%)		19	2 (10.5%)	
Histologic subgroup						
Undifferentiated neuroblastoma	8	8 (100%)	0.003	8	6 (75%)	0.0001
Poorly differentiated or differentiating neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, ganglioneuroma	30	12 (40%)		32	4 (12.5%)	

INSS, International Neuroblastoma Staging System; INPC, International Neuroblastoma Pathology Classification.

*Univariate analyses using the χ^2 test were performed to assess the correlation of P2 hypermethylation or *CaSR* expression below the median with the clinical and biological subgroups of neuroblastic tumors. $P < 0.05$ was considered significant.

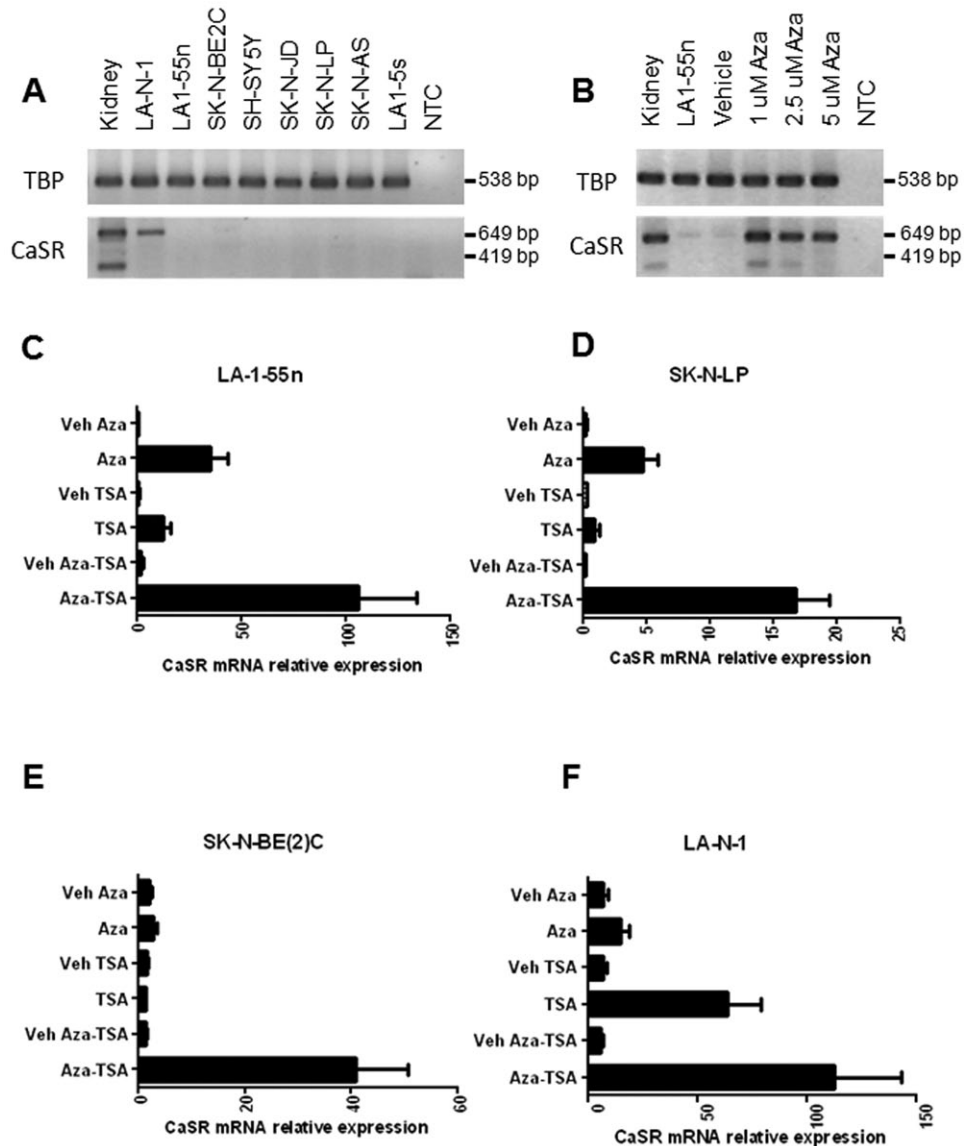


Fig. 1. Upregulation of the *CaSR* gene in neuroblastoma cell lines exposed to epigenetic modifiers. (A) Total RNA was isolated from eight neuroblastoma cell lines and a non-neoplastic tissue (kidney) in which the *CaSR* gene is highly expressed. Analysis of *CaSR* and reference gene *TBP* mRNA was performed by RT-PCR. Full-length transcripts (649 bp) and alternative spliced forms lacking exon 5 (419 bp) of the *CaSR* are co-amplified when high levels of expression are present. NTC: No-template control. (B) LA-1-55n cells were exposed to different concentrations of Aza or its vehicle for 72h. Analysis of *CaSR* and *TBP* mRNA was performed by RT-PCR as above. NTC: No-template control. (C-F) Four *MYCN*-amplified neuroblastoma cell lines were exposed to 1 μ M Aza for 72h and/or 100nM trichostatin A (TSA) for 12h. Relative levels of *CaSR* mRNA expression were analyzed by RT-qPCR according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, using *TBP* as reference gene.

Monosomy of chromosome 3 is present in benign and malignant neuroblastic tumors

Interphase FISH was performed in 48 neuroblastic tumors (40 at diagnosis, 5 at second-look surgery and 2 at relapse) and 8 neuroblastoma cell lines. Among evaluable primary tumors, 31/34 (91%) harbored a percentage of nuclei with monosomy of chromosome 3 above the cut-off value (Supplementary Table 2, available at *Carcinogenesis* Online). They were heterogeneously distributed among tumor cells and no association was found between levels of *CaSR* mRNA and the number of nuclei bearing this alteration in each sample.

Monosomy 3 in $\geq 40\%$ nuclei was associated with the more differentiated histologic subgroups, differentiating neuroblastomas, ganglioneuroblastomas and ganglioneuromas ($P = 0.007$). No evidence of this alteration was found in a differentiating neuroblastoma (NT, 29) but losses at the *CaSR* locus (40% imbalance, 10% deletion)

were detected in 50% of its nuclei. Conversely, the only undifferentiated neuroblastoma in which 40% nuclei showed monosomy 3 was the tumor of a 10-year-old boy (NT, 1), which exhibited an indolent growth, as it is usually the case for neuroblastomas affecting older children.

In neuroblastoma cell lines, $>75\%$ nuclei were disomic, trisomic or tetrasomic (Supplementary Table 3, available at *Carcinogenesis* Online). Monosomy 3, imbalances and deletions at the *CaSR* locus were infrequently detected.

Overexpression of the *CaSR* reduces neuroblastoma proliferation and tumorigenicity

Two *MYCN*-amplified neuroblastoma cell lines, SK-N-LP and SK-N-JD, in which the *CaSR* gene was silenced by promoter hypermethylation, were selected to examine the effects induced by stable transfection of this GPCR. They exhibited high expression of the

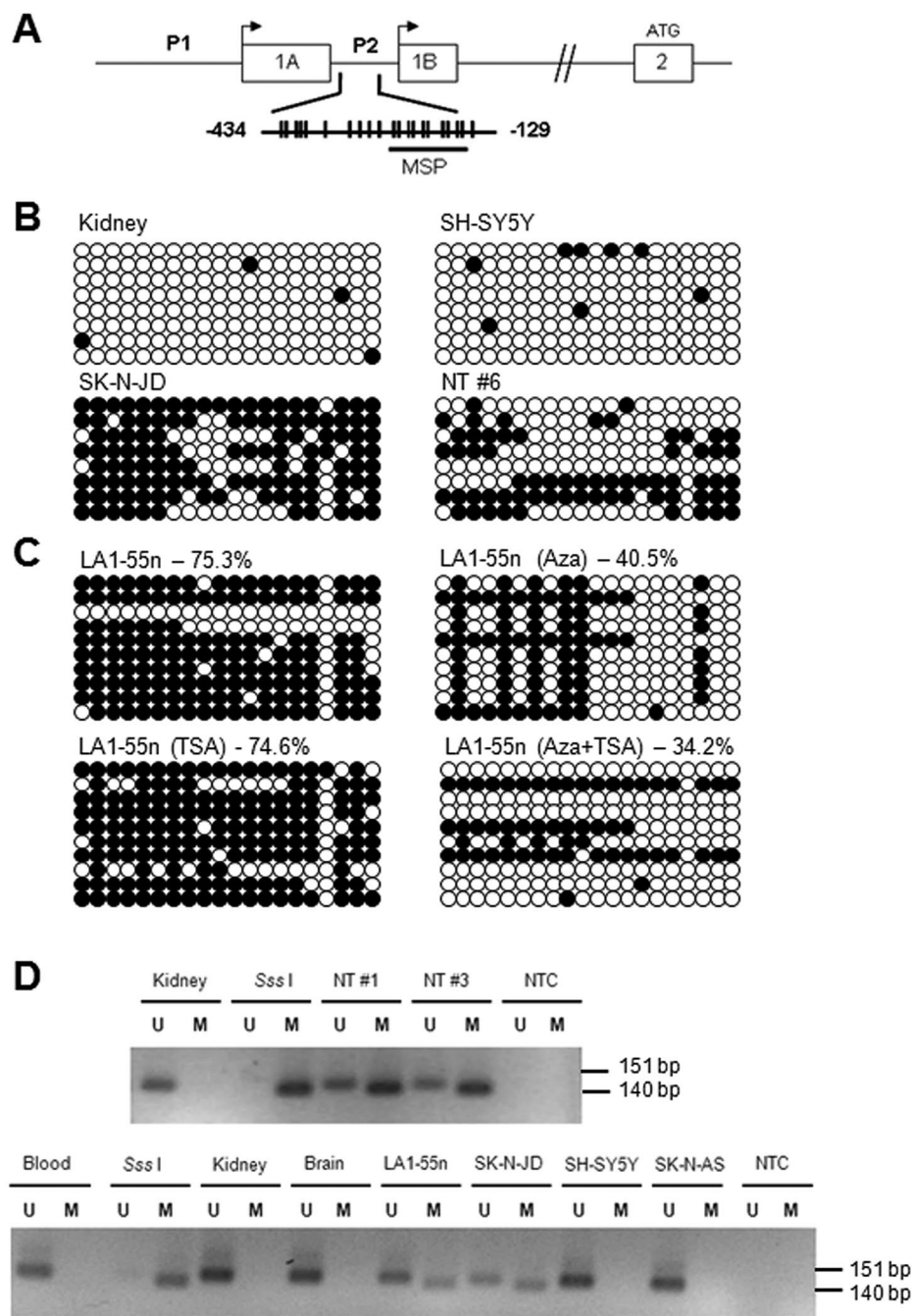


Fig. 2. The *CaSR* gene promoter 2 is hypermethylated in neuroblastoma cell lines and neuroblastic tumors. **(A)** Schematic representation of alternative promoters P1 and P2 of the *CaSR* gene and location of primers designed for methylation-specific PCR. **(B)** Genomic DNA was isolated from non-neoplastic tissues in which the CaSR is expressed, neuroblastoma cell lines, and neuroblastic tumors. DNA was bisulfite-modified and bisulfite-specific PCR was carried out to analyze a fragment of the *CaSR* gene promoter 2 (P2). Methylation status of 20 CpG sites located in this fragment is shown. White and black circles indicate, respectively, unmethylated and methylated CpG sites. **(C)** The same procedure was followed to assess the methylation status of the *CaSR* gene P2 in LA1-55n cells before and after treatment with 1 μ M Aza for 72h and/or with 100nM trichostatin A (TSA) for 12h. **(D)** Following bisulfite modification of genomic DNA samples, methylation status of P2 was also analyzed by methylation-specific PCR in non-neoplastic tissues in which the CaSR is expressed (kidney, brain), neuroblastic primary tumors and neuroblastoma cell lines, as described in the section Materials and methods. Peripheral blood DNA from a healthy donor before and after treatment with Sss I methylase was used as control for unmethylated (U) and methylated (M) alleles. NTC: No-template control.

neuroblastoma-specific marker *PHOX2B*, and levels of neuronal and glial-like differentiation markers consistent with the I-type phenotype (Supplementary Table 3 and Supplementary Figure 2, available at *Carcinogenesis* Online).

Following ectopic overexpression of CaSR mRNA and protein (Supplementary Figure 3, available at *Carcinogenesis* Online), their morphological features and expression of several differentiation

markers did not change overtly (Supplementary Figure 4, available at *Carcinogenesis* Online). However, pCMV-CaSR-GFP clones exhibited significantly reduced proliferation rates compared with wild-type cell lines and pCMV-GFP clones (Figure 3A). Moreover, only 4/45 (8.8%) xenografts were generated in *nu/nu* mice from CaSR-overexpressing clones compared with 30/30 (100%) controls and they were significantly smaller (Figure 3B). One of the four

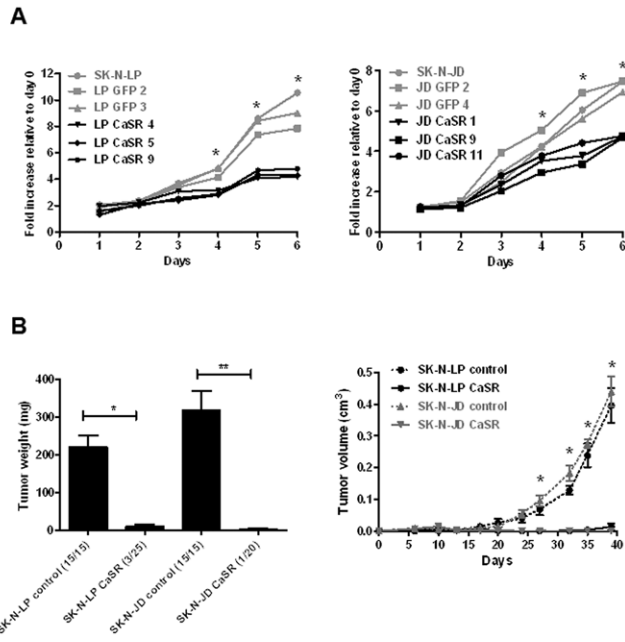


Fig. 3. CaSR overexpression reduces proliferation and tumorigenicity of neuroblastoma cell lines. Two *MYCN*-amplified neuroblastoma cell lines (SK-N-JD and SK-N-LP) in which the *CaSR* gene is silenced by promoter hypermethylation were stably transfected with pCMV-GFP or pCMV-CaSR-GFP. (A) *In vitro* proliferation assays were performed using the crystal violet method. For each clone/cell line, proliferation rates were calculated as a fold increase of the absorbance measured at each time point relative to its corresponding absorbance at day 0 (determined 18 h after plating). Proliferation rates of pCMV-CaSR-GFP clones were significantly reduced when compared with that of wild-type cell lines and pCMV-GFP clones ($*P = 0.001$). (B) Aliquots of 10^7 cells from wild-type SK-N-LP and SK-N-JD cell lines, pCMV-GFP and pCMV-CaSR-GFP transfected clones were injected subcutaneously in *nu/nu* mice. Xenografts were measured thrice a week and weighted after 40 days. Only four specimens developed from CaSR-overexpressing clones and their weight was significantly smaller than that of controls ($*P < 0.001$, $**P < 0.0001$). Tumor volume of xenografts obtained from CaSR-overexpressing clones was significantly smaller than volume of controls from day 27 onwards ($*P < 0.001$).

tumors generated by CaSR-overexpressing clones was calcified. The other three specimens showed similar proliferation index (Ki67), percentage of necrotic areas and apoptotic cells than control xenografts (Supplementary Figure 4, available at *Carcinogenesis* Online). In 2/3 of them, morphological signs of cytodifferentiation were observed together with increased expression of *CaSR*, parathyroid hormone-related protein (*PTHrP*), *RAC1* and peripheral myelin protein 22 (*PMP22*) mRNA (Supplementary Figure 5, available at *Carcinogenesis* Online). However, the most consistent finding was the remarkably reduced capacity of CaSR-overexpressing clones to produce xenografts in *nu/nu* mice, although they were generated from highly tumorigenic I-type neuroblastoma cell lines.

In vitro activation of the CaSR induces apoptosis of neuroblastoma cells dependent on sustained activation of ERK1/2

To gain further insight into the signaling pathways activated by the CaSR in neuroblastoma cells, wild-type SK-N-LP or SK-N-JD cells, pCMV-GFP and pCMV-CaSR-GFP clones were acutely exposed to 0.5 or 3 mM CaCl₂. As expected, morphological signs of differentiation (neuron-like appearance and neurite extension) followed serum deprivation in both control and CaSR-overexpressing neuroblastoma cells. However, when the latter were exposed to 3 mM CaCl₂, groups of cells progressively detached from each other, cell vacuolization gradually appeared and increasing numbers of dead cells were observed (Figure 4A). This phenomenon started approximately 6 h following calcium challenge and cell death was predominant 48 h

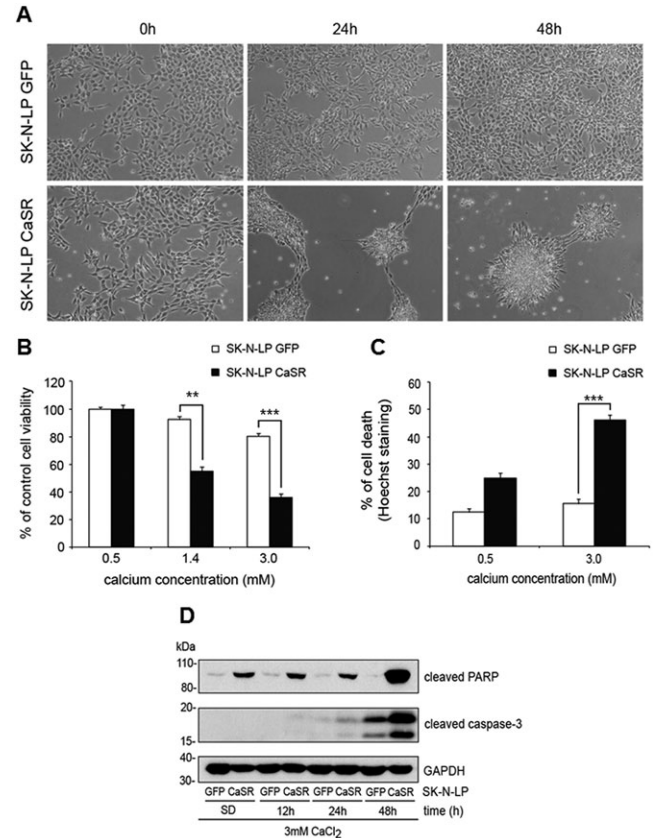


Fig. 4. CaSR activation induces apoptosis of neuroblastoma cell lines. Two *MYCN*-amplified neuroblastoma cell lines (SK-N-JD and SK-N-LP) in which the *CaSR* gene is silenced by promoter hypermethylation were stably transfected with pCMV-GFP or pCMV-CaSR-GFP. Pools of pCMV-GFP and pCMV-CaSR-GFP clones were prepared. (A) Cells were plated in RPMI-1640 10% FBS. Next day, cells were switched to calcium-free Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with bovine serum albumin (0.2% w/v), 4 mM L-glutamine and 0.5 mM CaCl₂ for 16 h, followed by exposure to the same medium containing either 0.5 or 3 mM CaCl₂ for 48 h. Cell-cell detachment, massive vacuolization and non-refracting, floating dead cells were observed in CaSR-overexpressing neuroblastoma cells exposed to 3 mM CaCl₂ while control cultures continued to grow. This phenomenon was replicated at least three times. (B) Control and CaSR-overexpressing neuroblastoma cells were serum starved for 16 h and then exposed to different concentrations of CaCl₂ for 48 h. Cell viability was quantified with CellTiter96 Aqueous Cell proliferation Assay. Absorbance was measured at 490 nm. Graphic shows a significant decrease in the percentage of cell viability ($*P < 0.001$, $**P < 0.0001$) in CaSR-overexpressing cells compared with control neuroblastoma cells (mean and standard error of mean of two independent experiments). (C) Following the same experiment described in (A), cells were fixed and nuclei were stained with Hoechst 33342. Uniformly stained nuclei were scored as viable cells, whereas condensed or fragmented nuclei were scored as apoptotic using ImageJ-1.42q software. Graphic shows the significant increase ($**P < 0.0001$) in the percentage of Hoechst 33342-positive apoptotic nuclei in CaSR-overexpressing neuroblastoma cells compared with control cells (mean and standard error of mean of two independent experiments). (D) Total cells lysates were prepared at indicated times following the experiment described in (A). PARP cleavage and caspase-3 activation were analyzed by western blotting using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as internal loading control. Results shown are representative of at least two independent immunoblots.

later. Scattered dead cells were also seen in control cultures exposed to 3 mM CaCl₂, although they continued to grow over the period examined.

Decreased viability of CaSR-overexpressing neuroblastoma cells was significant at 24 and 48 h after calcium exposure, and this happened at physiological (1.4 mM) and supraphysiological (3 mM) concentrations of calcium (Figure 4B), concurrent with increased

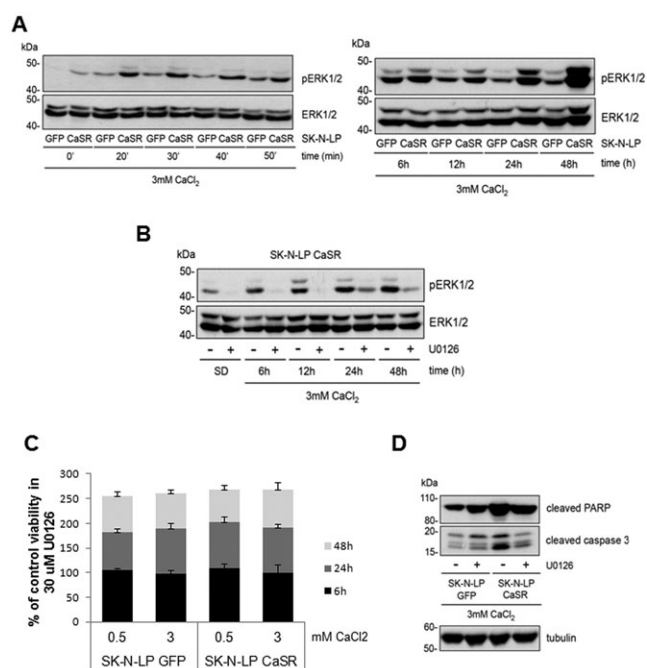


Fig. 5. Apoptosis promoted by activation of the CaSR in neuroblastoma cell lines is dependent on sustained phosphorylation of ERK1/2. Two *MYCN*-amplified neuroblastoma cell lines (SK-N-JD and SK-N-LP) in which the *CaSR* gene is silenced by promoter hypermethylation were stably transfected with pCMV-GFP or pCMV-CaSR-GFP. Pools of pCMV-GFP and pCMV-CaSR-GFP clones were prepared. Cells were plated in RPMI-1640 10% FBS. Next day, cells were switched to calcium-free Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with bovine serum albumin (0.2% w/v), 4 mM L-glutamine and 0.5 mM CaCl₂ for 16 h, followed by exposure to the same medium containing either 0.5 or 3 mM CaCl₂ for 48 h. Representative results of at least two independent experiments are shown in each of the five panels. (A) Total cells lysates were prepared at indicated times and phosphorylation status of ERK1/2 was analyzed by immunoblot. The same experiments were performed in the presence or absence of 30 μM U0126, applied 2 h prior serum deprivation and along the following 48 h; (B) Total cells lysates were prepared at indicated times. ERK1/2 phosphorylation status was analyzed by immunoblot as described. (C) Cell viability was quantified with CellTiter96 Aqueous Cell proliferation Assay. Absorbance was measured at 490 nm. (D) PARP cleavage and caspase-3 activation were analyzed by immunoblot using β-tubulin as internal loading control.

numbers of Hoechst-positive apoptotic nuclei (Figure 4C). Moreover, exposure to 3 mM CaCl₂ in CaSR-overexpressing neuroblastoma cells resulted in caspase-3 activation and PARP cleavage. Both indicators of apoptosis were also activated in control cells, although at much lower levels (Figure 4D).

Finally, sustained phosphorylation of ERK1/2 was detected in CaSR-overexpressing neuroblastoma cells exposed to 3 mM CaCl₂ over the hours examined, whereas this activation was transient and weak in control cells (Figure 5A).

Upon treatment with MEK inhibitor U0126, ERK1/2 phosphorylation was notably reduced (Figure 5B). Concurrently, cell viability (Figure 5C) and activation of caspase-3 and PARP (Figure 5D) were detected at similar levels in control and CaSR-overexpressing neuroblastoma cells exposed to 3 mM CaCl₂. All these features were replicated in the SK-N-JD neuroblastoma cell line (Supplementary Figure 6, available at *Carcinogenesis* Online).

Discussion

The aim of this work was to evaluate genetic and epigenetic mechanisms potentially responsible for the transcriptional silencing of the *CaSR* gene in neuroblastic tumors and the effects promoted by its re-expression and activation.

To investigate whether this gene was inactivated by epigenetic mechanisms, neuroblastoma cell lines were exposed to Aza and TSA. Increased expression of the *CaSR* was seen in *MYCN*-amplified cell lines following this treatment, an indication that, at least *in vitro*, this gene was epigenetically silenced. A particular region was identified in the CpG island encompassing the *CaSR* gene promoter 2 in which decreased numbers of CpG sites were detected upon re-expression of the *CaSR* with Aza. This would indicate that hypermethylation of this portion of the CpG island is one of the epigenetic mechanisms that inactivate the *CaSR* gene in neuroblastoma.

Hypermethylation of this region was also seen in 25% primary neuroblastomas, in association with low levels of *CaSR* expression and several prognostic factors of poor outcome in these tumors, including *MYCN* amplification. A number of epigenetically silenced genes have been reported in neuroblastoma in association with *MYCN* amplification and poor outcome (29–32). Epigenetic inactivation of the *CaSR* gene has been also detected in advanced, undifferentiated colorectal carcinomas (33).

To investigate genetic mechanisms that might contribute to downregulation of this GPCR in neuroblastic tumors, allelic losses at the *CaSR* locus were assessed by Interphase FISH. Monosomy of chromosome 3 was detected in the majority of primary tumors, and higher percentages of nuclei with this alteration were seen among differentiated histological subgroups. Heterozygous gene deletion promoted by monosomy has been described to be associated with significant loss of mRNA expression of specific genes (34) and monosomy 3 has previously been found in benign neuroblastic tumors by array-comparative genomic hybridization (aCGH) (35). The higher sensitivity of the Interphase FISH allowed for the identification of variable percentages of nuclei harboring this alteration in the majority of tumors. However, in the specimens examined, monosomy 3 was not correlated with reduced levels of *CaSR* mRNA expression. This might be due, at least partially, to low percentages of nuclei bearing this alteration in most specimens and their heterogeneous distribution among tumor cells. Monosomy 3 has also been reported in two other neural-crest-derived neoplasms, pheochromocytomas (36) and uveal melanomas (37), where it also shows a heterogeneous distribution. The functional consequences of monosomy 3 in these neoplasms remain to be established. However, we hypothesize that, in the context of malignant neuroblastomas, it might cooperate with epigenetic mechanisms of transcriptional silencing to inactivate the *CaSR* gene. Absence of monosomy 3 in neuroblastoma cell lines could be interpreted as a transitional clonal chromosomal abnormality (38). Given that downregulation of the *CaSR* gene is also detected in the absence of chromosomal losses and/or P2 hypermethylation, additional mechanisms of transcriptional regulation are being examined.

The CaSR is believed to reduce parathyroid cell proliferation since downregulation or inactivating mutations of this gene in humans (39) and knockout mice (40) are associated with parathyroid hyperplasia. In neuroblastoma cell lines, *in vitro* proliferation rates of CaSR-overexpressing clones were significantly reduced compared with controls, and their capacity to generate tumors in immunocompromised mice was almost abolished.

Thus, to gain further insight into the mechanisms promoted by the CaSR in neuroblastoma cells, we took advantage of an *in vitro* model that has been widely used to characterize signaling pathways activated by this GPCR in different cellular contexts (41–43). Interestingly, upon acute exposure to calcium, CaSR-overexpressing neuroblastoma cells underwent apoptosis. It has been reported that re-expression of genes whose DNA methylation is necessary for cancer cell survival leads to increased cell death (44). Our data show that re-expression and activation of the CaSR induces apoptosis in two neuroblastoma cell lines in which this gene is downregulated by promoter hypermethylation. This would support the hypothesis that epigenetic silencing of the *CaSR* gene is neither an *in vitro* artefact in neuroblastoma cell lines nor a collateral 'passenger' event in primary neuroblastic tumors, but a mechanism relevant for neuroblastoma survival.

Among signaling cascades potentially involved in this apoptotic process, we chose to examine ERK1/2, the two isoforms of ERK.

A large body of evidence indicates that ERK1/2 may mediate proliferation, migration, differentiation and several mechanisms of cell death (45). In numerous contexts, cell death mediated by the Ras-Raf-MEK-ERK pathway is dependent on sustained phosphorylation of ERK1/2 (46). This was also the case in our *in vitro* model. In the presence of a MEK inhibitor, activation of ERK1/2 was remarkably reduced and similar levels of apoptosis were detected in control and CaSR-overexpressing cells exposed to calcium. This would indicate that apoptosis induced by activation of the CaSR in neuroblastoma cells is, at least, partially dependent on ERK1/2 activation.

In this *in vitro* model, the CaSR is expressed at much higher levels than those detected in primary neuroblastic tumors. Moreover, activation of this receptor in primary tumors is more likely to happen not acutely but in a sustained way. Therefore, specific models to analyze these potential differences are currently being developed. However, ectopic overexpression induced by stable transfection is the model most commonly used to show the deleterious effects of a potential tumor suppressor gene on cancer cell survival, proliferation and tumorigenic capacities. And, in the present context, it has contributed to provide evidence that epigenetic silencing of the *CaSR* gene is a relevant mechanism for neuroblastoma survival and growth.

Altogether, our data would be consistent with a tumor-suppressor role of the CaSR in neuroblastic tumors. Potential therapeutic opportunities derived from these findings are currently being explored.

Supplementary material

Supplementary Figures 1–6 and Tables 1–3 can be found at <http://carcin.oxfordjournals.org/>

Funding

Fundació Privada Cellex (CdT); Instituto de Salud Carlos III (CD6/00001 to J.L.O).

Acknowledgements

We would like to thank our patients and their families for sustained, invaluable contribution, Raquel Iniesta for statistical analyses, and Fundació Privada Cellex and other institutions (Pablo Ugarte Association, Caja Navarra, Caixa Tarragona, Proclinic) for their relevant financial support.

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

1. Maris, J.M. (2010) Recent advances in neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.*, **362**, 2202–2211.
2. Brodeur, G.M. (2003) Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 203–216.
3. Ambros, I.M. *et al.* (1996) Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.*, **334**, 1505–1511.
4. Bown, N. *et al.* (1999) Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.*, **340**, 1954–1961.
5. Brodeur, G.M. *et al.* (1984) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*, **224**, 1121–1124.
6. Cohn, S.L. *et al.* (2009) The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J. Clin. Oncol.*, **27**, 289–297.
7. Mora, J. *et al.* (2007) Comprehensive analysis of tumoral DNA content reveals clonal ploidy heterogeneity as a marker with prognostic significance in locoregional neuroblastoma. *Genes. Chromosomes Cancer*, **46**, 385–396.
8. Ross, R.A. *et al.* (1995) Human neuroblastoma I-type cells are malignant neural crest stem cells. *Cell Growth Differ.*, **6**, 449–456.
9. Walton, J.D. *et al.* (2004) Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia*, **6**, 838–845.
10. Shimada, H. *et al.* (2001) International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*, **92**, 2451–2461.

11. Henrich, K.O. *et al.* (2011) CAMTA1, a 1p36 tumor suppressor candidate, inhibits growth and activates differentiation programs in neuroblastoma cells. *Cancer Res.*, **71**, 3142–3151.
12. Liu, Z. *et al.* (2011) CASZ1, a candidate tumor-suppressor gene, suppresses neuroblastoma tumor growth through reprogramming gene expression. *Cell Death Differ.*, **18**, 1174–1183.
13. Takenobu, H. *et al.* (2011) CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. *Oncogene*, **30**, 97–105.
14. de Torres, C. *et al.* (2009) The calcium-sensing receptor and parathyroid hormone-related protein are expressed in differentiated, favorable neuroblastic tumors. *Cancer*, **115**, 2792–2803.
15. Brown, E.M. *et al.* (1993) Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*, **366**, 575–580.
16. Saidak, Z. *et al.* (2009) The role of the calcium-sensing receptor in the development and progression of cancer. *Endocr. Rev.*, **30**, 178–195.
17. Liao, J. *et al.* (2006) Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res.*, **66**, 9065–9073.
18. Haven, C.J. *et al.* (2004) Differential expression of the calcium sensing receptor and combined loss of chromosomes 1q and 11q in parathyroid carcinoma. *J. Pathol.*, **202**, 86–94.
19. Chakrabarty, S. *et al.* (2003) Extracellular calcium and calcium sensing receptor function in human colon carcinomas: promotion of E-cadherin expression and suppression of beta-catenin/TCF activation. *Cancer Res.*, **63**, 67–71.
20. Canaff, L. *et al.* (2002) Human calcium-sensing receptor gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J. Biol. Chem.*, **277**, 30337–30350.
21. DePreter, K. *et al.* (2002) Quantification of MYCN, DDX1, and NAG gene copy number in neuroblastoma using a real-time quantitative PCR assay. *Mod. Pathol.*, **15**, 159–166.
22. Brandes, J.C. *et al.* (2007) Optimal primer design using the novel primer design program: MSPprimer provides accurate methylation analysis of the ATM promoter. *Oncogene*, **26**, 6229–6237.
23. Lavarino, C. *et al.* (2008) Differential expression of genes mapping to recurrently abnormal chromosomal regions characterize neuroblastic tumours with distinct ploidy status. *BMC Med. Genomics*, **1**, 36.
24. Becker, J. *et al.* (2006) Keratopithelin suppresses the progression of experimental human neuroblastomas. *Cancer Res.*, **66**, 5314–5321.
25. Alaminos, M. *et al.* (2005) 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.*, **65**, 2565–2571.
26. Kaplan, E.L. *et al.* (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.*, **53**, 457–481.
27. Mantel, N. (1966) Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother. Rep.*, **50**, 163–170.
28. Cox, D.R. (1972) Regression models and lifetables. *J. R. Stat. Soc. B*, **74**, 187–220.
29. Alaminos, M. *et al.* (2004) Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **96**, 1208–1219.
30. Yang, Q. *et al.* (2004) Association of epigenetic inactivation of RASSF1A with poor outcome in human neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.*, **10**, 8493–8500.
31. Abe, M. *et al.* (2005) CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.*, **65**, 828–834.
32. Yang, Q. *et al.* (2007) Methylation of CASP8, DCR2, and HIN-1 in neuroblastoma is associated with poor outcome. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 3191–3197.
33. Hizaki, K. *et al.* (2011) Epigenetic inactivation of calcium-sensing receptor in colorectal carcinogenesis. *Mod. Pathol.*, **24**, 876–884.
34. Yadav, A.K. *et al.* (2009) Monosomy of chromosome 10 associated with dysregulation of epidermal growth factor signaling in glioblastomas. *JAMA*, **302**, 276–289.
35. Spitz, R. *et al.* (2006) Oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization (aCGH) of 90 neuroblastomas reveals aberration patterns closely associated with relapse pattern and outcome. *Genes. Chromosomes Cancer*, **45**, 1130–1142.
36. Dannenberg, H. *et al.* (2000) Losses of chromosomes 1p and 3q are early genetic events in the development of sporadic pheochromocytomas. *Am. J. Pathol.*, **157**, 353–359.
37. Onken, M.D. *et al.* (2007) Loss of heterozygosity of chromosome 3 detected with single nucleotide polymorphisms is superior to monosomy 3 for predicting metastasis in uveal melanoma. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 2923–2927.
38. Ye, C.J. *et al.* (2009) Genome based cell population heterogeneity promotes tumorigenicity: the evolutionary mechanism of cancer. *J. Cell. Physiol.*, **219**, 288–300.

39. Yano, S. *et al.* (2000) Association of decreased calcium-sensing receptor expression with proliferation of parathyroid cells in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.*, **58**, 1980–1986.
40. Ho, C. *et al.* (1995) A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Nat. Genet.*, **11**, 389–394.
41. Hjälm, G. *et al.* (2001) Filamin-A binds to the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor, an interaction that participates in CaR-mediated activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34880–34887.
42. Loretz, C.A. *et al.* (2004) cDNA cloning and functional expression of a Ca²⁺-sensing receptor with truncated C-terminal tail from the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *J. Biol. Chem.*, **279**, 53288–53297.
43. Zhang, M. *et al.* (2005) High affinity interaction with filamin A protects against calcium-sensing receptor degradation. *J. Biol. Chem.*, **280**, 11140–11146.
44. DeCarvalho, D.D. *et al.* (2012) DNA methylation screening identifies driver epigenetic events of cancer cell survival. *Cancer Cell*, **21**, 655–667.
45. Meloche, S. *et al.* (2007) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*, **26**, 3227–3239.
46. Cagnol, S. *et al.* (2010) ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death—apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J.*, **277**, 2–21.

Received August 10, 2012; revised October 5, 2012; accepted October 21, 2012

SUPPORTING INFORMATION LEGENDS

TABLES

Supplementary Table 1. Primer sequences and conditions used in methylation and bisulfite-specific PCR for analysis of the methylation status at the CpG island encompassing the *CaSR* gene promoter 2.

Supplementary Table 2. Analysis of *CaSR* mRNA expression, promoter 2 methylation status (% methylated CpG sites at the CpG island encompassing the *CaSR* gene promoter 2) and allelic status at the *CaSR* gene locus by interphase fluorescence *in situ* hybridization in neuroblastic tumors. Clinical and biological features of patients are also shown.

Supplementary Table 3. Percentage of methylated CpG sites at the CpG island encompassing the *CaSR* gene promoter 2 in non-neoplastic tissues, wild-type neuroblastoma cell lines and in LA1-55n cells exposed to epigenetic modifiers. Analysis of chromosomal losses at the *CaSR* gene locus by interphase fluorescence *in situ* hybridization in neuroblastoma cell lines.

FIGURES

Supplementary Fig. 1. Schematic representation of the CpG island encompassing the *CaSR* gene promoter 2 and location of primers used in bisulfite-specific PCR. A search for CpG islands was conducted in the sequence *Homo sapiens calcium-sensing receptor gene, alternative promoters and exons 1A and 1B* (GenBank AY116081). Criteria included: Island size >200 bp, GC content >50% and observed *versus* expected CpG content >0.6. A CpG island 1189 bp long was found encompassing the last 139 bp of exon 1A (+436 to +641), the entire promoter 2, exon 1B and 170 bp in the flanking 3'UTR

region. Primers were designed to analyze the entire CpG island by bisulphite sequencing. The size of bisulphite-specific PCR products is indicated.

Supplementary Fig. 2. Expression of *PHOX2B*, neurofilament light chain (*NFL*), growth associated protein 43 (*GAP43*) and glial fibrillary acidic protein (*GFAP*) transcripts in neuroblastoma cell lines. Total RNA was isolated from eight neuroblastoma cell lines. Transcript levels of indicated genes were assessed by RT-qPCR relative to those detected in LA-N-1 cells (except for *GFAP*, whose levels were calculated relative to a tumor sample), using *TATA-box binding protein* as housekeeping gene.

Supplementary Fig. 3. Analysis of *CaSR* mRNA and protein expression in SK-N-LP and SK-N-JD wild-type neuroblastoma cell lines, pCMV-GFP and pCMV-*CaSR*-GFP transfected clones. Two *MYCN*-amplified neuroblastoma cell lines (SK-N-JD and SK-N-LP) in which the *CaSR* gene is silenced by promoter hypermethylation were stably transfected with pCMV-GFP or pCMV-*CaSR*-GFP. Single cell clones were generated by limiting dilutions and maintained in G418. *CaSR* expression was monitored by RT-qPCR, Western blot and direct fluorescent imaging. (A) RT-qPCR was carried out as described above, except that levels of expression were calculated relative to those detected in SK-N-LP pCMV-*CaSR*-GFP clone 6. (B) Total cell extracts were obtained and immunoblots were carried out to detect *CaSR* protein expression. β -tubulin was used as internal loading control. (C) Direct fluorescence microscopy was used to observe *CaSR*-GFP fusion protein in transfected cells. Picture shows cells from SK-N-LP pCMV-*CaSR*-GFP clone 5.

Supplementary Fig. 4. Morphological examination and analysis of expression of differentiation markers in control and *CaSR*-overexpressing neuroblastoma SK-N-LP cells. SK-N-LP cells were stably transfected with

pCMV-GFP or pCMV-CaSR-GFP. Total RNA was isolated from wild-type, pCMV-GFP and pCMV-CaSR-GFP clones. Relative mRNA levels of several differentiation markers (*neurofilament light chain*, *Notch1*, *tubulin β III*, *microtubule associated protein 2*, *growth associated protein 43* and *glial fibrillary acidic protein*) were analyzed by RT-qPCR. Transcript levels were calculated relative to those detected in wild-type cell lines using *TATA-box binding protein* as housekeeping gene.

Supplementary Fig. 5. Morphological examination and analysis of proliferation, differentiation and cell death parameters in xenografts generated from control and CaSR-overexpressing SK-N-LP and SK-N-JD neuroblastoma cells. Two *MYCN*-amplified neuroblastoma cell lines (SK-N-JD and SK-N-LP) were stably transfected with pCMV-GFP or pCMV-CaSR-GFP. Aliquots of 10^7 cells from wild-type SK-N-LP and SK-N-JD cell lines, pCMV-GFP and pCMV-CaSR-GFP transfected clones were injected subcutaneously in 4-6 week-old female *nu/nu* mice. Forty days after injections, animals were sacrificed and tumors were weighed. Half specimen was formalin-fixed, paraffin-embedded and the other part was flash-frozen in liquid nitrogen for RNA extraction. Hematoxylin-eosin stain of formalin-fixed, paraffin-embedded sections was performed to examine (A) percentage of necrotic areas (B) morphology (morphological signs of cytodifferentiation are shown in xenograft generated from SK-N-JD pCMV-CaSR-GFP clone 1). Immunohistochemistry (A) was also conducted to examine a neuroblastoma-associated marker (synaptophysin), CaSR expression, proliferation index (Ki67) and two apoptosis associated parameters, activated caspase-3 and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (c-PARP). Similar percentages were found in specimens generated from control and CaSR-overexpressing cells. (C). Expression of *CaSR*, *PTHrP* and several differentiation markers was analyzed by RT-qPCR in frozen specimens.

Supplementary Fig. 6. Apoptosis induced by CaSR activation in neuroblastoma SK-N-JD cells is dependent on sustained phosphorylation of ERK1/2. Control and CASR-overexpressing SK-N-JD cells were serum starved for 16 hours and then exposed to 0.5 or 3 mM CaCl₂ for 48 hours. **(A)** Cell-cell detachment, massive vacuolization and non-refracting, floating dead cells were observed in CaSR-overexpressing neuroblastoma cells exposed to 3mM CaCl₂ while control cultures continued to grow. **(B)** Cell viability was quantified with CellTiter96 Aqueous Cell proliferation Assay. Absorbance was measured at 490 nm. Graphic shows a significant decrease in the percentage of cell viability (** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$) in CaSR-overexpressing cells compared to control cells (mean and standard error of mean -SEM- of two independent experiments). **(C)** Total cells lysates were prepared at indicated times following the experiment described in **(A)**. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage and caspase-3 activation were analyzed by Western blot using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as internal loading control. **(D)** Total cells lysates were prepared at indicated times following experiment described in **A** and phosphorylation status of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) was analyzed by immunoblot. **(E)** The same experiments were performed in the presence or absence of 30 μ M U0126, applied two hours prior serum deprivation and along the following 48 hours. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage and caspase-3 activation were analyzed by immunoblot using β -tubulin as internal loading control.

Supplementary Table 1. Primer sequences and conditions used in methylation and bisulfite-specific PCR for analysis of the methylation status at the CpG island encompassing the *CaSR* gene promoter 2.

PCR	Forward primer	Reverse primer	Annealing T°C	Product size (bp)
BSP-1	gtt agg ggt tag gga taa gga t	caa aaa act taa cta act ctt caa a	56	546
BSP-2	att tat ttt att gtg aat ttt tgg	caa aaa act taa cta act ctt caa a	56	306
BSP-3	ttt gaa gag tta gtt aag ttt ttt g	taa act cta atc taa tct caa aac ta	56	345
BSP-4	agt ttt gag att aga tta gag ttt attt t	aaa cac aaa aaa cta cca aca aca a	56	389
MSP-U	gat ttg aga gtt ggg aat ttt tgg ttt ggt atg	act taa cta act ctt caa aat cac taa aaa cac a	58	140
MSP-M	gtc ggg aat ttt tgg ttc ggt ac	tta act aac tet tca aaa tcg cta aaa acg cg	65	151

Supplementary Table 2. Analysis of *CaSR* mRNA expression, promoter 2 methylation status (% methylated CpG sites at the CpG island encompassing the *CaSR* gene promoter 2) and allelic status at the *CaSR* gene locus by interphase fluorescence *in situ* hybridization in neuroblastic tumors.

Non-neoplastic tissues	CaSR mRNA
Kidney-1	3114
Kidney-2	4497
Adrenal gland (8 yo)	18.1
Adrenal gland (20 weeks)	840.4
Brain (adult-1)	0.58
Brain (adult-2)	0.76
Brain (5 yo)	13.7

Primary tumors	Histologic subgroup	Pathology (NPC)	MYCN status	Clinical stage (INSS)	Age at diagnosis, months	CasR mRNA	% clones with >25% mC in BSP-1	BSP-1, ex 1A (% mC)	BSP-2 (% mC)	BSP-3 (% mC)	BSP-4 (% mC)	MSP	2G2R	1G1R	3G3R	4G4R	2G1R	5G5R	3G2R	3G1R	4G2R	4G3R	All losses at CasR locus	Event (1=event, 0=no event)	Status (1=Dead, 0=Alive)	F.up.days	F.up.event days
1	Undifferentiated NB	U	NA	4	120	0	90	77.3	42.9	4.4	6	U+M	57	41	2								41	1	1	2798	1582
2	Undifferentiated NB	U	NA	4	24	0	42.8	26.1	7.6	1.7	3.4	U	NE										NE	1	1	272	272
3	Undifferentiated NB	U	A	4	48	0	16.6	16.5	32.3	5.6	1.1	U+M	74	16	4	1	5						21	1	1	269	269
4	Undifferentiated NB	U	A	4	24	0	0		2.5	3.7		U	58	33	7	1	1						34	1	1	209	209
5	Undifferentiated NB	U	A	3	24	0.55	0		4.3	5.2		U	65	21	10	0	2	1	1				25	1	1	617	405
6	Undifferentiated NB	U	A	3	24	1.65	54.5	21.48	27.3	3.7	2.9	U+M	80	10	8	1	1						11	1	0	1340	518
7	Undifferentiated NB	U	A	4	19	0	27.2	19.7	6.9			U	NE										NE	0	0	2617	
8	Undifferentiated NB	U	A	4	21	2.51	30	11.7	16.15			U+M	NE										NE	0	0	883	
9	Poorly differentiated NB	U	NA	4	72	6.58	0		3.6	4.8		U	61	36	3								36	1	1	772	772
10	Poorly differentiated NB	U	NA	4	72	4.31	0		4.1	3.2			61	13	7	4	8	5	1	1			28	1	0	2283	561
11	Poorly differentiated NB	F	NA	1	10	3.41	80	63.6	61.7	4.5	1.7	U+M	64	22	9	1	4						26	0	0	2071	
12	Poorly differentiated NB	U	NA	4s	2	1.42	0		1.6			U	65	14	16	3		2					16	0	0	1584	
13	Poorly differentiated NB	F	NA	3	15	6.82	0		1.8				45	35	9	7	2	2					37	0	0	1461	
14	Poorly differentiated NB	U	A	1	22	0.95	0		5.8				61	27	8	4							31	0	0	1706	
15	Poorly differentiated NB	U	NA	3	12+21d	6.94	0	2.8	5			U	55	16	24	4		1					17	0	0	1431	
16	Poorly differentiated NB	U	NA	4	72	72	18.2	7.9	10.7	2.4	4.4	U	38	31	18	5	8						39	1	1	1306	486
17	Poorly differentiated NB	F	NA	4s	0	11.1	0		2			U	72	16	8	4							16	0	0	2843	
18	Poorly differentiated NB	U	NA	4	12	262	0		2				64	26	7	1	2						28	0	0	1003	
19	Poorly differentiated NB	F	NA	3	8	6.54	0		2.1			NE											NE	0	0	2861	
20	Poorly differentiated NB	F	NA	1	12+4d	4.56	0		3.3			U	60	34	2		4						38	0	0	2283	
21	Poorly differentiated NB	F	NA	3	0	0.29	0		0.5				60	22	9	2	5	2					29	0	0	2252	
22	Poorly differentiated NB	F	NA	3	1	4.64	0	4.4	2.1	1.7	3.4		79	3	7	3		3					11	0	0	1187	
23	Poorly differentiated NB	U	NA	4	39	2.42	50	32.9	19.5	2.8	1	U+M	68	25	7								25	1	1	419	419
24	Poorly differentiated NB	F	NA	4s	0	44.9	0	0.7	2.6			NE											NE	0	0	1156	
25	Poorly differentiated NB	F	NA	4s	0	6.61	0		3				57	36	4		3						39	0	0	883	
26	Poorly differentiated NB	U	NA	1	5	23.84	0		1				77	12	6		5						17	0	0	883	
27	Poorly differentiated NB	U	NA	4s	5	14.98	0		2.3			U	50	34			4	1	1				39	0	0	610	
28	Poorly differentiated NB	U	NA	3	49	3.12	0		3.2			U	NE										NE	0	0	610	
29	Differentiating NB	F	NA	4s	4	20	0		5			U	20	0	30			40	10				50	0	0	2314	
30	Differentiating NB	F	NA	4s	6	128	0		3.75				51	33	6		7	3					43	0	0	1614	
31	Differentiating NB	U	NA	3	216	1.05	0		5				32	59	6	3							59	0	0	1584	1048
32	Ganglioneuroblastoma	F	NA	3	18+	5.85	0		1.5				45	16	22	2	9	1	3				1	1	1	2040	
33	Ganglioneuroblastoma	F	NA	2	72	0	27.2	23.5	7.5	2.1	5.3	U	45	49	4	2							49	0	0	1369	

Primary tumors	Histologic subgroup	Pathology (INPC)	MYCN status	Clinical stage (INSS)	Age at diagnosis, months	CasR mRNA	% clones with >25% mC in BSP-1	BSP-1, ex 1A (% mC)	BSP-2 (% mC)	BSP-3 (% mC)	BSP-4 (% mC)	MSP	2G2R	1G1R	3G3R	4G4R	2G1R	5G5R	3G2R	3G1R	4G2R	4G3R	All losses at CasR locus	Event (1=event, 0=no event)	Status (1=Dead, 0=Alive)	F.up.days	F.up.event days
34	Ganglioneuroblastoma, nodular	U	NA	4	60	3.77	0		3.75				43	38	17	2							38	1	1	1645	580
35	Ganglioneuroma	F	NA	1	39	1	0		5.8				54	34	8		4						38	0	0	3532	
36	Ganglioneuroma	F	NA	1	96	23.8	0		5				77	21	2								21	0	0	3257	
37	Ganglioneuroma	F	NA	2	75	2.09	0		4.2				55	39	3		3						42	0	0	2290	
38	Ganglioneuroma	F	NA	1	24	5.25	0		1.1				63	33	4								33	0	0	1706	
39	Ganglioneuroma	F	NA	1	11	0	0		6			U	72	27	1								27	0	0	1400	
40	Ganglioneuroma	F	NA	1	48	9.6	0		2				50	10	34		4	1	1				15	0	0	739	

NB: neuroblastoma **A:** amplified **Median 4.04** **BSP:** Bisulphite specific PCR **MSP:** Methylation-specific PCR **R:** Red signal (CasR locus)
U: Unfavorable **NA:** non amplified **mC:** methylated CpG sites **G:** Green signal (centromere chromosome 3)

Second-look	Pathology	Matching primary tumor	CasR mRNA	% clones with >25% mC in BSP-1	BSP-1, ex 1A (% mC)	BSP-2 (% mC)	BSP-3 (% mC)	BSP-4 (% mC)	MSP	2G2R	1G1R	3G3R	4G4R	2G1R	5G5R	3G2R	3G1R	4G2R	4G3R	All losses at CasR
41	Undifferentiated NB	#5	ihc negative	0		6				67	27			6						33
42	Moderate signs of differentiation	#19	4.11	0		5.7				NE										
43	Notable signs of differentiation	#10	ihc positive	0		5				57	30	5	1	7						37
44	Notable signs of differentiation	not available	55.9	0		5				54	46									46
45	Moderate signs of differentiation	#11	3.05	0		5.7				NE										
46	Moderate signs of differentiation	#3	8.5	28	ND	25.8	1.07	8.7	ND	56	30	10	3	3	1					34
47	Moderate signs of differentiation	#2	2.05	75	87.5	16.8	1.7	3.4	U+M	71	18	3	8	8						26
48	Moderate signs of differentiation	#23	5.24	0		3.7				NE										
49	Moderate signs of differentiation	#7	10.3	0		1				NE										
50	Undifferentiated NB	#5	1.16	0		6.5				66	29	5								29
51	Moderate signs of differentiation	#1	30.6	91	84.3	38.3	4.7	20.7	U+M	60	30	8	2							30
52	Poorly differentiated NB	#31	0.73	0		0.5				NE										

NE: not evaluable

Supplementary Table 3. Percentage of methylated CpG sites at the CpG island encompassing the *CaSR* gene promoter 2 in non-neoplastic tissues, wild-type neuroblastoma cell lines and in LA1-55n cells exposed to epigenetic modifiers.

Cell line	Phenotype	MYCN status	<i>CaSR</i> mRNA	BSP-1 (% mC)	BSP-3 (% mC)	BSP-4 (% mC)	MSP	2G2R	1G1R	3G3R	4G4R	2G1R	5G5R	3G2R	3G1R	4G2R	4G3R
LA-N-1	N-type	A	1	39.2	21.2	16.1	U+M			7	93						
LA1-55n	N-type	A	0	71.8	48.4	73.2	U+M	3		89	8						
SK-N-BE-2-C	N-type	A	0	57.3	11.3	30.2	U+M	4		5	88		3				
SH-SY5Y	N-type	NA	0	10.8	3.7	6.6	U	84	1	13	1			1			
SK-N-JD	I-type	A	0	72.3	40.5	83.5	U+M	89		10							1
SK-N-LP	I-type	A	0	67.8	95.8	81	U+M	99		1							
SK-N-AS	S-type	NA	0	19.8	3.87	4.5	U	95		3		1		1			
LA1-5s	S-type	A	0	59.8	9.1	35.4	U+M	15	1	77	4	1		1		1	

A: amplified; NA: not amplified

Green: Centromere chromosome 3; Red: *CaSR* locus.

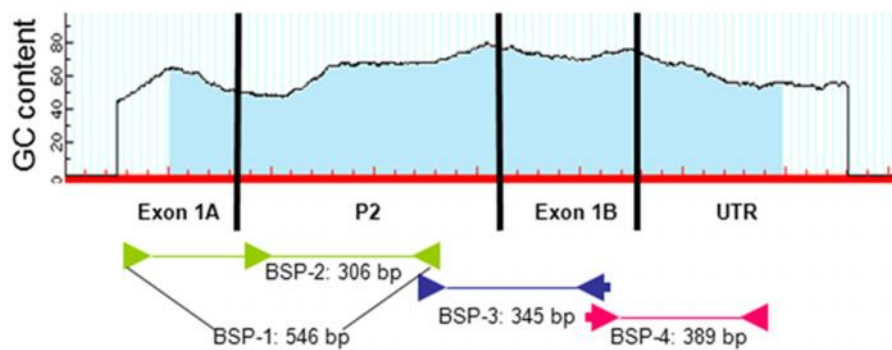
Cell line	BSP-1 (% mC)	BSP-3 (% mC)	BSP-4 (% mC)	MSP
LA1-55n	75.3	48.4	73.2	U+M
LA1-55n Aza	40.5	54.83	34.8	U+M
LA1-55n TSA	74.58	65.89	63.5	U+M
LA1-55n Aza+TSA	34.2	21.9	39.8	U+M

Aza: 5-aza-2'-deoxycytidine

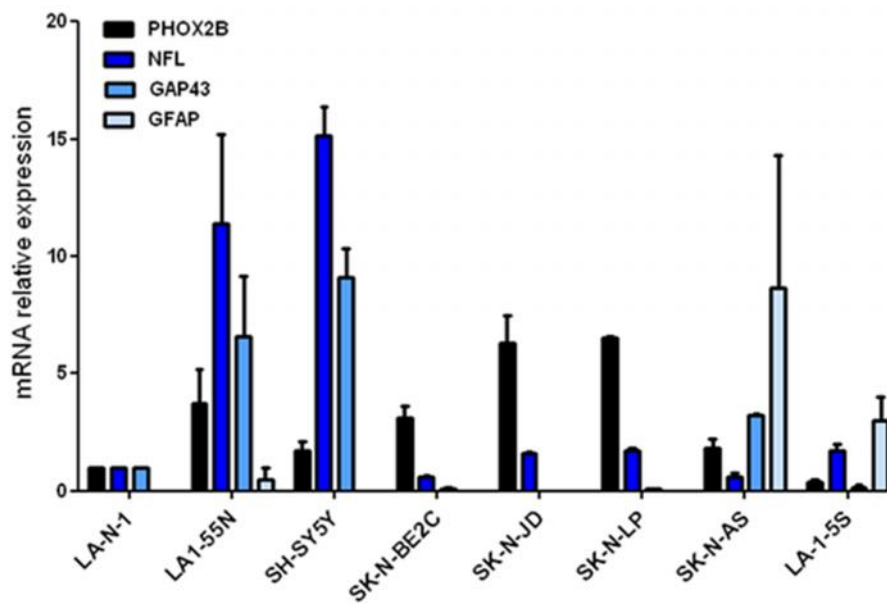
TSA: Trichostatin A

Normal tissues	BSP-1 (% mC)	BSP-3 (% mC)	BSP-4 (% mC)	MSP
Kidney	5.38	0.46	2.5	U
Brain	2.57	1.38	3	U

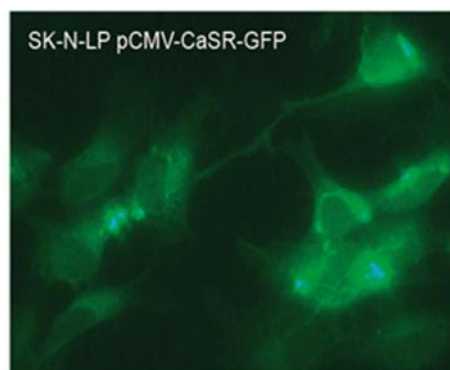
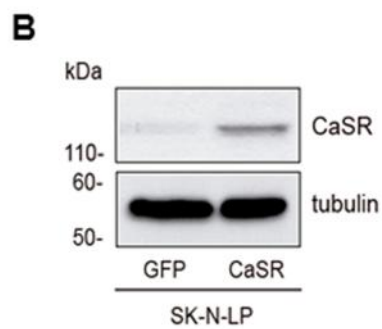
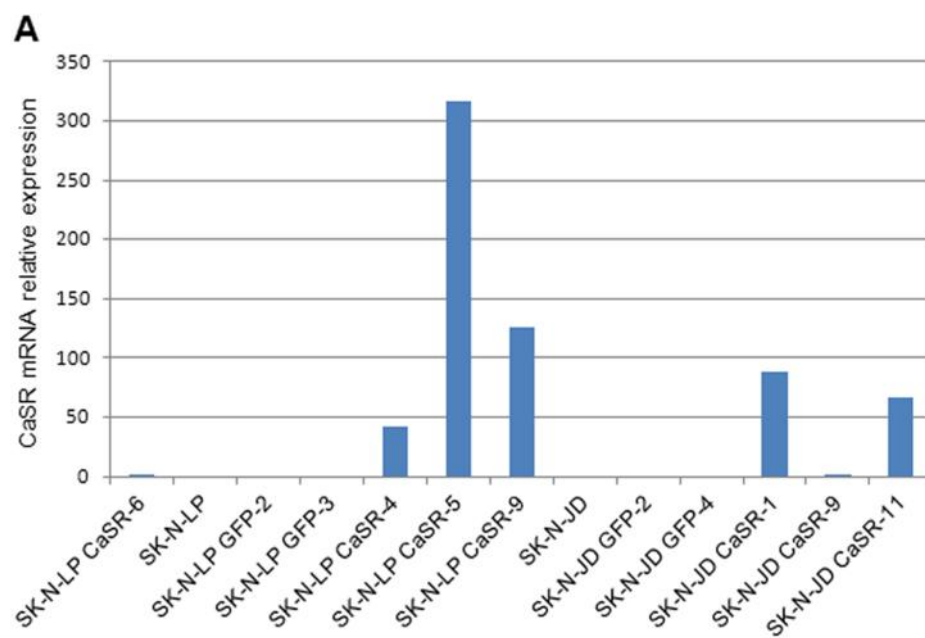
Supplementary Figure 1.



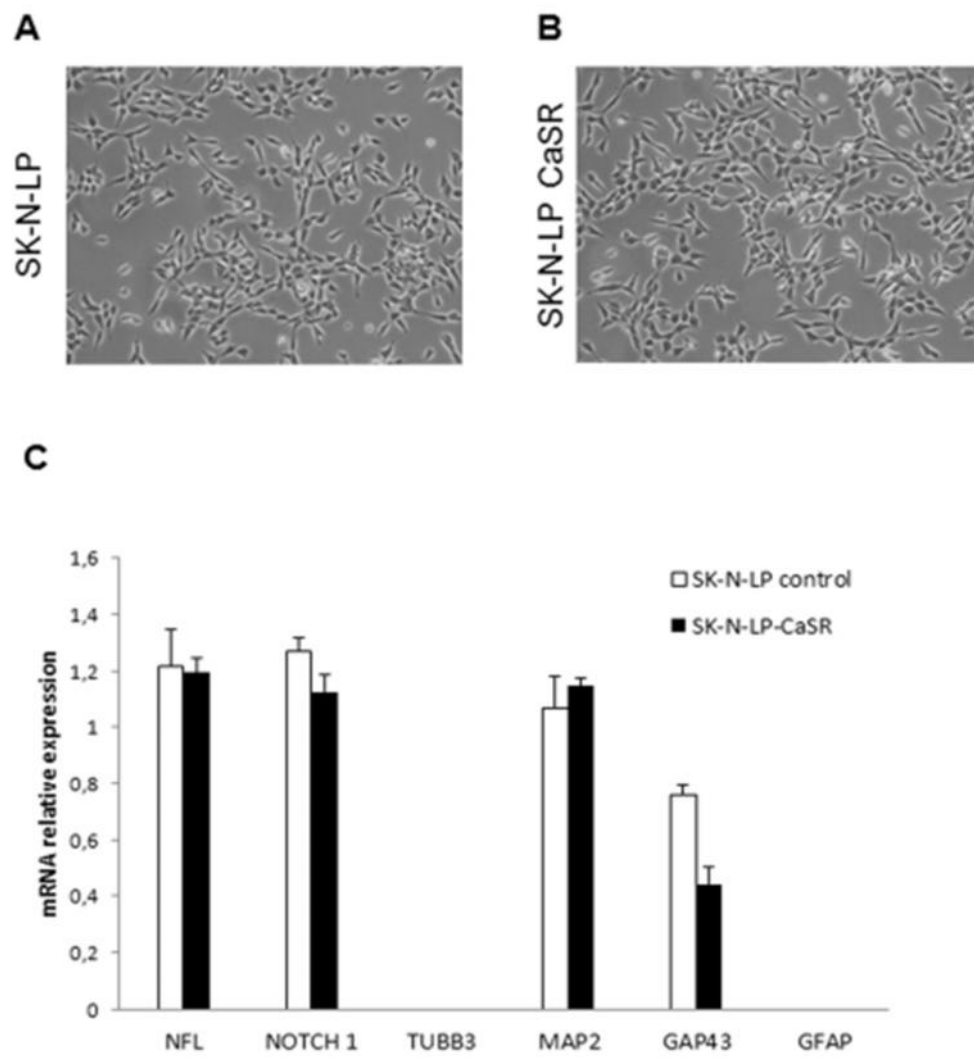
Supplementary Figure 2.



Supplementary Figure 3.



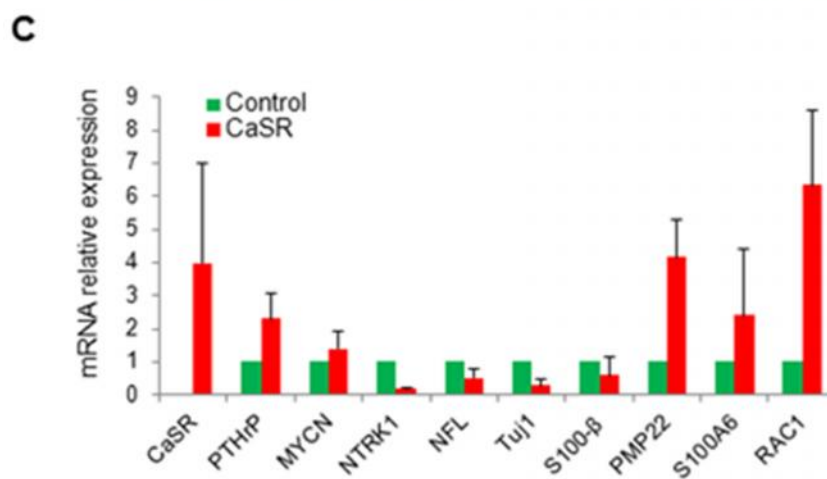
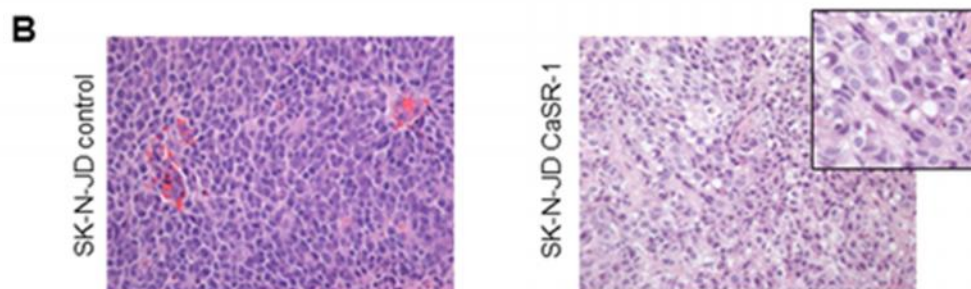
Supplementary Figure 4.



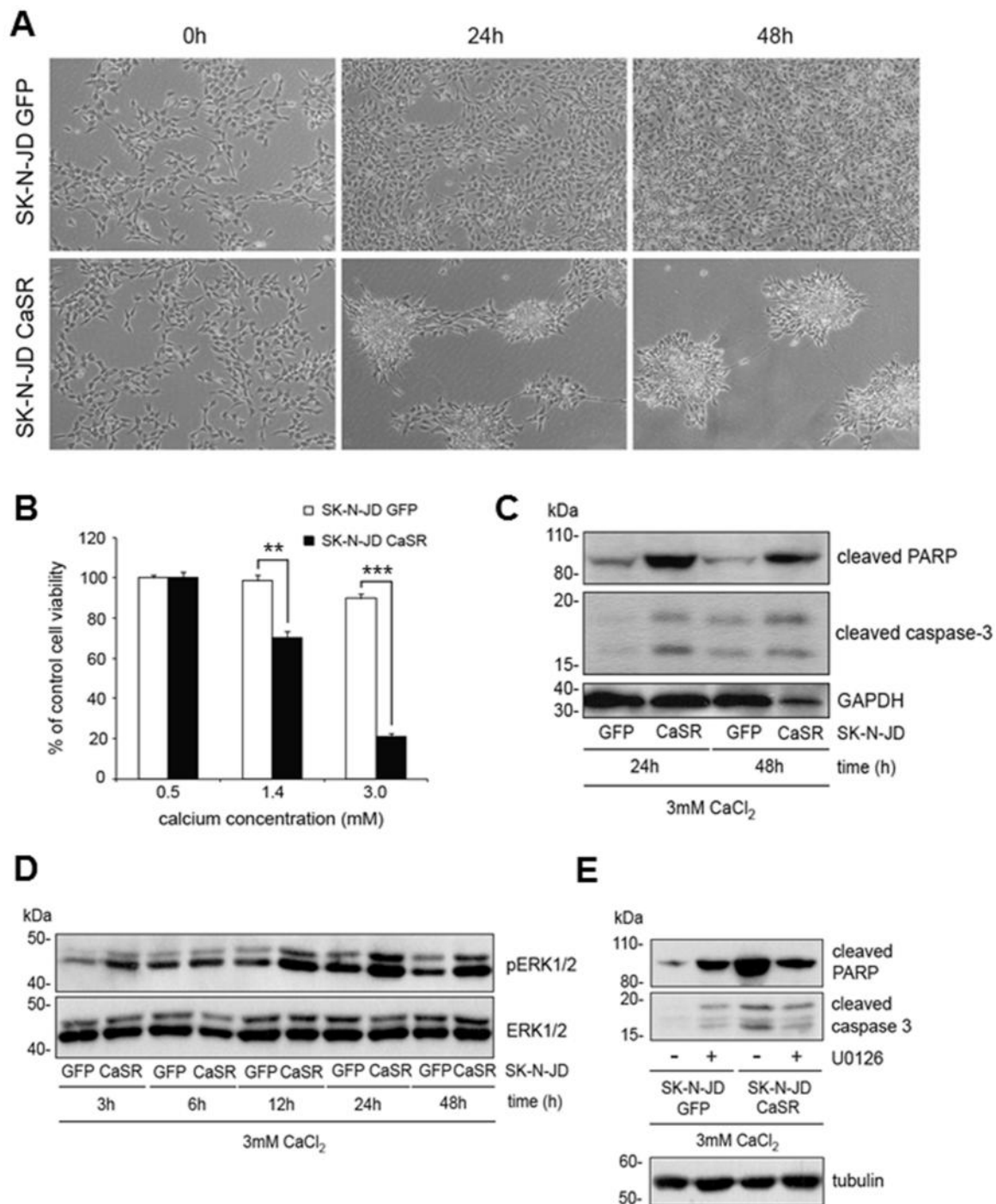
Supplementary Figure 5.

A

Specimen	Necrosis (%)	Synaptophysin	CaSR	Ki67 (%)	Caspase-3 (%)	c-PARP (%)
SK-N-LP 1	50	+	-	85	25	0
SK-N-LP 2	30	+	-	85	22	10
SK-N-LP 3	10	+	-	85	32	0
SK-N-LP 4	20	+	-	80	25	1
SK-N-LP GFP 1	20	+	-	80	20	0
SK-N-LP GFP 2	25	+	-	85	10	0
SK-N-LP GFP 3	20	+	-	80	25	0
SK-N-LP GFP 4	20	+	-	80	34	50
SK-N-JD 1	15	+	-	85	12	0
SK-N-JD 2	15	+	-	85	6	0
SK-N-JD GFP 1	20	+	-	85	20	0
SK-N-JD GFP 2	10	+	-	80	50	25
SK-N-JD GFP 3	10	+	-	80	40	0
SK-N-JD GFP 4	10	+	-	80	85	15
SK-N-LP CaSR 1	50	+	+	80	4	20
SK-N-LP CaSR 2	30	+	+	80	4	0
SK-N-JD CaSR 1	20	+	+	80	14	1



Supplementary Figure 6.



2. Asociación de polimorfismos en el gen del receptor sensor de calcio con la evolución clínica de los neuroblastomas.

Laia Masvidal*, Raquel Iniesta*, **Carla Casalà**, Patricia Galván, Eva Rodríguez, Cinzia Lavarino, Jaume Mora y Carmen de Torres.

*Autores que han contribuido por igual en el estudio.

Publicado en la revista PLoS ONE 2013; 8(3): e59762

FI: 4,092, Q1

El receptor sensor de calcio (CaR) es un receptor acoplado a proteínas G que juega un papel muy relevante en la homeostasis del calcio. Hemos publicado anteriormente que CaR se encuentra expresado en tumores neuroblásticos diferenciados y de buen pronóstico (de Torres et al, 2009) mientras que se halla silenciado mediante pérdidas alélicas (monosomía del cromosoma 3) y mecanismos epigenéticos en neuroblastomas (NB) desfavorables (Casalà et al, 2013).

Con el fin de evaluar otros mecanismos genéticos potencialmente responsables de la inactivación de CaR en NB agresivos, se han analizado a continuación tres polimorfismos funcionalmente relevantes (rs1801725, rs1042636 y rs1801726) localizados en la cola carboxilo-terminal del receptor, que es la responsable de la transducción de señal. Basándonos en nuestros datos previos, la hipótesis planteada fue que las variantes genéticas que determinan una disminución de la función de CaR se asociarían con evoluciones clínicas más agresivas.

Se observó que la variante rs1801725, que codifica para una forma discretamente menos activa del receptor, se asociaba con estadio 4 ($P = 0.002$) y con NB de histología indiferenciada ($P = 0.046$). La supervivencia global ($P = 0.022$) y libre de eventos ($P = 0.01$) fue peor en los individuos portadores en homo- o heterocigosis del alelo minoritario con respecto a los individuos homocigotos para el alelo mayoritario. Sin embargo, este polimorfismo aislado no resultó ser un factor de pronóstico independiente en un análisis multivariante.

Por el contrario, cuando se consideraron los tres polimorfismos como un bloque, el haplotipo TAC (que contiene la variante genética rs1801725, pero no el polimorfismo rs1042636 que genera ganancia de función) resultó ser un factor pronóstico independiente tanto en tumores neuroblásticos (HR= 2.45; 95% CI [1.14 -5.29], $P = 0.022$) como en los pacientes diagnosticados de NB (HR = 2.74; 95% CI [1.20-6.25], $P = 0.016$).

La asociación de este haplotipo con enfermedad metastásica y peor supervivencia global incrementaría el conjunto de datos que van siendo generados por nuestro grupo y que indicarían que la inactivación del gen *CaR* es un mecanismo asociado al fenotipo agresivo en neuroblastoma

Polymorphisms in the *Calcium-Sensing Receptor* Gene Are Associated with Clinical Outcome of Neuroblastoma

Laia Masvidal^{1,9}, Raquel Iniesta^{2,9}, Carla Casalà¹, Patricia Galván¹, Eva Rodríguez¹, Cinzia Lavarino¹, Jaume Mora¹, Carmen de Torres^{1*}

1 Developmental Tumor Biology Laboratory, Hospital Sant Joan de Déu and Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, **2** Unitat de Recerca i Desenvolupament, Parc Sanitari Sant Joan de Déu, Fundació Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain

Abstract

Background: Neuroblastic tumors include the neuroblastomas, ganglioneuroblastomas, and ganglioneuromas. Clinical behavior of these developmental malignancies varies from regression to aggressive growth with metastatic dissemination. Several clinical, histological, genetic, and biological features are associated with this diversity of clinical presentations. The calcium-sensing receptor (CaSR) is a G-protein coupled receptor with a key role in calcium homeostasis. We have previously reported that it is expressed in benign, differentiated neuroblastic tumors, but silenced by genetic and epigenetic events in unfavorable neuroblastomas. We have now analyzed three functionally relevant polymorphisms clustered at the signal transduction region of the CaSR (rs1801725, rs1042636 and rs1801726) to assess if genetic variants producing a less active receptor are associated with more aggressive disease course.

Methods: Polymorphisms were analyzed in DNA samples from 65 patients using specific Taqman Genotyping Assays.

Results: Mildly inactivating variant rs1801725 was associated with clinical stage 4 ($P=0.002$) and the histological subgroup of undifferentiated neuroblastomas ($P=0.046$). Patients harboring this polymorphism had significantly lower overall ($P=0.022$) and event-free survival ($P=0.01$) rates than those who were homozygous for the most common allele among Caucasians. However, this single locus genotype was not independently associated with outcome in multivariate analyses. Conversely, the tri-locus haplotype TAC was independently associated with an increased risk of death in the entire cohort (Hazard Ratio = 2.45; 95% Confidence Interval [1.14–5.29]; $P=0.022$) and also in patients diagnosed with neuroblastomas (Hazard Ratio = 2.74; 95% Confidence Interval [1.20–6.25]; $P=0.016$).

Conclusions: The TAC haplotype includes the moderately inactivating variant rs1801725 and absence of the gain-of-function rs1042636 polymorphism. Thus, its association with metastatic disease and poor outcome would add to our previous data and further support that inactivation of the *CaSR* gene is a mechanism associated with neuroblastoma malignant behavior.

Citation: Masvidal L, Iniesta R, Casalà C, Galván P, Rodríguez E, et al. (2013) Polymorphisms in the *Calcium-Sensing Receptor* Gene Are Associated with Clinical Outcome of Neuroblastoma. PLoS ONE 8(3): e59762. doi:10.1371/journal.pone.0059762

Editor: Xiao-Ping Miao, MOE Key Laboratory of Environment and Health, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, China

Received: December 12, 2012; **Accepted:** February 18, 2013; **Published:** March 22, 2013

Copyright: © 2013 Masvidal et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Fundació Privada Cellex has supported the work. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: cdetorres@hsjdbcn.org

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Neuroblastic tumors are developmental malignancies that arise from peripheral nervous system precursor cells and include the neuroblastomas, ganglioneuroblastomas and ganglioneuromas. Some of these tumors undergo spontaneous regression, others develop as a localized mass and a third group proliferate aggressively and invade organs distant from primary site [1]. A number of clinical, histological, genetic and biological factors are associated with this variety of clinical presentations, including age at diagnosis, clinical stage, histological classification, amplification of the oncogene *MYCN*, alterations of ploidy and abnormalities at the chromosomal region 11q [2–4].

The calcium ion (Ca^{2+}) plays a key role in a variety of physiological functions including muscle contraction, coagulation and synaptic transmission. In cancer, this divalent cation participates in the control of the balance between cell proliferation and death [5]. One of the mechanisms that contributes to regulate the function of Ca^{2+} in normal and neoplastic cells is the control of its intracellular and plasmatic levels. This is achieved via a complex multiorganic system that involves numerous molecules. Among them, the calcium-sensing receptor (CaSR) is a G-protein coupled receptor (GPCR) that senses minimal plasmatic fluctuations of Ca^{2+} and regulates the secretion of parathyroid hormone and calcitonin accordingly [6]. The CaSR is also expressed in other organs involved in calcium homeostasis, in several non-neoplastic tissues and in a number of malignancies [7,8]. The role of this

GPCR seems to be cell-type dependent, but the mechanisms responsible for this diversity of functions are only partially understood.

The CaSR is composed of three main regions: A large extracellular domain, where the interaction with the Ca^{2+} occurs, a seven transmembrane domain that is a common feature of all GPCRs, and a carboxyl-terminal intracellular tail, necessary for Ca^{2+} -mediated activation of G proteins, cell surface expression and phospholipase C activation, among other functions [9–11].

Naturally-occurring inactivating mutations of the *CaSR* gene are the cause of familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism, while activating mutations produce autosomal dominant hypercalcemia [12–16]. Also, more than 450 single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described in the *CaSR* gene. They are divided into three haplotype blocks, coincident with 5' regulatory, coding and 3' regulatory domains [17,18]. Three nonsynonymous variants at the intracellular tail encoded by exon 7 have been identified. The A986S change encoded by the most common SNP of the *CaSR* gene in Caucasians, c.2956 G>T (rs1801725), is considered to produce a moderately less active receptor [18,19]. The glycine substitution at arginine-990 encoded by c.2968 A>G (rs1042636) might induce gain of function [20]. Finally, c.3031 C>G, or Q1011E (rs1801726), is a common polymorphism in populations with African ancestry whose functional significance remains to be established [16,18]. Besides their respective function, specific haplotypes in this cluster of polymorphisms have been found in association with blood ionized calcium levels, primary hyperparathyroidism and nephrolithiasis [21–23].

Several studies have analyzed the association of these genetic variants of the CaSR with risk of colorectal or prostate cancer [24–30]. However, to the best of our knowledge, a specific haplotype at these three loci has never been reported as a potential predictor of outcome in any malignancy.

Our group reported for the first time the expression of the CaSR in a developmental malignancy. We found that it is expressed in differentiated, favorable neuroblastic tumors, and up-regulated upon differentiation induction [31]. Recently, we have also shown that the *CaSR* gene is silenced by genetic and epigenetic mechanisms in unfavorable neuroblastomas [32]. To gain further insight into the genetic mechanisms responsible for its inactivation in malignant neuroblastomas, we have now analyzed the three clustered genetic variants at coding exon 7 that have been described to influence CaSR activity. Based on our prior data, we hypothesized that allelic variants encoding a less active receptor might be associated with poor clinical outcome.

Materials and Methods

Ethics Statement

Written informed consent was obtained from patients, parents or legal guardians. The protocol was in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee for Clinical Research (Comité Ético de Investigación Clínica, Fundació Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Barcelona).

Patients and Samples

Peripheral blood and bone marrow samples ($n=65$) were collected from all patients newly diagnosed with neuroblastic tumors at Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain, with a follow-up time ≥ 12 months. Bone marrow samples were only included in the study if they were free of neuroblastoma cells, as assessed by *PHOX2B* mRNA expression analysis (see below). Age at diagnosis, clinical stage (International Neuroblastoma Staging

System), *MYCN* amplification status, International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC), ethnicity and time to follow-up were recorded.

Patients were uniformly treated according to the following criteria: Stage 4s cases received no cytotoxic therapy unless life-threatening condition occurred during observation; *MYCN* non-amplified stages 1, 2 and 3 tumors were managed exclusively with surgery unless clinically relevant progression occurred; and stage 4 and *MYCN*-amplified cases received induction chemotherapy, second-look surgery, radiotherapy, myeloablative therapy followed by autologous bone marrow transplant, anti-GD2 immunotherapy and retinoic acid.

PHOX2B mRNA Expression Analysis

Bone marrow mononuclear cell isolation, total RNA extraction and cDNA synthesis were carried out as described [33]. Analysis of *PHOX2B* mRNA expression was performed following previously reported procedures [34] in a 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Only samples with a Ct for reference gene < 30 were considered of good quality and then evaluated. Samples with any amplification of the neuroblastoma-specific *PHOX2B* marker were scored as positive and thus matching DNA was excluded from genotyping analysis.

Genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral blood ($n=41$) or bone marrow ($n=24$) mononuclear cells using Qiagen reagents (Qiagen, Valencia, CA). Polymorphisms were analyzed in a 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems) using specific SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems references 7504853 for rs1801725, 7504854 for rs1042636 and 7504855 for rs1801726), following manufacturer's instructions. Genotyping (L.M.), clinical data recording (C.C.) and statistical analyses (R.I.) were performed by three independent researchers. For quality control, random cases (15%) were processed twice in separate runs. Results were 100% concordant.

Statistical Analyses

The χ^2 and Fisher's exact tests were used to assess the association of specific genotypes with clinical and biological subgroups. Elapsed time from time of diagnosis to an event (relapse, progression or death) or the end of follow-up was used to compute event-free survival (EFS) and overall survival (OS) probabilities, according to the method of Kaplan and Meier [35]. The log-rank statistic was used to compare the EFS and OS probabilities between groups [36]. The prognostic significance of variables was assessed by Cox proportional models [37]. SNPstats web tool was used to analyze individual SNPs [38]. Homozygous cases for the most frequent allele were taken as the reference level, and heterozygous and homozygous cases for the minor allele were grouped. THESIAS (Testing Haplotype EffectS In Association Studies) program and BayHap R package were used to compare OS and EFS probabilities among different haplotype blocks [39–41]. Haplotype frequencies were estimated in the total cohort, and separately in the subgroups of alive and dead patients, event and event-free subgroups. Departure from Hardy-Weinberg equilibrium was assessed by means of the Fisher's exact. Linkage disequilibrium (LD) between polymorphisms was measured through D' and r^2 . In Cox regression analysis, the most common haplotype in the sample was taken as the reference level. All models were adjusted for age at diagnosis, clinical stage and *MYCN* amplification status. Additivity of haplotype effects was considered in all models after performing Likelihood Ratio tests. Analyses were performed with R 2.14.1, SNPstats or THESIAS programs.

$P < 0.05$ was considered significant. Estimates of EFS and OS and hazard ratio (HR) are presented with 95% confidence intervals (CI).

This study was conceived to address a single hypothesis, i.e. that functionally relevant polymorphisms of the *CaSR* gene influence neuroblastoma phenotype and thus survival probabilities of patients. This single hypothesis was tested and proved by means of a single model. Therefore, results were interpreted without adjusting for multiple tests [42]. However, the potential clinical relevance of exploring the entire cohort of patients diagnosed with neuroblastic tumors and those neuroblastomas without amplification of the oncogene *MYCN*, prompted us to describe survival probabilities in these patients as well.

Results

CaSR Gene Exon 7 Polymorphisms in Neuroblastic Tumors

All available patients diagnosed with neuroblastic tumors with a follow-up time longer than 12 months were included in the study ($n = 65$). Their clinical and biological features are summarized in Table S1 and detailed in Table S2. Median follow-up was 4.4 years (range 12.2 to 124.3 months). All patients but one ($\#61$) were of Caucasian origin. To ascertain if this cohort was similar to others, OS and EFS probabilities were calculated according to well-established clinical and biological parameters in neuroblastoma (Table S1). As expected, clinical stage 4, *MYCN* amplification and unfavorable histology were associated with poor outcome. Age at diagnosis ≥ 18 months was correlated with worse OS ($P = 0.013$) and EFS ($P = 0.001$) rates among neuroblastoma patients but not in the entire cohort, due to the presence of ganglioneuroblastomas and ganglioneuromas (Table S1 and Table S2).

Statistical associations of single locus genotypes were then examined. Polymorphism rs1801725, present either in homo- or heterozygosis, was detected in 22/65 (33.8%) of patients. Genetic variant rs1042636 was found in 8/65 patients (12.3%) and rs1801726 was only detected in four patients (6.1%) (Table S2). The genotype frequencies for all three polymorphisms were in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium (Table S3). Associations of single SNPs with clinical and biological features of neuroblastic tumors are shown in Table 1. The low frequency of two variants, rs1042636 and rs1801726, precluded the analysis of statistical correlations with specific subgroups or survival probabilities. Conversely, upon univariate analysis, rs1801725 was found to be associated with clinical stage 4 ($P = 0.002$) and the histological subgroup of undifferentiated neuroblastomas ($P = 0.046$). Patients harboring this variant had significantly lower OS ($P = 0.022$) and EFS ($P = 0.01$) rates than those who were homozygous for the most common allele among Caucasians. However, this single locus genotype was not independently associated with outcome in multivariate analyses (Table 2).

Associations of tri-locus haplotypes were then evaluated. Four haplotypes were found in the entire cohort (Table 3). The most probable haplotype (GAC) had an estimated frequency of 72% and was composed of the most frequent alleles among Caucasian populations, as expected. The estimated frequency of the TAC haplotype was nearly 20% and lower for two other combinations (GGC and GAG). Strong LD ($D' > 0.95$) existed between all SNP pairs with the only exception of rs1801725 and rs1801726 (Table S4). This result might be influenced by the low frequency of rs1801726 minor allele in populations of Caucasian origin.

In univariate analysis, the TAC haplotype was correlated with clinical stage 4 ($P = 0.008$) and inferior OS rates ($P = 0.006$) (Figure 1A). Moreover, in multivariate analyses, the TAC

combination was independently associated with an increased risk of death in the entire cohort after adjusting for age at diagnosis, clinical stage and *MYCN* amplification status (Table 3). This association was also significant when the analysis was restricted to patients with a follow-up time longer than three years (HR = 2.19; 95% CI [1.01–4.76]; $P = 0.046$). An increased risk of events ($P = 0.008$) that almost reached significance in multivariate analyses ($P = 0.052$) was also observed among patients with the TAC haplotype (Table 3). Associations of this combination when present in homozygosis were not analyzed separately due to their very low frequency.

CaSR Gene Exon 7 Polymorphisms in Neuroblastoma

The subgroup of neuroblastoma patients ($n = 54$) was then analyzed separately according to single locus genotypes and tri-locus haplotypes. Associations of single SNPs with clinical and biological features of neuroblastomas are shown in Table S5. Again, rs1801725 variant, present either in homo- or heterozygosis, was associated with clinical stage 4 ($P = 0.02$) and inferior OS rates ($P = 0.023$). However, this polymorphism was not an independent predictor of outcome in multivariate analyses, after adjusting for age at diagnosis, clinical stage and *MYCN* status. The other two SNPs were not statistically associated with any of the prognostic factors examined or clinical outcome (Table S5).

When tri-locus combinations were assessed, estimated frequencies of haplotypes were similar to the ones found in the entire cohort (Table 4). Strong LD ($D' > 0.95$) was found between all SNP pairs with the only exception of rs1801725 and rs1801726 (Table S4). In this sample set, the TAC haplotype was also correlated with clinical stage 4 ($P = 0.012$) and inferior OS rates ($P = 0.03$) (Table S5 and Figure 1B). Moreover, it was independently associated with an increased risk of death (Table 4), and this correlation was still observed among neuroblastoma patients with a follow-up time longer than three years (HR = 2.38; 95% CI [1.04–5.45]; $P = 0.039$). An increased risk of events was also seen among neuroblastoma patients with the TAC haplotype ($P = 0.035$), although this association was not statistically significant in multivariate analyses (Table 4).

Among the subgroup of neuroblastomas without amplification of the *MYCN* oncogene ($n = 40$), the TAC combination was correlated with inferior EFS rates ($P = 0.037$). The association with lower OS rates did not reach statistical significance ($P = 0.066$). In multivariate analyses, the TAC haplotype was not an independent predictor of outcome in this subgroup of neuroblastomas, after adjusting for age at diagnosis, clinical stage and *MYCN* amplification status.

Discussion

Over the last decades, somatic alterations associated with different neuroblastoma phenotypes have been extensively analyzed. More recently, several genome-wide association studies have identified susceptibility loci and alleles associated with low- or high-risk disease. They include variations at *FLJ22536* (6p22), *BARD1* (2q35), *LMO1* (11p15), *HSD17B12* (11p11.2), *DUSP12* (1q23.3), *LINC00340* (6p22), *HACE1* and *LIN28B* (6q16) [43–49]. These accumulating data would support the hypothesis that a combination of variants might contribute to the malignant transformation of embryonal precursor cells from which neuroblastic tumors originate, and influence their phenotype. Thus, benign and malignant forms of neuroblastic tumors might arise as a result of different initiating genetic events [44,49]. Our present results would add to this growing body of evidence and further

Table 1. Association of *CaSR* gene polymorphisms and haplotypes with clinical and biological features of neuroblastic tumors.

	Age*		INSS		MYCN status		INPC	
	<18	≥18	1,2,3,4s	4	NA	A	Favorable	Unfavorable
rs1801725								
G/G	16	27	29	14	34	9	25	18
G/T+T/T	8	14	6	16	17	5	8	14
<i>P</i>	0.947		0.002		0.868		0.096	
rs1042636								
A/A	22	36	32	26	44	14	29	29
A/G+G/G	2	5	3	4	7	0	4	3
<i>P</i>	0.628		0.537		0.142		0.721	
rs1801726								
C/C	22	39	33	28	13	48	30	31
C/G	2	2	2	2	1	3	3	1
<i>P</i>	0.576		0.873		0.862		0.317	
Haplotypes								
G-A-C	33	60	58	35	21	72	31	62
T-A-C	10	15	6	19	6	19	12	13
G-G-C	3	5	4	4	0	8	0	8
G-A-G	2	2	2	2	1	3	1	3
<i>P</i>	0.923		0.008		0.499		0.090	

*Age at diagnosis: months. INSS: International Neuroblastoma Staging System. MYCN status: A - amplified; NA - not amplified. INPC: International Neuroblastoma Pathology Classification.

doi:10.1371/journal.pone.0059762.t001

support that genetic variations play a fundamental role in these developmental malignancies.

We have previously reported that the *CaSR* gene is expressed in differentiated, benign neuroblastic tumors but silenced by genetic and epigenetic events in undifferentiated, unfavorable neuroblastomas. Moreover, upon ectopic overexpression and reactivation of the *CaSR*, neuroblastoma cells undergo apoptosis [31–32]. Altogether, these data were consistent with the hypothesis that the *CaSR* exerts tumor-suppressor functions in the context of

neuroblastic tumors. To gain further insight into the genetic mechanisms responsible for its inactivation in aggressive neuroblastomas, we have now analyzed three functionally relevant genetic variants clustered at the carboxyl-terminal tail of the receptor. They have been analyzed in the context of other neoplasias mostly as susceptibility loci [24–30]. However, based on our previous results, we hypothesized that their ability to modify *CaSR* function might influence neuroblastoma phenotype and thus clinical outcome.

Table 2. Overall and event-free survival of patients diagnosed with neuroblastic tumors according to *CaSR* genotypes.

Genotype	OS					EFS				
	Cases (n = 65)	Deaths (n = 20)	Log-rank <i>P</i>	HR [†] (95% CI)	<i>P</i> [‡]	Events (n = 25)	Log-rank <i>P</i>	HR [†] (95% CI)	<i>P</i> [‡]	
rs1801725										
G/G	43	9	0.022	1.0	0.183	12	0.01	1.0	0.084	
G/T+T/T	22	11		2.217 (0.686–7.158)		13		2.218 (0.114–0.714)		
rs1042636										
A/A	58	18	0.808	1.0	0.812	23	0.67	1.0	0.831	
A/G+G/G	7	2		1.207 (0.255–5.705)		2		0.850 (0.191–3.790)		
rs1801726										
C/C	61	19	0.99	1.0	0.83	24	0.735	1.0	0.696	
C/G	4	1		0.797 (0.101–6.285)		1		0.669 (0.089–5.035)		

OS: Overall survival. EFS: Event-free survival.

HR[†]: Hazard ratio.

[‡]*P* of Hazard Ratio. CI: Confidence interval.

Multivariate Cox regression model with adjustment for age at diagnosis, clinical stage and MYCN amplification status.

doi:10.1371/journal.pone.0059762.t002

Table 3. Overall and event-free survival of patients diagnosed with neuroblastic tumors according to *CaSR* haplotypes.

Haplotype*	Total Sample** (n = 65)	OS			P^{\dagger}	EFS			P^{\dagger}
		Alive (n = 45)	Dead (n = 20)	HR [†] (95% CI)		Event-free (n = 40)	Event (n = 25)	HR (95% CI)	
G-A-C	72	77	60	1.00		76	64	1.00	
T-A-C	19	13	32	2.45 (1.14–5.29)	0.022	13	30	2.02 (0.99–4.12)	0.052
G-G-C	6	7	5	1.14 (0.22–5.80)	0.868	4	2	0.57 (0.06–5.01)	0.616
G-A-G	3	3	3	0.59 (0.07–5.19)	0.636	8	4	0.81 (0.18–3.71)	0.786

*rs1801725-rs1042636-rs1801726.

**Haplotype estimated frequencies (%). OS: Overall survival. EFS: Event-free survival.

†HR[†]Hazard ratio.‡P of Hazard Ratio. CI: Confidence interval. Multivariate Cox regression model with adjustment for age at diagnosis, clinical stage and *MYCN* amplification status.

doi:10.1371/journal.pone.0059762.t003

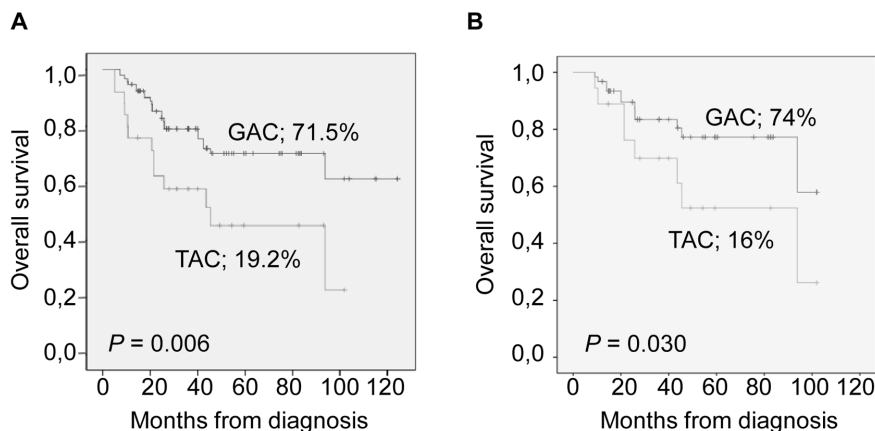
The cohort analyzed was almost uniformly composed of patients of Caucasian origin and therefore the most frequent variant was rs1801725. The frequency of the two other polymorphisms was not significantly different from other Caucasian populations [50]. Minor allele rs1801725 is thought to moderately reduce CaSR activity [18,19]. In keeping with our previous data, this allegedly less active form of the CaSR was associated with the histological subgroup of undifferentiated neuroblastomas, metastatic disease and inferior OS rates. However, it was not an independent predictor of outcome in multivariate analyses.

Interestingly, when the three polymorphisms were analyzed as a block, the tri-locus haplotype TAC was correlated with clinical stage 4 and independently associated with an increased risk of death in the entire cohort of neuroblastic tumors and, more importantly, among patients diagnosed with neuroblastomas. Although the cohort examined is not large, patients have been diagnosed and treated at a single institution according to homogeneous criteria. Thus, their outcome is more likely to depend on clinical features and tumor biology than on management. Moreover, the association of this haplotype with poor outcome was also statistically significant among patients with a longer follow-up time. However, the frequency of two variants, rs1042636 and rs1801726, was quite low and limited the statistical power to detect associations. Thus, validation of our findings in

larger, independent cohorts is warranted. Furthermore, analysis of patients from different population backgrounds will be necessary to determine if this haplotype is associated with neuroblastoma phenotype and outcome in patients of other ethnic origins.

These three SNPs were first suggested to act as a cluster in 1996 [21]. Linkage disequilibrium between them has been repeatedly reported, a fact that might interfere in the evaluation of specific functional effects derived from each polymorphism [18]. Scillitani and colleagues described specific haplotypes at these three loci in association with blood ionized calcium levels and nephrolithiasis [22,23]. Functional *in vitro* analyses to understand the biological significance of the different haplotypes are lacking. However, it is tempting to speculate that the TAC combination might encode a moderately less active form of the CaSR due to the presence of rs1801725 and the absence of the gain of function produced by rs1042636. In the context of neuroblastic tumors, the association of this potentially less active CaSR with metastatic disease and poor outcome would add to our previous results indicating that this gene is silenced by genetic and epigenetic mechanisms in aggressive neuroblastomas.

Several independent predictors of outcome in neuroblastoma have been reported by other groups and ours [2–4,51–54]. However, high-quality tumor samples and laborious, expensive techniques are required to analyze most of these genetic and biological features. Conversely, the analysis of polymorphisms can

**Figure 1. Overall survival probabilities according to *CaSR* gene haplotypes.** Overall survival probabilities of patients diagnosed with (A) neuroblastic tumors or (B) neuroblastomas according to *CaSR* gene haplotype at loci rs1801725, rs1042636 and rs1801726.

doi:10.1371/journal.pone.0059762.g001

Table 4. Overall and event-free survival of patients diagnosed with neuroblastomas according to *CaSR* haplotypes.

Haplotype*	Total Sample** (n = 54)	OS			P^{\ddagger}	EFS			P^{\ddagger}
		Alive (n = 35)	Dead (n = 19)	HR [†] (95% CI)		Event-free (n = 30)	Event (n = 24)	HR [†] (95% CI)	
G-A-C	69	74	58	1.00		73	63	1.00	
T-A-C	22	16	34	2.74 (1.20–6.25)	0.016	15	31	1.95 (0.94–4.04)	0.072
G-G-C	6	7	5	1.29 (0.24–6.87)	0.763	8	4	0.82 (0.178–3.85)	0.809
G-A-G	3	3	3	0.74 (0.08–6.71)	0.790	3	2	0.64 (0.07–5.63)	0.689

*rs1801725-rs1042636-rs1801726.

**Haplotype estimated frequencies (%). OS: Overall survival. EFS: Event-free survival.

HR[†]Hazard ratio.[‡]P of Hazard Ratio. CI: Confidence interval. Multivariate Cox regression model with adjustment for age at diagnosis, clinical stage and *MYCN* amplification status.

doi:10.1371/journal.pone.0059762.t004

be carried out in DNA isolated from any patient's sample, an advantage when a biopsy is not feasible, or the quality or quantity of the available primary tumor is sub-optimal. Moreover, it is simple to perform and to interpret, highly reproducible and cost-effective.

In summary, our present data indicate that a tri-locus haplotype at the signal transduction region of the *CaSR* might be an independent predictor of outcome in patients diagnosed with neuroblastic tumors. Moreover, we provide new evidence supporting that inactivation of the *CaSR* gene is a mechanism associated with neuroblastoma malignant behavior.

Supporting Information

Table S1 Overall and event-free survival of patients diagnosed with neuroblastic tumors according to clinical and biological features. Univariate and multivariate analyses were conducted to analyze overall and event-free survival probabilities in the entire cohort of patients diagnosed with neuroblastic tumors (n = 65) according to well-established prognostic factors in these malignancies. (DOCX)

Table S2 Clinical, histological and biological features of patients diagnosed with neuroblastic tumors and their genotype at three polymorphisms of the *CaSR* gene. The following data are provided for each patient in the cohort: clinical data at diagnosis (age in months and clinical stage according to the International Neuroblastoma Staging System), follow-up data required to calculate event-free and overall survival probabilities, histological subgroup, *MYCN* amplification status and genotype at three *CaSR* gene polymorphisms (rs1801725, rs1042636 and rs1801726). (XLSX)

Table S3 Analysis of departure from Hardy-Weinberg equilibrium. Fisher's exact test was carried out in the entire cohort of

patients diagnosed with neuroblastic tumors (n = 65) and in those with neuroblastomas (n = 54) to assess if genotype frequencies at polymorphisms rs1801725, rs1042636 and rs1801726 of the *CaSR* gene were in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium. (DOCX)

Table S4 Linkage disequilibrium between loci rs1801725, rs1042636 and rs1801726 in patients diagnosed with (A) neuroblastic tumors and (B) neuroblastomas. Linkage disequilibrium between polymorphisms pairs was measured through D' and r^2 . These calculations were conducted in the entire cohort of neuroblastic tumors (A) and in patients diagnosed with neuroblastomas (B). (XLSX)

Table S5 Association of *CaSR* gene polymorphisms and haplotypes with clinical and biological features of neuroblastomas. Statistical analyses were conducted in neuroblastoma patients (n = 54) to evaluate associations between single locus genotypes or tri-locus haplotypes at three *CaSR* gene polymorphisms (rs1801725, rs1042636 and rs1801726) and independent prognostic factors in these malignancies (age at diagnosis, clinical stage, *MYCN* amplification status and histological subgroup according to Shimada classification). (DOCX)

Acknowledgments

The authors wish to thank Fundació Privada Cellex, several institutions (Pablo Ugarte Association, Caja Navarra, Caixa Tarragona, Proclinic), our patients and their families for invaluable, sustained support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LM RI CdT. Performed the experiments: LM CC PG ER. Analyzed the data: RI CdT. Contributed reagents/materials/analysis tools: RI. Wrote the paper: RI CL JM CdT.

References

1. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007) Neuroblastoma. *Lancet* 369: 2106–2120.
2. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM (1984) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224: 1121–1124.
3. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, et al. (1999) The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 86: 364–372.
4. Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, et al. (2009) The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 27: 289–297.
5. Roderick HL, Cook SJ (2008) Ca²⁺ signaling checkpoints in cancer: remodeling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer* 8: 361–375.
6. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, et al. (1993) Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366: 575–580.
7. Brown EM, MacLeod RJ (2001) Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 81: 239–297.
8. Saidak Z, Mentaverry R, Brown EM (2009) The role of the calcium-sensing receptor in the development and progression of cancer. *Endocr Rev* 30: 178–195.

9. Huang Y, Zhou Y, Yang W, Butters R, Lee HW, et al. (2007) Identification and dissection of Ca(2+)-binding sites in the extracellular domain of Ca(2+)-sensing receptor. *J Biol Chem* 282: 19000–19010.
10. Gama L, Breitwieser GE (1998) A carboxyl-terminal domain controls the cooperativity for extracellular Ca2+ activation of the human calcium sensing receptor. A study with receptor-green fluorescent protein fusions. *J Biol Chem* 273: 29712–29718.
11. Chang W, Pratt S, Chen TH, Bourguignon L, Shoback D (2001) Amino acids in the cytoplasmic C terminus of the parathyroid Ca2+-sensing receptor mediate efficient cell-surface expression and phospholipase C activation. *J Biol Chem* 276: 44129–44136.
12. Pollak MR, Brown EM, Chou YH, Hebert SC, Marx SJ, et al. (1993) Mutations in the human Ca(2+)-sensing receptor gene cause familial hypocalcemic hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell* 75: 1297–1303.
13. Pollak MR, Brown EM, Estep HL, McLaine PN, Kifor O, et al. (1994) Autosomal dominant hypocalcemia caused by a Ca(2+)-sensing receptor gene mutation. *Nat Genet* 8: 303–307.
14. Pearce SH, Williamson C, Kifor O, Bai M, Coulthard MG, et al. (1996) A familial syndrome of hypocalcemia with hypercalciuria due to mutations in the calcium-sensing receptor. *N Engl J Med* 335: 1115–1122.
15. Hendy GN, D'Souza-Li L, Yang B, Canaff L, Cole DE (2000) Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalcemic hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum Mutat* 16: 281–296.
16. Hu J, Spiegel AM (2007) Structure and function of the human calcium-sensing receptor: insights from natural and engineered mutations and allosteric modulators. *J Cell Mol Med* 11: 908–922.
17. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, et al. (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296: 2225–2229.
18. Yun FH, Wong BY, Chase M, Shuen AY, Canaff L, et al. (2007) Genetic variation at the calcium-sensing receptor (CASR) locus: implications for clinical molecular diagnostics. *Clin Biochem* 40: 551–561.
19. Cole DE, Peltekova VD, Rubin LA, Hawker GA, Vieth R, et al. (1999) A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor and circulating calcium concentrations. *Lancet* 353: 112–115.
20. Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T, Biasion R, Coviello D, et al. (2007) R990G polymorphism of calcium-sensing receptor does produce a gain-of-function and predispose to primary hypercalciuria. *Kidney Int* 71: 1155–1162.
21. Heath H 3rd, Odelberg S, Jackson CE, Teh BT, Hayward N, et al. (1996) Clustered inactivating mutations and benign polymorphisms of the calcium receptor gene in familial benign hypocalcemic hypercalcemia suggest receptor functional domains. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1312–1317.
22. Scillitani A, Guarnieri V, De Geronimo S, Muscarella LA, Battista C, et al. (2004) Blood ionized calcium is associated with clustered polymorphisms in the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5634–5638.
23. Scillitani A, Guarnieri V, Battista C, De Geronimo S, Muscarella LA, et al. (2007) Primary hyperparathyroidism and the presence of kidney stones are associated with different haplotypes of the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 277–283.
24. Peters U, Chatterjee N, Yeager M, Chanock SJ, Schoen RE, et al. (2004) Association of genetic variants in the calcium-sensing receptor with risk of colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13: 2181–2186.
25. Bácsi K, Hítre E, Kósa JP, Horváth H, Lazáry A, et al. (2008) Effects of the lactase 13910 C/T and calcium-sensor receptor A986S G/T gene polymorphisms on the incidence and recurrence of colorectal cancer in Hungarian population. *BMC Cancer* 8: 17–24.
26. Dong LM, Ulrich CM, Hsu L, Duggan DJ, Benitez DS, et al. (2008) Genetic variation in calcium-sensing receptor and risk for colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 2755–2765.
27. Jenab M, McKay J, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhoven FJ, Ferrari P, et al. (2009) Vitamin D receptor and calcium sensing receptor polymorphisms and the risk of colorectal cancer in European populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18: 2485–2491.
28. Jacobs ET, Martínez ME, Campbell PT, Conti DV, Duggan D, et al. (2010) Genetic variation in the retinoid X receptor and calcium-sensing receptor and risk of colorectal cancer in the Colon Cancer Family Registry. *Carcinogenesis* 31: 1412–1416.
29. Híbler EA, Hu C, Jurutka PW, Martínez ME, Jacobs ET (2012) Polymorphic variation in the GC and CASR genes and associations with vitamin D metabolite concentration and metachronous colorectal neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21: 368–375.
30. Schwartz GG, John EM, Rowland G, Ingles SA (2010) Prostate cancer in African-American men and polymorphism in the calcium-sensing receptor. *Cancer Biol Ther* 9: 994–999.
31. de Torres C, Beleta H, Díaz R, Toran N, Rodríguez E, et al. (2009) The calcium-sensing receptor and parathyroid hormone-related protein are expressed in differentiated, favorable neuroblastic tumors. *Cancer* 115: 2792–2803.
32. Casalà C, Gil-Guinión E, Ordóñez JL, Miguel-Queralt S, Rodríguez E, et al. (2013) The calcium-sensing receptor gene is silenced by genetic and epigenetic mechanisms in unfavorable neuroblastomas and its reactivation induces ERK1/2-mediated apoptosis. *Carcinogenesis* 34(2): 268–76.
33. Mora J, de Torres C, Parareda A, Torner F, Galván P, et al. (2011) Treatment of Ewing sarcoma family of tumors with a modified P6 protocol in children and adolescents. *Pediatr Blood Cancer* 57: 69–75.
34. Stutterheim J, Gerritsen A, Zappeij-Kannegieter L, Kleijn I, Dee R, et al. (2008) PFOX2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 26: 5443–5449.
35. Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat. Assoc* 53: 457–481.
36. Mantel N (1996) Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 50: 163–170.
37. Cox DR (1972) Regression models and lifetables. *J R Stat Soc-B* 74: 187–220.
38. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22: 1928–1929.
39. Tregouet DA, Escolano S, Tired L, Mallet A, Golmard JL (2004) A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm. *Ann Hum Genet* 68: 165–177.
40. Iniesta R, Moreno V (2006) Assessment of genetic association using haplotypes inferred with uncertainty via Markov Chain Monte Carlo. In: Keller A, Heinrich S, Niederreiter H, editors. *Monte Carlo and Quasi Monte Carlo Methods*. Germany: Springer-Verlag. 529–535.
41. Tregouet DA, Tired L (2004) Cox proportional hazards survival regression in haplotype-based association analysis using the Stochastic-EM algorithm. *Eur J Hum Genet* 12: 971–974.
42. Bender R, Lange S (2001) Adjusting for multiple testing—when and how? *J Clin Epidemiol* 54: 343–349.
43. Maris JM, Mosse YP, Bradfield JP, Hou C, Monni S, et al. (2008) Chromosome 6p22 locus associated with clinically aggressive neuroblastoma. *N Engl J Med* 358: 2585–2593.
44. 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.
45. Wang K, Diskin SJ, Zhang H, Attiye EF, Winter C, et al. (2011) Integrative genomics identifies LMO1 as a neuroblastoma oncogene. *Nature* 469: 216–220.
46. Nguyen le B, Diskin SJ, Capasso M, Wang K, Diamond MA, et al. (2011) Phenotype restricted genome-wide association study using a gene-centric approach identifies three low-risk neuroblastoma susceptibility loci. *PLoS Genet* 7: e1002026.
47. Diskin SJ, Capasso M, Schnepf RW, Cole KA, Attiye EF, et al. (2012) Common variation at 6q16 within HACE1 and LIN28B influences susceptibility to neuroblastoma. *Nat Genet* 44: 1126–1130.
48. Bosse KR, Diskin SJ, Cole KA, Wood AC, Schnepf RW, et al. (2012) Common variation at BARD1 results in the expression of an oncogenic isoform that influences neuroblastoma susceptibility and oncogenicity. *Cancer Res* 72: 2068–2078.
49. Capasso M, Diskin S, Totaro F, Longo L, De Mariano M, et al. (2012) Replication of GWAS-identified neuroblastoma risk loci strengthens the role of BARD1 and affirms the cumulative effect of genetic variations on disease susceptibility. *Carcinogenesis*. In press.
50. Miedlich S, Lamesch P, Mueller A, Paschke R (2001) Frequency of the calcium-sensing receptor variant A986S in patients with primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 145: 421–427.
51. Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, et al. (1993) Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 328: 847–854.
52. Lagmay JP, London WB, Gross TG, Termuhlen A, Sullivan N, et al. (2009) Prognostic significance of interleukin-6 single nucleotide polymorphism genotypes in neuroblastoma: rs1800795 (promoter) and rs8192284 (receptor). *Clin Cancer Res* 15: 5234–5239.
53. Garcia I, Mayol G, Rios J, Domenech G, Cheung NK, et al. (2012) A three-gene expression signature model for risk stratification of patients with neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 18: 2012–2023.
54. Fletcher JI, Gherardi S, Murray J, Burkhart CA, Russell A, et al. (2012) N-Myc regulates expression of the detoxifying enzyme glutathione transferase GSTP1, a marker of poor outcome in neuroblastoma. *Cancer Res* 72: 845–853.

Table S1. Overall and event-free survival of patients diagnosed with neuroblastic tumors according to clinical and biological features.

Variables	OS				EFS				
	Cases (n=65)	Deaths (n=20)	Log-rank P	HRT† (95% CI)	P‡	Events (n=25)	Log-rank P	HR (95% CI)	P‡
Age*									
<18	24	4	0.073	1	0.895	4	0.009	1	0.294
18	41	16		1.079 (0.349-3.334)		21		0.554 (0.184-1.671)	
INSS									
1,2,3,4s	35	2	<0.001	1	<0.001	5	<0.001	1	<0.001
4	30	18		20.108 (4.341-93.138)		20		6.868 (2.365-19.944)	
MYCN status									
Not amplified	51	11	<0.001	1	0.006	15	0.001	1	0.037
Amplified	14	9		3.921 (1.487-10.338)		10		2.384 (1.056-5.385)	
INPC									
Favorable	33	0	--	--	--	0	--	--	--
Unfavorable	32	20		--		25		--	

Age at diagnosis (months). INSS: International Neuroblastoma Staging system. INPC: International Neuroblastoma Pathology Classification. OS: Overall survival. EFS: Event-free survival. HRT†: Hazard ratio. ‡: P of Hazard Ratio. CI: Confidence interval. Multivariate Cox regression model with adjustment for the indicated variables.

Table S2. Clinical, histological and biological features of patients diagnosed with neuroblastic tumors and their genotype at three polymorphisms of the *CaSR* gene.

Patient	Age at diagnosis (months)	Clinical stage (INSS)	MYCN status	Pathology	Event (1=event, 0=no event)	Patient status (1=Dead, 0=Alive)	Follow-up months	Follow-up event months	rs1801725	rs1042636	rs1801726
1	120	4	0	Undifferentiated NB	1	1	93,80	52,73	GT	AA	CC
2	24	4	0	Undifferentiated NB	1	1	9,07	9,07	GT	AA	CC
3	48	4	1	Undifferentiated NB	1	1	8,97	8,97	GT	AA	CG
4	24	4	1	Undifferentiated NB	1	1	7,23	6,97	GG	AA	CC
5	24	3	1	Undifferentiated NB	1	1	20,60	13,50	GT	AA	CC
6	2	4s	0	Undifferentiated NB	0	0	59,33	59,33	GT	AA	CC
7	24	3	1	Undifferentiated NB	1	0	51,20	17,27	GG	AA	CC
8	19	3	1	Undifferentiated NB	0	0	93,10	93,10	GT	AA	CC
9	21	4	1	Undifferentiated NB	0	0	36,00	36,00	GG	AA	CC
10	0	1	0	Undifferentiated NB	0	0	36,00	36,00	GG	AA	CC
11	4	4	0	Undifferentiated NB	1	1	45,43	11,60	GT	AA	CC
12	60	4	0	Undifferentiated NB	1	1	10,40	9,93	GT	AA	CC
13	24	4	1	Undifferentiated NB	1	1	17,60	10,70	GG	AA	CC
14	24	4	0	Undifferentiated NB	0	0	27,80	27,33	GG	AA	CC
15	48	4	0	Undifferentiated NB	1	0	27,93	7,73	GT	AA	CC
16	19	4	1	Undifferentiated NB	0	0	22,57	22,10	GG	AA	CC
17	12	4	1	Undifferentiated NB	1	1	5,03	5,03	TT	AA	CC
18	36	4	1	Undifferentiated NB	1	1	24,83	17,03	GG	AA	CC
19	23	4	0	Undifferentiated NB	0	0	14,70	14,23	GG	AG	CC
20	74	4	1	Undifferentiated NB	1	1	40,13	12,20	GG	AA	CC
21	6	4	1	Undifferentiated NB	1	1	20,73	20,73	GG	AA	CC
22	24	4	0	Undifferentiated NB	0	0	24,83	24,37	GG	AA	CC
23	3	4	1	Undifferentiated NB	1	1	10,53	10,53	GT	AA	CC
24	84	3	0	Undifferentiated NB	1	1	25,83	12,13	GG	AA	CC
25	72	4	0	Poorly differentiated NB	1	1	25,73	25,73	GT	AA	CC
26	72	4	0	Poorly differentiated NB	1	0	82,63	18,70	GT	AA	CC
27	12	1	0	Poorly differentiated NB	0	0	75,57	75,57	GG	AA	CC
28	15	3	0	Poorly differentiated NB	0	0	55,23	55,23	GG	AA	CC
29	22	1	1	Poorly differentiated NB	0	0	63,40	63,40	GG	AA	CC
30	12	3	0	Poorly differentiated NB	0	0	54,23	54,23	GT	AA	CC
31	72	4	0	Poorly differentiated NB	1	1	43,53	16,20	GT	AG	CC
32	0	4s	0	Poorly differentiated NB	0	0	101,90	101,90	GT	AA	CC
33	12	4	0	Poorly differentiated NB	0	0	39,97	39,97	GT	AA	CC
34	8	3	0	Poorly differentiated NB	0	0	101,90	101,90	GG	GG	CC
35	12	1	0	Poorly differentiated NB	0	0	82,63	82,63	GG	AA	CC
36	1	3	0	Poorly differentiated NB	0	0	81,60	81,60	GG	AG	CC
37	6	3	0	Poorly differentiated NB	0	0	46,10	46,10	GG	AA	CC
38	39	4	0	Poorly differentiated NB	1	1	13,97	13,97	GG	AA	CC
39	0	4s	0	Poorly differentiated NB	0	0	43,77	43,77	GG	AA	CC
40	5	1	0	Poorly differentiated NB	0	0	36,00	36,00	GG	AA	CC
41	5	4s	0	Poorly differentiated NB	0	0	26,87	26,87	GG	AA	CC
42	49	3	0	Poorly differentiated NB	1	0	26,87	26,87	GG	AA	CC
43	15	4	0	Poorly differentiated NB	0	0	14,70	14,70	TT	AA	CC
44	120	4	0	Poorly differentiated NB	1	1	21,33	17,67	TT	AA	CC
45	22	4	0	Poorly differentiated NB	1	1	20,07	8,20	GG	AG	CC
46	4	4s	0	Differentiating NB	0	0	83,67	83,67	GG	AA	CC
47	6	4s	0	Differentiating NB	0	0	60,33	60,33	GG	AA	CC
48	216	3	0	Differentiating NB	1	0	59,33	34,93	GG	AA	CC

Patient	Age at diagnosis (months)	Clinical stage (INSS)	MYCN status	Pathology	Event (1=event, 0=no event)	Patient status (1=Dead, 0=Alive)	Follow-up months	Follow-up event months	rs1801725	rs1042636	rs1801726
49	48	4	0	Differentiating NB	0	0	36,00	36,00	GT	AG	CC
50	26	4	0	Differentiating NB	0	0	15,13	14,67	GG	AA	CC
51	60	4	0	Differentiating NB	0	0	49,17	48,70	GT	AG	CG
52	2	4s	0	Differentiating NB	0	0	17,03	16,57	GG	AA	CG
53	12	3	0	Differentiating NB	0	0	12,20	11,73	GG	AA	CC
54	18	3	0	Differentiating NB	0	0	15,63	15,17	GG	AA	CC
55	18	3	0	Ganglioneuroblastoma	0	0	74,53	74,53	GG	AA	CC
56	72	2	0	Ganglioneuroblastoma	0	0	52,17	52,17	GG	AG	CC
57	78	3	0	Ganglioneuroblastoma	0	0	39,03	38,57	GG	AA	CC
58	60	4	0	Ganglioneuroblastoma, nodular	1	1	42,33	19,33	GG	AA	CC
59	39	1	0	Ganglioneuroma	0	0	124,27	124,27	GG	AA	CC
60	96	1	0	Ganglioneuroma	0	0	115,10	115,10	GG	AA	CC
61	75	2	0	Ganglioneuroma	0	0	83,67	83,67	GG	AA	CC
62	24	1	0	Ganglioneuroma	0	0	63,40	63,40	GG	AA	CC
63	11	1	0	Ganglioneuroma	0	0	53,20	53,20	GG	AA	CG
64	48	1	0	Ganglioneuroma	0	0	31,17	31,17	GT	AA	CC
65	24	3	0	Ganglioneuroma	0	0	103,93	103,47	GG	AA	CC

NB: Neuroblastoma.

INSS: International Neuroblastoma Staging System.

MYCN status: 1: Amplified; 0: Not amplified.

Table S3. Analysis of departure from Hardy-Weinberg equilibrium.

N	SNP	Total sample
65	rs1801725	0.69
	rs1042636	0.2
	rs1801726	1
54	rs1801725	0.71
	rs1042636	0.19
	rs1801726	1

Table S4. Linkage disequilibrium between loci rs1801725, rs1042636 and rs1801726 in patients diagnosed with (A) neuroblastic tumors and (B) neuroblastomas.

A.

D'

	rs1801725	rs1042636	rs1801726
rs1801725	-	0.9952	0.1955
rs1042636	-	-	0.971
rs1801726	-	-	-

*r*²

	rs1801725	rs1042636	rs1801726
rs1801725	-	0.015	0.005
rs1042636	-	-	0.002
rs1801726	-	-	-

P

	rs1801725	rs1042636	rs1801726
rs1801725	-	0.1563	0.4158
rs1042636	-	-	0.6135
rs1801726	-	-	-

B.

D'

	rs1801725	rs1042636	rs1801726
rs1801725	-	0.9955	0.4116
rs1042636	-	-	0.9747
rs1801726	-	-	-

*r*²

	rs1801725	rs1042636	rs1801726
rs1801725	-	0.020	0.017
rs1042636	-	-	0.002
rs1801726	-	-	-

P

	rs1801725	rs1042636	rs1801726
rs1801725	-	0.1454	0.1761
rs1042636	-	-	0.6522
rs1801726	-	-	-

Table S5. Association of *CaSR* gene polymorphisms and haplotypes with clinical and biological features of neuroblastomas.

	Age*		INSS				MYCN status			INPC	
	<18	18	1,2,3,4s	4	NA	A	Favorable	Unfavorable			
rs1801725											
G/G	15	18	20	13	24	9	16	17			
G/T+T/T	8	13	5	16	16	5	7	14			
P	0.594		0.02		0.777		0.272				
rs1042636											
A/A	21	27	23	25	34	14	20	28			
A/G+G/G	2	4	2	4	6	0	3	3			
P	0.627		0.499		0.321		0.697				
rs1801726											
C/C	22	29	24	27	38	13	21	30			
C/G	1	2	1	2	2	1	2	1			
P	0.739		0.643		0.763		0.386				
Haplotypes											
G-A-C	32	42	41	33	53	21	31	43			
T-A-C	10	14	5	19	18	6	12	12			
G-G-C	3	4	3	4	7	0	0	7			
G-A-G	1	2	1	2	2	1	1	2			
P	0.988		0.012		0.427		0.123				

* Age at diagnosis: months. INSS: International Neuroblastoma Staging System. MYCN status: A - amplified; NA - not amplified.

INPC: International Classification. Neuroblastoma Pathology

DISCUSIÓN

Los tumores neuroblásticos (TN) se originan a partir de células inmaduras derivadas de la cresta neural ya comprometidas en la diferenciación del sistema nervioso periférico simpático. Su comportamiento clínico es muy variable e incluye desde tumores con una agresiva capacidad de proliferación y resistentes al tratamiento, hasta casos que muestran un crecimiento exclusivamente loco-regional y que se asocian a un pronóstico excelente (Ambros et al, 1995; Mora y Gerald, 2004; Brodeur et al, 1984 y 2003).

El avance en el conocimiento de la biología de los TN ha permitido identificar a los pacientes portadores de tumores benignos, que pueden ser tratados exclusivamente con cirugía, y los NB agresivos, que muestran índices de supervivencia inferiores al 40% a pesar de recibir tratamientos intensivos multimodales (Ambros et al, 2009; Maris, 2010; Schilling et al, 2002; Gatta et al, 2012). Entre las anomalías genético-moleculares implicadas en esta diversidad de comportamientos clínicos de los TN se hallan la alteración de la ploidía y la amplificación del oncogén *MYCN* (Bown et al, 1999, Mora et el, 2000; Maris et al, 2007). Estas alteraciones contribuyen a comprender el comportamiento clínico de los TN pero son difícilmente modulables farmacológicamente. Por este motivo, persiste la necesidad de ampliar el conocimiento de la biología del NB con el fin de identificar nuevas dianas terapéuticas que promuevan una mejora real en el pronóstico de los NB metastásicos, recaídos y refractarios.

Los TN están constituidos por neuroblastos y células gliales de tipo Schwann. Según el grado de diferenciación de los neuroblastos y la proporción de células gliales, los TN se clasifican en tres grupos: NB, ganglioneuroblastoma (GNB) y ganglioneuroma (GN). El grado de maduración de las células neuroblásticas y la abundancia del estroma glial contribuyen a determinar el comportamiento clínico de estos tumores. Así, los TN más diferenciados y con mayor proporción de componente estromal tipo Schwann (NB en diferenciación, GNB y GN) se asocian a mejor pronóstico que los NB indiferenciados pobres en estroma. Se ha postulado, que una de las causas de la aparición de los TN puede ser el bloqueo en el proceso de diferenciación de los

neuroblastos (Mora y Gerald, 2004; van Noesel y Versteeg, 2004). Las vías moleculares responsables de los procesos de diferenciación celular tienen gran importancia terapéutica ya que son modulables farmacológicamente. Uno de los fármacos inductores de diferenciación más utilizados en modelos *in vitro* y en pacientes afectados de NB es el ácido retinoico (Sidell et al 1983; Matthay et al, 2009). Este fármaco ha mejorado la supervivencia libre de eventos de los TN, pero no es eficaz en todos los casos (Huang et al, 2009). Por este motivo, ampliar el conocimiento de las rutas moleculares implicadas en los procesos de diferenciación de los TN podría permitir diseñar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren el pronóstico de estos pacientes.

El receptor sensor de calcio (*CaR*) es un receptor acoplado a proteínas G cuya principal función es mantener los niveles de calcio extracelular dentro de un margen muy estrecho mediante la regulación de la secreción de la hormona paratiroidea. Este receptor se halla expresado también en numerosos tejidos normales no relacionados con el metabolismo del calcio y en algunas neoplasias. En cáncer, *CaR* parece ejercer funciones diferentes en distintas neoplasias dependiendo del contexto celular en el que se halla expresado (revisado en Saidak et al, 2009). Así, por ejemplo, parece promover proliferación y metástasis en carcinoma de mama y próstata (Yano et al, 2004; Journé et al, 2004), mientras que en carcinoma de colon participaría en los procesos de diferenciación (Chakrabarty et al, 2005; Varani et al, 2011). Por el momento, se desconocen los mecanismos por los que este GPCR actuaría como oncogén en algunas neoplasias y en cambio presenta un patrón de expresión compatible con el de un gen supresor de tumores en otras. Así mismo, tampoco se conocen los mecanismos de regulación transcripcional responsables de la disminución en la expresión de *CaR* en algunas neoplasias.

Nuestro grupo describió por primera vez la expresión de *CaR* en un tumor del desarrollo. Esto supuso descubrir una nueva vía molecular implicada en la diferenciación de los TN que es susceptible de ser modificada con fines

terapéuticos (de Torres et al, 2009). Describimos que *CaR* se halla expresado en el sistema nervioso periférico normal y en los TN con algún grado de diferenciación (NB pobremente diferenciados y en diferenciación, GNB y GN), pero su expresión está muy disminuida o incluso ausente en los NB indiferenciados. Se observó asimismo que los procesos de diferenciación inducida, tanto en *in vitro* como *in vivo*, promovían un incremento de dicha expresión, lo cual indicaba que este gen se hallaba controlado, al menos parcialmente mediante mecanismos de regulación transcripcional dinámicos, modificables. Por todo lo expuesto, en la presente tesis se planteó la **hipótesis** de que *CaR* pudiera ejercer funciones como gen supresor de tumores en este contexto tumoral. Si fuera así, el gen *CaR* se hallaría silenciado mediante mecanismos genéticos y epigenéticos en NB agresivos, de mal pronóstico, y la restauración de su expresión promovería disminución de la proliferación, supervivencia y/o tumorigénesis de las células de NB.

Para evaluar **mecanismos epigenéticos de regulación transcripcional** potencialmente involucrados en el silenciamiento del gen *CaR* en NB, se realizó inicialmente un tratamiento *in vitro* de diversas líneas celulares de NB con el inhibidor de las ADN metiltransferasas 5'aza-2'-desoxicitidina (Aza) y con el inhibidor de la desacetilación de las histonas tricostatina A (TSA), solos y en combinación. El hecho de que la expresión de *CaR* se incrementara tras la exposición a cada uno de estos fármacos en las líneas celulares que presentaban amplificación del oncogén *MCYN* permitió inferir que, en dichas líneas celulares, el gen *CaR* se hallaba silenciado por mecanismos epigenéticos que involucraban la hipermetilación de una isla CpG y también modificaciones post-traduccionales de las histonas, concretamente en su estado de acetilación. La reactivación de la expresión génica mediante Aza se ha demostrado en varios contextos celulares (Christman 2002; Hizaki et al, 2011; Dawson y Kouzarides, 2012), así como en líneas celulares de NB (Alaminos et al, 2004). Además, se ha publicado que el tratamiento con TSA en líneas celulares tumorales, reactiva la expresión de distintos genes, entre los cuales se hallan genes supresores de tumores (Mühlethaler-Mottet et al, 2008; Yoshida et al,

1990; Sharma et al, 2010; Dawson y Kouzarides, 2012). El tratamiento combinado con Aza y TSA, provocó un incremento mayor en la restauración de la expresión de *CaR* que cada tratamiento por separado, de manera análoga a lo que sucede en otros genes supresores de tumores (Cameron et al, 1999; Kim et al, 2006; Zhu y Otterson, 2003; Hurtubise et al, 2008). Esto indicaría que ambos mecanismos contribuyen conjuntamente al silenciamiento epigenético del gen *CaR* en NB. Se ha descrito que la metilación del ADN y la modificación de las histonas son procesos que cooperan para modular la represión epigenética. Así, las modificaciones de las histonas pueden guiar el establecimiento de patrones de metilación de ADN, y la metilación de las citosinas puede proporcionar una plantilla para mantener algunas modificaciones de las histonas después de la replicación celular (revisado en Cedar y Bergman, 2009).

Con el fin de analizar detalladamente la región del gen *CaR* potencialmente hipermetilada en este contexto, se realizó una búsqueda de islas CpG en la región promotora. Se identificó así una **isla CpG** englobando al promotor 2 (P2), que ya había sido previamente descrito como rico en dinucleótidos CGs (Chikatsu et al, 2000). Se procedió entonces a analizar el estado de metilación de esta isla CpG tanto en líneas celulares de NB como en NB primarios. Se objetivó mediante BSP y MSP que esta isla CpG se hallaba hipermetilada en las líneas celulares de NB portadoras de amplificación del oncogén *MYCN* y en un 25% de tumores primarios. En estos, la hipermetilación de esta región se asociaba también con la amplificación de *MYCN* y con otros factores de mal pronóstico en NB como son enfermedad metastásica, edad al diagnóstico superior a 18 meses y clasificación anatómo-patológica desfavorable. Con el fin de determinar que efectivamente la hipermetilación de esta región contribuye al control de la expresión del gen *CaR* en NB, se secuenció la mencionada isla CpG en una línea celular cultivada en condiciones estándar y tras la exposición a Aza y/o TSA. El porcentaje de citosinas metiladas disminuyó claramente tras la exposición a Aza, o tras el tratamiento combinado con TSA, mientras que permaneció tan elevado tras la exposición a

la TSA como en condiciones estándar. Se confirmó así que la hipermetilación de esta región contribuye al control de la expresión de *CaR* en NB.

La inactivación del gen *CaR* mediante **hipermetilación del promotor** en carcinomas colorectales indiferenciados y agresivos fue descrita mientras se desarrollaba esta tesis (Hizaki et al, 2011). Sin embargo, en ese estudio no se identifica la región específica que controla funcionalmente la expresión del receptor en ese contexto tumoral y tampoco se analizan las consecuencias de la sobreexpresión y reactivación de *CaR*. En cambio, nuestro trabajo identifica una región de la isla CpG que sería la responsable del silenciamiento mediante hipermetilación del promotor 2 en NB y a continuación evalúa funcionalmente las propiedades como gen supresor de tumores de *CaR*.

Algunos trabajos han hallado una asociación entre el silenciamiento de diversos genes mediante hipermetilación con factores de mal pronóstico en NB, incluida la **amplificación del oncogén MYCN** (Teitz et al, 2000; Fulda et al, 2001; Carén et al, 2011; Yang et al, 2010; Geiger et al, 2012; Alaminos et al, 2005). Dos mecanismos de remodelación epigenética podrían explicar esta asociación: el **fenotipo hipermetilador** (CIMP) (ver sección de la Introducción 3.3.2) y el papel de *MYCN* como regulador epigenético. En NB, se ha descrito hipermetilación aberrante simultánea de varios genes cuyos productos participan en procesos celulares tan importantes como el control del ciclo celular, apoptosis o diferenciación, por lo que el CIMP en NB se asocia con mal pronóstico (Abe et al, 2005; Yang et al, 2010; Baylin y Jones, 2011).

Por otro lado, *MYCN*, como factor de transcripción, no sólo contribuye a transactivar genes que incrementan la malignidad del tumor (involucrados en proliferación, metástasis, angiogénesis, resistencia a quimioterapia, etc.), sino que también ejerce como **represor transcripcional** (Gherardi et al, 2013). Para ello, recluta proteínas o complejos proteicos, como DNMT3 y PRC2, que contribuyen a reprimir epigenéticamente determinados genes diana (Cotterman et al, 2008; Wood et al, 2000; Murphy et al, 2009; Soufi et al, 2012). En concreto,

es interesante que *MYCN* sea capaz de interactuar con enzimas metiltransferasas (*DNMT3a* y *DNMT3b*), ya que, por sí solas, estas enzimas no poseen mucha más especificidad de diana que no sea las regiones ricas en dinucleótidos CGs. Así, *MYCN* sería quien, en el contexto de NB, conferiría a las DNA metiltransferasas la capacidad de identificar genes diana a silenciar mediante hipermetilación, como se ha descrito en el caso de *c-MYC* (Hervouet et al, 2009; Brenner et al, 2005). En NB, este mecanismo se ha asociado a la inactivación de genes supresores tumorales y se presenta, por tanto, con tumores agresivos y de histología indiferenciada (Alaminos et al, 2004; Hervouet et al, 2009; Guccione et al, 2006). Esta función de *MYCN* como regulador epigenético, puede explicar la frecuente hipermetilación de genes en NB con amplificación de este oncogén (He et al, 2013; Carén et al, 2011), como también parece ser el caso del gen *CaR*.

Como se comenta más arriba, dentro de los mecanismos epigenéticos potencialmente responsables de la inactivación del gen *CaR* en NB, el hecho de que la expresión de *CaR* se incrementara en líneas celulares expuestas a TSA, sola y/o en combinación con Aza, indicó que las modificaciones post-traduccionales de las histonas, concretamente su estado de acetilación, contribuye a la represión epigenética del gen *CaR* en este contexto tumoral. Los niveles de acetilación de las histonas están controlados mediante las enzimas acetil-transferasas de histonas o HAT (*Histone acetyl transferases*) que transfieren grupos acetilo a las histonas, y las desacetilasas de histonas o HDAC (*Histone deacetylases*) que eliminan estos residuos. Estas enzimas participan en el control del acceso de los factores de transcripción al ADN, regulando de forma dinámica la transcripción (Kim et al, 2006; Nair y Kumar, 2012). La acetilación de la cola N-terminal de las histonas, se ha relacionado con un aumento de la transcripción génica y, concretamente la hipoacetilación, se asocia con el silenciamiento aberrante de genes en cáncer (Dawson y Kouzarides, 2012; Kim et al, 2006). El uso de inhibidores de HDAC como TSA, provoca una acumulación de histonas acetiladas y activa así la transcripción génica

(Mühlethaler-Mottet et al, 2008; Hurtubise et al, 2008). En esta tesis, no se ha explorado con más detalle la contribución de las modificaciones post-traduccionales de las histonas en el control de la expresión de CaR en NB, pero sin duda sería un ámbito interesante a desarrollar.

Con el fin de examinar **mecanismos genéticos** que contribuyeran a la inactivación del gen *CaR* en los TN, se investigaron las pérdidas alélicas mediante I-FISH. La **monosomía del cromosoma 3**, donde se localiza el gen humano *CaR*, había sido previamente detectada en TN de pronóstico favorable mediante aCGH (Spitz et al, 2003). En el presente trabajo, se escogió utilizar la técnica de I-FISH, a pesar de no existir una sonda comercial que hibridara con la región de interés, por proporcionar una sensibilidad superior para detectar este tipo de alteraciones. Se ha publicado reiteradamente que los tumores se hallan formados por conjuntos heterogéneos de células y que esto puede interferir en la capacidad para detectar determinadas alteraciones genéticas (Gerlinger et al, 2012; Sottoriva et al, 2013; Gisselsson et al, 2000). Así pues, a partir de un BAC, se generó una sonda para analizar el estado de la región 3q13-21 mediante I-FISH. El análisis en los tumores primarios identificó un porcentaje superior al 30% de núcleos con monosomía del cromosoma 3 en todo el espectro de TN, tanto benignos como malignos. El porcentaje de núcleos con esta alteración era superior al 40% entre el subgrupo de tumores histológicamente más diferenciados (NB en diferenciación, GNB y GN) y, por tanto, más lentamente proliferativos. Sin embargo, en las líneas celulares, las pérdidas de *CaR* por monosomía del cromosoma 3, deleciones o desequilibrios fueron fenómenos infrecuentes (ver más abajo).

En varias patologías, se han descrito **pérdidas alélicas** en heterocigosis debidas a monosomía, que se asocian con disminución en los niveles de expresión de algunos genes específicos (Yadav et al, 2009). Por ejemplo, en NB se ha descrito que la pérdida de heterocigosidad del gen *TSLC1* se asocia a una disminución de su expresión en los tumores (Ando et al, 2008). En la cohorte

analizada en el presente trabajo no se pudo asociar la monosomía del cromosoma 3 con disminución en la expresión de *CaR* ARNm. Además, en algunas muestras, la reducción en los niveles de expresión de *CaR* se detectó en ausencia de pérdidas alélicas y/o hipermetilación del promotor 2. Esto podría ser debido a que en la mayoría de muestras esta anomalía está presente en un porcentaje bajo de núcleos y que, además, se distribuyen de forma heterogénea en el tumor. En otros tumores derivados de la cresta neural como los feocromocitomas (Dannenberg et al, 2000) y el melanoma uveal (Onken et al, 2007), también se ha descrito que la monosomía del cromosoma 3 se distribuye de forma heterogénea entre las células de los tumores. Otros mecanismos de inactivación pueden contribuir al silenciamiento del gen *CaR* en NB además de los que se describen en esta tesis, y están siendo evaluados actualmente. En todo caso, en base a los datos presentados, se puede plantear un modelo según el cual la monosomía del cromosoma 3 promovería la pérdida de un alelo del gen *CaR* en TN de todos los subtipos, y la inactivación del otro alelo ocurriría en los NB agresivos mediante mecanismos epigenéticos.

La inestabilidad cromosómica y la acumulación de diversidad clonal contribuyen a la progresión tumoral. En este proceso, se ha descrito que existen anomalías cromosómicas transitorias que son seleccionadas a favor de otras que ofrecen mayor ventaja adaptativa a las células neoplásicas (Díaz-Cano, 2012; Ye et al, 2009). Las líneas celulares derivadas de tumores altamente proliferantes, sufren un proceso de selección clonal para adaptarse a las condiciones de cultivo. De esta forma, la ausencia de la monosomía del cromosoma 3 hallada en las líneas de NB, se puede interpretar como una clona anómala transitoria (Ye et al, 2009; Heng et al, 2006).

Tras hallar que el gen *CaR* se encuentra silenciado mediante mecanismos genéticos y epigenéticos en TN, se procedió a analizar los efectos promovidos por la restauración de su expresión en dos líneas celulares con amplificación de *MYCN* en las cuales se había documentado hipermetilación del promotor 2. Es

importante señalar que estas dos líneas celulares han sido previamente clasificadas como líneas celulares de NB de tipo intermedio y, por tanto, se agrupan entre las que presentan mayor capacidad de **proliferación y tumorigénesis**. Como se describe en la Introducción, el aumento de la expresión de *CaR* en células paratiroideas y de la cripta del colon se asocia con aumento diferenciación y disminución de la proliferación (revisado en Saidak et al, 2009). Las células de NB con sobreexpresión inducida y estable de *CaR* presentaron índices de proliferación significativamente inferiores con respecto a las células control, aunque no se detectaron en ellas cambios morfológicos ni de expresión asociados con diferenciación. Más aún, las células de NB con sobreexpresión de *CaR* mostraron una capacidad notablemente disminuida para generar tumores en ratones inmunodeprimidos. Este conjunto de datos apoyaría la hipótesis de que *CaR* ejerce funciones propias de un gen supresor de tumores en NB.

Con el fin de determinar los mecanismos por los cuales la sobreexpresión de *CaR* produce una disminución tan notable de la capacidad tumorigénica en las células de NB, se evaluó el fenotipo promovido por la activación aguda o súbita de *CaR* en las células de NB con sobreexpresión inducida y estable del receptor. Para ello, se utilizó un modelo *in vitro* que ha servido para caracterizar las vías de señalización activadas por *CaR* en numerosos contextos celulares (Hjälml et al, 2001; Zhang y Breitwieser, 2005). Se observó así que la activación aguda de *CaR* mediante su principal ligando, el calcio, promovía muerte de las células de NB mediante **apoptosis**. Se ha descrito que la re-expresión de genes silenciados por hipermetilación que son necesarios para la supervivencia de las células tumorales, induce disminución de la proliferación y muerte celular (de Carvalho et al, 2012; Fraga et al, 2008). De manera similar, nuestros datos muestran que la re-expresión de *CaR* reduce la capacidad de proliferación y tumorigénesis en células de NB, y que su activación aguda induce apoptosis en dos líneas celulares de NB en las cuales la expresión del receptor se halla silenciada mediante hipermetilación del promotor 2. Así pues, a partir de este

conjunto de datos, se puede inferir que el silenciamiento epigenético del gen *CaR* es un mecanismo relevante para la supervivencia y proliferación de las células de NB.

Entre las cascadas de señalización potencialmente involucradas en el fenómeno de muerte observado, se eligió examinar la activación de **ERK1/2** ya que numerosos trabajos indican que esta vía participa en diversos procesos de muerte celular como son la apoptosis, la autofagia y la senescencia (Chang y Karin, 2001; Meloche y Poyssegur, 2007; Cagnol y Chambard 2010). Además, se ha publicado que la activación aguda de *CaR* induce activación de ERK1/2 (Pece y Gutkind, 2000; Ward 2004; Hobson et al, 2003) y se ha relacionado con la inducción de apoptosis (Xing et al, 2011). Tal como se ha documentado en otros contextos celulares, en el modelo examinado por nosotros, el proceso de apoptosis en células de NB iniciado por la activación aguda de *CaR* fue dependiente de la fosforilación sostenida de ERK1/2 (Cagnol y Chambard 2010; Xing et al, 2011; Kifor et al, 2001).

El modelo *in vitro* utilizado en este trabajo podría estar un poco alejado de la realidad clínica, ya que las células transfectadas establemente con *CaR* presentan niveles de expresión del receptor muy superiores a los detectados en los tumores primarios. Actualmente se están desarrollando distintos modelos en el laboratorio para analizar estas diferencias. Sin embargo, el modelo de sobreexpresión mediante transfección estable, ha sido ampliamente utilizado en la literatura para estudiar los efectos de un posible gen supresor de tumores sobre la proliferación, supervivencia y tumorigénesis. Además, este modelo en nuestro contexto celular, ha permitido determinar que el silenciamiento epigenético de *CaR* es un mecanismo relevante para el crecimiento y supervivencia de las células de NB.

Con el fin de examinar otros mecanismos genéticos que pudieran contribuir a la inactivación de *CaR* en TN, se analizaron tres **variantes genéticas funcionalmente relevantes** (rs1801725, rs1042636 y rs1801726). Estos polimorfismos codifican para cambios no conservativos de aminoácidos en la cola amino-terminal de la proteína, que es la responsable de la transducción de señal (Hendy et al, 2000). Se han analizado combinaciones de haplotipos de estos loci como potenciales alelos de predisposición a algunos tipos de cáncer, como el de colon (Dong et al, 2008; Peters et al, 2004; Bácsi et al, 2008), paratiroides (Miedlich et al, 2001) y próstata (Schwartz et al, 2010; Shui et al, 2013). Basándonos en los datos acumulados durante el desarrollo de este proyecto, la hipótesis que se formuló es que las variantes que indujeran una disminución de la función de *CaR* se asociarían con un fenotipo más agresivo de los TN.

La cohorte analizada se hallaba compuesta casi por completo por pacientes de origen caucásico y, por consiguiente, la variante más frecuentemente detectada fue rs1801725. Se ha descrito que el alelo minoritario de rs1801725 reduciría moderadamente la función del receptor (Yun et al, 2007; Cole et al, 1999). En la cohorte de TN analizada, esta variante menos activa se asoció con tumores de histología indiferenciada, enfermedad metastásica y peor supervivencia global, lo cual concuerda con los datos previos que indicaban que la disminución de la expresión de *CaR* se asocia a factores de mal pronóstico en NB. Sin embargo, no resultó ser un factor de pronóstico independiente en un análisis multivariante. En un subgrupo de pacientes, se analizó si esta variante era una alteración somática, sólo presente en el tumor, o si por el contrario se hallaba presente en línea germinal. Al analizar los 3 SNPs tanto en el ADN de los tumores como en la sangre periférica o médula ósea no infiltrada por NB se obtuvieron resultados 100% concordantes.

Cuando las tres variantes fueron analizadas con un bloque (Heath et al, 1996), el haplotipo TAC (que incluye la variante rs1801725 que causa disminución de función y ausencia de la variante rs1042636 causante de ganancia de función de CaR) se asoció de manera estadísticamente significativa con enfermedad metastásica y con un riesgo incrementado de muerte en toda la cohorte de TN y, lo que es más importante, en los pacientes diagnosticados de NB. En los estudios de asociación publicados hasta la fecha, no se ha descrito nunca una combinación de estos polimorfismos que resulte ser **factor predictor de pronóstico independiente** en ningún tipo de neoplasia. Nuestro estudio, muestra en cambio que un haplotipo particular (TAC) es un factor predictor de pronóstico independiente en TN y en NB. Aunque no se han realizado estudios funcionales que lo prueben, esta combinación de polimorfismos codificaría para un receptor menos activo, ya que incluye la variante rs1801725 pero no el alelo minoritario rs1042636, que genera una variante con ganancia de función (Yun et al, 2007).

Se han descrito varios factores pronósticos asociados a la evolución clínica de los pacientes con NB, incluyendo polimorfismos (Brodeur et al, 1984; Shimada et al, 1999; Cohn et al, 2009; Nakagawara et al, 1993; Lagmay et al, 2009; García et al, 2012). Para el análisis de los factores genético-biológicos presentes en el tumor, se requiere disponer de muestras tumorales de suficiente cantidad y calidad, algo que no siempre es posible. En cambio, el análisis de los SNPs puede realizarse a partir de cualquier muestra de ADN del paciente. Por lo tanto, el análisis del haplotipo TAC podría contribuir a predecir el pronóstico de los pacientes con TN incluso en aquellos casos en los que no es posible biopsiar al paciente o cuando la muestra obtenida es de baja calidad/cantidad para analizar otros parámetros. Sin embargo, para poder aplicar este factor pronóstico en la práctica clínica, es imprescindible validar estos hallazgos en cohortes independientes y más amplias. También será importante establecer si este haplotipo es un factor predictor de pronóstico en pacientes de otros orígenes étnicos. En todo caso, el hallazgo de que estas variantes genéticas del

gen *CaR* presentes en el ADN constitutivo o de línea germinal se asocian con el fenotipo de los TN contribuiría a incrementar el conjunto de resultados publicados en los últimos años que indican que la combinación de distintas variantes polimórficas podrían contribuir a la tumorigénesis y fenotipo de estos tumores del desarrollo (Peters et al, 2004; Bácsi et al, 2008; Dong et al, 2008; Schwartz et al, 2010; Hibler et al, 2012; Jacobs et al, 2010).

En resumen, el conjunto de datos mostrados en esta tesis indican que el gen *CaR* se halla inactivado mediante mecanismos genéticos y epigenéticos en TN y que su sobreexpresión inhibe la proliferación y la tumorigenicidad de las células de NB. Más aún, la activación de este receptor induce apoptosis en células de NB. Todo ello es consistente con la hipótesis principal de esta tesis, es decir, que el gen *CaR* ejerce funciones como gen supresor de tumores en neuroblastoma. Actualmente, se están evaluando posibles estrategias terapéuticas derivadas de estos hallazgos.

CONCLUSIONES

En base a los Resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El gen del receptor sensor de calcio *CaR* se halla silenciado mediante mecanismos epigenéticos en líneas celulares de neuroblastoma portadoras de amplificación del oncogén *MYCN*. Estos mecanismos, que cooperan sinérgicamente para reducir o abolir la expresión del gen *CaR* en este contexto celular, incluyen la hipermetilación de una isla CpG que engloba al promotor 2 de este gen y la hipoacetilación de las histonas.

2. La hipermetilación de la mencionada isla CpG se halla también presente en neuroblastomas primarios, en asociación con niveles reducidos de expresión del ARNm del gen *CaR* y factores de mal pronóstico en estos tumores como son la amplificación del oncogén *MYCN*, estadio clínico 4, edad al diagnóstico superior a 18 meses y clasificación anatomopatológica desfavorable.

3. La hipermetilación de una región concreta de la mencionada isla CpG contribuye al control epigenético de la expresión del gen *CaR* en neuroblastoma, ya que se detectan en ella porcentajes reducidos de citosinas metiladas de manera concurrente con la restauración de la expresión de este gen en líneas celulares de neuroblastoma tratadas con un inhibidor de ADN metiltransferasas y en neuroblastomas expuestos a quimioterapia.

4. La monosomía del cromosoma 3, donde se localiza el gen humano *CaR*, es una alteración genética detectable en la práctica totalidad de los tumores neuroblásticos primarios. El porcentaje de núcleos portadores de esta anomalía genética es mayor en los tumores histológicamente más diferenciados y lentamente proliferativos (neuroblastomas en diferenciación, ganglioneuroblastomas y ganglioneuromas).

5. La sobreexpresión inducida y estable del gen humano *CaR* en líneas celulares de neuroblastoma en las cuales este gen se halla silenciado mediante hipermetilación de su promotor promueve la disminución de su ritmo de proliferación *in vitro*. Asimismo, reduce hasta casi abolir su capacidad para formar tumores en ratones inmunodeprimidos. Más aún, la reactivación aguda de este receptor en dichas líneas celulares, induce muerte celular mediante apoptosis. Así pues, la inactivación epigenética del gen *CaR* es un mecanismo relevante para la viabilidad, proliferación y tumorigenicidad de las células de neuroblastoma.

6. La variante genética rs1801725, que promueve una disminución moderada de la actividad de este receptor, se asocia con el grupo histológico de los neuroblastomas indiferenciados y con el estadio clínico 4 de estos tumores. Asimismo, se correlaciona con una peor supervivencia global y libre de eventos en pacientes afectados de este tipo de tumores del desarrollo, aunque no es un factor predictor de pronóstico independiente.

7. El haplotipo TAC, correspondiente al bloque que conforman 3 variantes genéticas funcionalmente relevantes localizadas en el exón 7 del gen *CaR* (rs1801725, rs1042636 y rs1801726), se correlaciona estadísticamente con el estadio clínico 4 de neuroblastoma. Más aún, este haplotipo, que incluye una variante genética que promueve disminución de la actividad de *CaR* (rs1801725) pero no el polimorfismo que induce ganancia de función en este receptor (rs1042636), se asocia con un incremento estadísticamente significativo del riesgo de muerte en pacientes afectados de tumores neuroblásticos y, más específicamente, en aquellos diagnosticados de neuroblastoma. Esta asociación es independiente de otras variables predictoras de pronóstico conocidas en neuroblastoma y, por tanto, el haplotipo TAC constituye un factor predictor de pronóstico independiente en tumores neuroblásticos y en neuroblastomas.

8. El mencionado haplotipo TAC es un factor predictor de pronóstico que puede determinarse en cualquier muestra de ADN de los pacientes afectos de tumores neuroblásticos, ya que las variantes genéticas que lo componen no constituyen una alteración somática de los tumores, sino que se hallan presentes en el ADN constitutivo o de línea germinal. Por ello, este haplotipo es un factor predictor de pronóstico susceptible de ser analizado en todos los pacientes afectos de tumores neuroblásticos, incluidos aquellos en los que no se puede disponer de material biológico del tumor primario. Además, se analiza mediante una técnica de fácil implementación e interpretación, altamente reproducible y de reducido coste económico.

9. El hecho de que el haplotipo TAC, que potencialmente genera una forma de CaR menos activa, se asocie con enfermedad metastásica y mal pronóstico en estos tumores, proporciona nuevas pruebas congruentes con los datos previos, todos los cuales indican que la disminución de la función y/o expresión de CaR es un fenómeno asociado al fenotipo más agresivo de los tumores neuroblásticos.

En conjunto, los Resultados y Conclusiones de esta Tesis apoyan la Hipótesis inicialmente planteada según la cual el receptor sensor de calcio ejerce funciones propias de un gen supresor de tumores en el contexto de los tumores neuroblásticos y, por ello, se halla silenciado mediante mecanismos genéticos y epigenéticos en neuroblastomas agresivos, de mal pronóstico.

BIBLIOGRAFÍA

Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A, Ushijima. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res* 2005; 65:828-834

Abel F, Ejeskär K, Kogner P, Martinsson T. Gain of chromosome arm 17q is associated with unfavourable prognosis in neuroblastoma, but does not involve mutations in the somatostatin receptor 2 (SSTR2) gene at 17q24. *Br J Cancer* 1999; 81:1402-1409

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

Alaminos M, Dávalos V, Ropero S, Setién 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 tumour suppressor in glioma and neuroblastoma. *Cancer Res* 2005; 65:2565-2571

Alaminos M, Gerald WL, Cheung NK. Prognostic value of MYCN and ID2 overexpression in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 45:909-915

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; 63:4538-4546

Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 2003; 34:369-376

Al-Salameh A, Cetani F, Pardi E, Vulpoi C, Pierre P, de Calan L, Guyetant S, Jeunemaitre X, Lecomte P. A novel mutation in the calcium-sensing receptor in a French family with familial hypocalciuric hypercalcaemia. *Eur J Endocrinol* 2011; 165:359-363

Ambros IM. Role of ploidy, chromosome 1p and Schwann cells in maturation of NB. *N Engl J Med* 1996; 334:1505-1511

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

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

Ando K, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Akazawa K, Suenaga Y, Nakamura Y, Koda T, Kamijo T, Murakami Y, Nakagawara A. Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation. *Int J Cancer* 2008; 123:2087-2094

Arabzadeh A, Troy TC, Turksen K. Insights into the role of the calcium sensing receptor in epidermal differentiation in vivo. *Mol Biotechnol* 2009; 43:264-272

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; 24:2243-2253

Awata H, Huang C, Handlogten ME, Miller RT. Interaction of the calcium-sensing receptor and filamin, a potential scaffolding protein. *J Biol Chem* 2001; 276:34871-34879

Ba J, Friedman PA. Calcium-sensing receptor regulation of renal mineral ion transport. *Cell Calcium* 2004; 35:229-237

Bácsi K, Hitre E, Kósa JP, Horváth H, Lazáry A, Lakatos PL, Balla B, Budai B, Lakatos P, Speer G. Effects of the lactase 13910 C/T and calcium-sensor receptor A986S G/T gene polymorphisms on the incidence and recurrence of colorectal cancer in Hungarian population. *BMC Cancer* 2008; 8:317-327

Bai M. Structure-function relationship of the extracellular calcium-sensing receptor. *Cell Calcium* 2004; 3:197-207

Bai M, Trivedi, Brown EM. Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem* 1998; 273:23605-23610

Baker DL, Schmidt ML, Cohn SL, Maris JM, London WB, Buxton A, Stram D, Castleberry RP, Shimada H, Sandler A, Shamberger RC, Look AT, Reynolds CP, Seeger RC, Matthay KK. Outcome after reduced chemotherapy for intermediate-risk neuroblastoma. *N Engl J Med* 2010; 363:1313-1323

Bandyopadhyay S, Tfelt-Hansen J, Chattopadhyay N. Diverse Roles of Extracellular Calcium-Sensing Receptor in the Central Nervous System. *J Neuro Res* 2010; 88:2073-2082

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

Baron J, Winer KK, Yanovski JA, Cunningham AW, Laue L, Zimmerman D, Cutler GB Jr. Mutations in the Ca (2+)-sensing receptor gene cause autosomal dominant and sporadic hypoparathyroidism. *Hum Mol Genet* 1996; 5:601-606

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

Bell E, Chen L, Lui T, Marshall GM, Lunec J, Tweddle DA. MYCN oncoprotein targets and their therapeutical potential. *Cancer Lett* 2010; 293:144-157

Berdasco M, Ropero S, Setien F, Fraga MF, Lapunzina P, Losson R, Alaminos M, Cheung NK, Rahman N, Esteller M. Epigenetic inactivation of the Sotos overgrowth syndrome gene histone methyltransferase NSD1 in human neuroblastoma and glioma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:21830-21835

Berthold F, Simon T. Clinical Presentation. In: Cheung NK, Cohn S (ed). *Neuroblastoma*. Springer-Verlag. Berlin 2005; 63-85

Bhagavathula N, Kelley EA, Reddy M, Nerusu KC, Leonard C, Fay K, Chakrabarty S, Varani J. Upregulation of calcium-sensing receptor and mitogen-activated protein kinase signaling in the regulation of growth and differentiation in colon carcinoma. *Br J Cancer* 2005; 93:1364-1371

Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 1973; 33:2643-2652

Bishop JM. The discovery of proto-oncogenes. *FASEB J* 1996; 10:362-364

Bowen KA, Chung DH. Recent advances in neuroblastoma. *Curr Opin Pediatr* 2009; 21:350-356

Bown N, Lastowska. 17q gain in neuroblastoma predicts adverse clinical outcome. U.K. Cancer Cytogenetics Group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36:14-29

Brenner C, Deplus R, Didelot C, Lorient A, Viré E, De Smet C, Gutierrez A, Danovi D, Bernard D, Boon T, Pelicci PG, Amati B, Kouzarides T, de Launoit Y, Di Croce L, Fuks F. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J* 2005; 24:336-346

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

Bradbury RA, Sunn KL, Crossley M, Bai M, Brown EM, Delbridge L, Conigrave AD. Expression of the parathyroid Ca(2+)-sensing receptor in cytotrophoblasts from human term placenta. *J Endocrinol* 1998; 156:425-430

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

Brodeur GM, Green AA, Hayes FA, Williams KJ, Williams DL, Tsiatis AA. Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines. *Cancer Res* 1981; 41:4778-4786

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

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; 11:1466-1477

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

Brodeur GM, Sekhon G, Goldstein MN. Chromosomal aberrations in human neuroblastoma. *Cancer* 1977; 40:2256-2263

Brown EM. Clinical lessons from the calcium-sensing receptor. *Nat Clin Pract* 2007; 3:122-133

Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC. Cloning and characterization of an extracellular Ca (2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993; 366:575-580

Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signalling. *Physiol Rev* 2001; 81:239-297

Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* 2010; 277:2-21

Cameron EE, Bachman KE, Myöhänen S, Herman JG, Baylin SB. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 1999; 21:103-107

Canaff L, Hendy GN. Calcium-sensing receptor gene transcription is up-regulated by the proinflammatory cytokine, interleukin-1beta. Role of the NF-kappaB pathway and kappaB elements. *Biol Chem* 2005; 280:14177-14188

Capasso M, Devoto M, Hou C, Asgharzadeh S, Glessner JT, Attiyeh EF, Mosse YP, Kim C, Diskin SJ, Cole KA, Bosse K, Diamond M, Laudenslager M, Winter C, Bradfield JP, Scott RH, Jagannathan J, Garris M, McConville C, London WB, Seeger RC, Grant SF, Li H, Rahman N, Rappaport E, Hakonarson H, Maris JM. Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* 2009; 41:718-723

Carén H, Djos A, Nethander M, Sjöberg RM, Kogner P, Enström C, Nilsson S, Martinsson T. Identification of epigenetically regulated genes that predict patient outcome in neuroblastoma. *BMC Cancer* 2011; 11:66-77

Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Smith JD, Kruglyak L, Nickerson DA. Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. *Nat Genet* 2003; 33:518-521

Castleberry RP. Neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997; 33:1430-1437

Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 2009; 10:295-304.

Cetani F, Pinchera A, Pardi E, Cianferotti L, Vignali E, Picone A, Miccoli P, Viacava P, Marcocci C. No evidence for mutations in the calcium-sensing receptor gene in sporadic parathyroid adenomas. *J Bone Miner Res* 1999; 14:878-882

Chakrabarty S, Wang H, Canaff L, Hendy GN, Appelman H, Varani J. Calcium sensing receptor in human colon carcinoma: interaction with Ca (2+) and 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Cancer Res* 2005; 65:493-498

Chattopadhyay N. Effects of calcium-sensing receptor on the secretion of parathyroid hormone-related peptide and its impact on humoral hypercalcemia of malignancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290:E761-E770

Chang W, Tu C, Chen TH, Bikle D, Shoback D. The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development. *Sci Signal* 2008; ra1

Chattopadhyay N, Evliyaoglu C, Heese O, Carroll R, Sanders J, Black P, Brown EM. Regulation of secretion of PTHrP by Ca(2+)-sensing receptor in human astrocytes, astrocytomas, and meningiomas. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279:C691-C699

Chia-Ling T, Chang W, Bikle DD. The extracellular calcium-sensing receptor is required for calcium-induced differentiation in human keratinocytes. *J Biol Chem* 2001; 276:41079-41085

Chikatsu N, Fukumoto S, Takeuchi Y, Suzawa M, Obarai T, Matsumoto T, Fujita T. Cloning and Characterization of Two Promoters for the Human Calcium-sensing Receptor (CaSR) and Changes of CaSR Expression in Parathyroid Adenomas. *J Biol Chem* 2000; 275:7553-7557

Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 2002; 21:5483-5495

Clapier CR, Cairns BR. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* 2009; 78:273-304.

Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 1994; 22:2990-2997

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

Cole DE, Peltekova VD, Rubin LA, Hawker GA, Vieth R, Liew CC, Hwang DM, Evrovski J, Hendy GN. A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor and circulating calcium concentrations. *Lancet* 1999; 353:112-115

Cole DE, Yun FH, Wong BY, Shuen AY, Booth RA, Scillitani A, Pidasheva S, Zhou X, Canaff L, Hendy GN. Calcium-sensing receptor mutations and denaturing high performance liquid chromatography. *J Mol Endocrinol* 2009; 42:331-339

Combaret V, Bréjon S, Iacono I, Schleiermacher G, Pierron G, Ribeiro A, Bergeron C, Marabelle A, Puisieux A. Determination of 17q gain in patients with neuroblastoma by analysis of circulating DNA. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 56:757-761

Cotterman R, Jin VX, Krig SR, Lemen JM, Wey A, Farnham PJ, Knoepfler PS. N-Myc Regulates a Widespread Euchromatic Program in the Human Genome Partially Independent of Its Role as a Classical Transcription Factor. *Cancer Res* 2008; 68:9654-9663

Cowan LA, Talwar S, Yang AS. Will DNA methylation inhibitors work in solid tumors? A review of the clinical experience with azacitidine and decitabine in solid tumors. *Epigenomics* 2010; 2:71-86

Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet* 2001; 29:229-232

Dannenbergh H, Speel EJ, Zhao J, Saremaslani P, van Der Harst E, Roth J, Heitz PU, Bonjer HJ, Dinjens WN, Mooi WJ, Komminoth P, de Krijger RR. Losses of chromosomes 1p and 3q are early genetic events in the development of sporadic pheochromocytomas. *Am J Pathol* 2000; 157:353-359

D'Angio GJ, Evans AE, Koop CE. Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis. *Lancet* 1971; 1:1046-1049

Dawson MA, Kouzarides T. Cancer Epigenetics: From mechanism to therapy. *Cell* 2012; 150:12-27

Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 2012; 26:1010-1022

de Carvalho DD, Sharma S, You JS, Su SF, Taberlay PC, Kelly TK, Yang X, Liang G, Jones PA. DNA methylation screening identifies driver epigenetic events of cancer cell survival. *Cancer Cell* 2012; 21:655-667

de Santis T, Casavola V, Reshkin SJ, Guerra L, Ambruosi B, Fiandanese N, Dalbies-Tran R, Goudet G, Dell'Aquila ME. The extracellular calcium-sensing receptor is expressed in the cumulus-oocyte complex in mammals and modulates oocyte meiotic maturation. *Reproduction* 2009; 138:439-452

de Torres C, Beleta H, Díaz R, Toran N, Rodríguez E, Lavarino C, García I, Acosta S, Suñol M, Mora J. The calcium-sensing receptor and parathyroid hormone-related protein are expressed in differentiated, favorable neuroblastic tumors. *Cancer* 2009; 115:2792-2803

Devilee P, Cleton-Jansen AM, Cornelisse CJ. Ever since Knudson. *Trends Genet* 2001; 17:569-573

Devlin TM. Principio de nutrición II: Micronutrientes. In: *Bioquímica*. Reverté. Barcelona 2004; 135-147

Diaz-Cano SJ. Tumor heterogeneity: Mechanism and bases for reliable application of molecular marker design. *Int J Mol Sci* 2012; 13:1951-2011

Diskin SJ, Capasso M, Schnepf RW, Cole KA, Attiyeh EF, Hou C, Diamond M, Carpenter EL, Winter C, Lee H, Jagannathan J, Latorre V, Iolascon A, Hakonarson H, Devoto M, Maris JM. Common variation at 6q16 within HACE1 and LIN28B influences susceptibility to neuroblastoma. *Nat Genet* 2012; 44:1126-1130

Diskin SJ, Hou C, Glessner JT, Attiyeh EF, Laudenslager M, Bosse K, Cole K, Mossé YP, Wood A, Lynch JE, Pecor K, Diamond M, Winter C, Wang K, Kim C, Geiger EA, McGrady PW, Blakemore AI, London WB, Shaikh TH, Bradfield J, Grant SF, Li H, Devoto M, Rappaport ER, Hakonarson H, Maris JM. Copy number variation at 1q21.1 associated with neuroblastoma. *Nature* 2009; 459:987-991

Dittmer A, Vetter M, Schunke D, Span PN, Sweep F, Thomssen C and Dittmer J. Parathyroid Hormone-related Protein Regulates Tumor-relevant Genes in Breast Cancer Cell. *J Biol Chem* 2006; 281:14563-14572

Dong LM, Ulrich CM, Hsu L, Duggan DJ, Benitez DS, White E, Slattery ML, Caan BJ, Potter JD, Peters U. Genetic Variation in Calcium-Sensing Receptor and Risk for Colon Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17:2755-2765

D'Souza-Li L, Canaff L, Janicic N, Cole DE, Hendy GN. An acceptor splice site mutation in the calcium-sensing receptor (CASR) gene in familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Hum Mutat* 2001; 18:411-421

Dvorak MM, Siddiqua A, Ward DT, Carter DH, Dallas SL, Nemeth EF, Riccardi D. Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:5140-5145

Edsjö A, Holmquist L, Pählman S. Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. *Semin Cancer Biol* 2007; 17:248-256

El Osta A, Kantharidis P, Zalberg JR, Wolffe AP. Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation. *Mol Cell Biol* 2002; 22:1844-1857

Erichsen HC, Chanock SJ. SNPs in cancer research and treatment. *Br J Cancer* 2004; 90:747-751

Espada J, Esteller M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21:238-246

Esteller M. Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med* 2008; 358:1148-1159

Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* 2007; 96:R26-30

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007b; 8:286-298

Evans AE, D'Angio GJ, Randolph J. A proposed staging for children with neuroblastoma. *Children's cancer study group A. Cancer* 1971; 27:374-378

Evans AE, D'Angio GJ. Age at Diagnosis and Prognosis in Children With Neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2005; 23:6443-6444

Finney B, Wilkinson WJ, Searchfield L, Cole M, Bailey S, Kemp PJ, Riccardi D. An exon 5-less splice variant of the extracellular calcium-sensing receptor rescues absence of the full-length receptor in the developing mouse lung. *Exp Lung Res* 2011; 37:269-278

Fisher JP, Tweddle DA. Neonatal neuroblastoma. *Sem Fetal Neonat Med* 2012; 17:207-215

Fix A, Lucchesi C, Ribeiro A, Lequin D, Pierron G, Schleiermacher G, Delattre O, Janoueix-Lerosey I. Characterization of amplicons in neuroblastoma: high-resolution mapping using DNA microarrays, relationship with outcome, and identification of overexpressed genes. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47:819-834

Fraga MF, Berdasco M, Ballestar E, Ropero S, Lopez-Nieva P, Lopez-Serra L, Martín-Subero JI, Calasanz MJ, Lopez de Silanes I, Setien F, Casado S, Fernandez AF, Siebert R, Stifani S, Esteller M. Epigenetic inactivation of the Groucho homologue gene TLE1 in hematologic malignancies. *Cancer Res* 2008; 68:4116-4122

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:1827-1831

Fulda S, Küfer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 2001; 20:5865-5877

Furuichi Y, Wataya Y, Hayatsu H, Ukita T. Chemical modification of tRNA-Tyr-yeast with bisulfite. A new method to modify isopentenyladenosine residue. *Biochem Biophys Res Commun* 1970; 41:1185-1191

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; 296:2225-2229

Gama L, Wilt SG, Breitwieser GE. Heterodimerization of calcium sensing receptors with metabotropic glutamate receptors in neurons. *J Biol Chem* 2001; 276:39053-39059

Garcia I, Mayol G, Ríos J, Domenech G, Cheung NK, Oberthuer A, Fischer M, Maris JM, Brodeur GM, Hero B, Rodríguez E, Suñol M, Galvan P, de Torres C, Mora J, Lavarino C. A three-gene expression signature model for risk stratification of patients with neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18:2012-2023

Garrett JE, Capuano IV, Hammerland LG, Hung BC, Brown EM, Hebert SC, Nemeth EF, Fuller F. Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. *Biol Chem* 1995; 270:12919-12925

Gatta G, Ferrari A, Stiller CA, Pastore G, Bisogno G, Trama A, Capacoccia R. Embryonal cancers in Europe. *Eur J Cancer* 2012; 48:1425-1433

Geiger K, Hagenbuchner J, Rupp M, Fiegl H, Sergi C, Meister B, Kiechl-Kohlendorfer U, Müller T, Ausserlechner MJ, Obexer P. FOXO3/FKHRL1 is activated by 5-aza-2-deoxycytidine and induces silenced caspase-8 in neuroblastoma. *Mol Biol Cell* 2012; 23:2226-2234

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012; 366:883-892

Gessi M, Monego G, Calviello G, Lanza P, Giangaspero F, Silvestrini A, Lauriola L, Ranelletti FO. Human parathyroid hormone-related protein and human parathyroid hormone receptor type 1 are expressed in human medulloblastomas and regulate cell proliferation and apoptosis in medulloblastoma-derived cell lines. *Acta Neuropathol* 2007; 114:135-145

Gherardi S, Valli E, Erriquez D, Perini G. MYCN-mediated transcriptional repression in neuroblastoma: the other side of the coin. *Front Oncol* 2013; 3:42

Gisselsson D, Pettersson L, Höglund M, Heidenblad M, Gorunova L, Wiegant J, Mertens F, Dal Cin P, Mitelman F, Mandahl N. Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:5357-5362

Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2005; 74:481

Gordon DJ, Resio B, Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genetics* 2012; 13:189-203

Grimm S. The art and design of genetic screens: mammalian culture cells. *Nature Rev Gen* 2004; 5:179-189

Guccione E, Martinato F, Finocchiaro G, Luzi L, Tizzoni L, Dall' Olio V, Zardo G, Nervi C, Bernard L, Amati B. Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat Cell Biol* 2006; 8:764-770

Haber D, Harlow E. Tumour-suppressor genes: evolving definitions in the genomic age. *Nat Genet* 1997; 16:320-332

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-674

Harding B, Curley AJ, Hannan FM, Christie PT, Bowl MR, Turner JJ, Barber M, Gillham-Naseny I, Hampson G, Spector TD, Thakker RV. Functional characterization of calcium sensing receptor polymorphisms and absence of association with indices of calcium homeostasis and bone mineral density. *Clin Endocrinol* 2006; 65:598-605

Hatton BA, Knoepfler PS, Kenney AM, Rowitch DH, de Alborán IM, Olson JM, Eisenman RN. N-myc is an essential downstream effector of Shh signaling during both normal and neoplastic cerebellar growth. *Cancer Res* 2006; 66:8655-8661

Hayashi Y, Kanda N, Inaba T, Hanada R, Naghara N, Muchi H, Yamamoto K. Cytogenetic findings and prognosis in neuroblastoma with emphasis on marker chromosome 1. *Cancer* 1989; 63:126-132

He Y, Han L, Li W, Shu X, Zhao C, He Y, Bi M, Li Y, Sun C. Effects of the calcium-sensing receptor A986S polymorphism on serum calcium and parathyroid hormone levels in healthy individuals: a meta-analysis. *Gene* 2012; 491:110-115

He S, Liu Z, Oh DY, Thiele CJ. MYCN and the epigenome. *Front Oncol* 2013; 3:1-9

Heath H 3rd, Odelberg S, Jackson CE, Teh BT, Hayward N, Larsson C, Buist NR, Krapcho KJ, Hung BC, Capuano IV, Garrett JE, Leppert MF. Clustered inactivating mutations and benign polymorphisms of the calcium receptor gene in familial benign hypocalciuric hypercalcemia suggest receptor functional domains. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1312-1317

Hebert SC, Cheng S, Geibel J. Functions and roles of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor in the gastrointestinal tract. *Cell Calcium* 2004; 35:239-247

Heim S, Mitelman F. Primary chromosome abnormalities in human neoplasia. *Adv Cancer Res* 1989; 52:1-43

Hendy GN, D'Souza-Li L, Yang B, Canaff L, Cole DE. Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum Mutat* 2000; 16:281-296

Heng HH, Liu G, Bremer S, Ye KJ, Stevens J, Ye CJ. Clonal and non-clonal chromosome aberrations and genome variation and aberration. *Genome* 2006; 49:195-204

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

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:9821-9826

Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl Med* 2003; 349:2042-2054

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; 430:797-802

Hervouet E, Vallette FM, Cartron PF. Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics* 2009; 4:487-499

Hibler EA, Hu C, Jurutka PW, Martinez ME, Jacobs ET. Polymorphic variation in the GC and CASR genes and associations with vitamin D metabolite concentration and metachronous colorectal neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21:368-375

Hill WG, Robertson A. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor Appl Genet* 1968; 38:226-231

Hizaki K, Yamamoto H, Taniguchi H, Adachi Y, Nakazawa M, Tanuma T, Kato N, Sukawa Y, Sanchez JV, Suzuki H, Sasaki S, Imai K, Shinomura Y. Epigenetic inactivation of calcium-sensing receptor in colorectal carcinogenesis. *Mod Pathol* 2011; 24:876-884

Hobson SA, Wright J, Lee F, McNeil SE, Bilderback T, Rodland KD. Activation of the MAP kinase cascade by exogenous calcium-sensing receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 200:189-198

Ho C, Conner DA, Pollak MR, Ladd DJ, Kifor O, Warren HB, Brown EM, Seidman JG, Seidman CE. A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Nat Genet* 1995; 11:389-94

Hoehner JC, Hedborg F, Eriksson L, Sandstedt B, Grimelius L, Olsen L, Pählman S. Developmental gene expression of sympathetic nervous system tumors reflects their histogenesis. *Lab Invest* 1998; 78:29-45

Hoehner JC, Olsen L, Sandstedt B, Kaplan DR, Pählman S. Association of neurotrophin receptor expression and differentiation in human neuroblastoma. *Am J Pathol* 1995; 147:102-113

Hofer AM, Brown EM. Extracellular calcium sensing and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:530-538

Hosokawa Y, Pollak MR, Brown EM, Arnold A. Mutational analysis of the extracellular Ca(2+)-sensing receptor gene in human parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3107-3110

Howman-Giles R, Shaw PJ, Uren, Chung DKV. Neuroblastoma and other neuroendocrine tumours. *Semin Nucl Med* 2007; 37:286-302

Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev* 2008; 129:391-407

Hu J, McLarnon SJ, Mora S, Jiang J, Thomas C, Jacobson KA, Spiegel AM. A region in the seven-transmembrane domain of the human Ca²⁺ receptor critical for response to Ca²⁺. *J Biol Chem* 2005; 280:5113-5120

Huang C, Hujer KM, Wu Z, Miller RT. The Ca₂₊-sensing receptor couples to G_{α(12/13)} to activate phospholipase D in Madin-Darby canine kidney cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286:C22-C30

Huang C, Wu Z, Hujer KM, Miller RT. Silencing of filamin A gene expression inhibits Ca²-sensing receptor signaling. *FEBS Lett* 2006; 580:1795-1800

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

Hurtubise A, Bernstein ML, Momparler RL. Preclinical evaluation of the antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and different histone deacetylase inhibitors on human Ewing's sarcoma cells. *Cancer Cell Int* 2008, 8:16

Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:988-993

International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003; 426:789-796

Jacobs ET, Martínez ME, Campbell PT, Conti DV, Duggan D, Figueiredo JC, Haile RW, LeRoy EC, Poynter JN, Thompson PA, Baron JA. Genetic variation in the retinoid X receptor and calcium-sensing receptor and risk of colorectal cancer in the Colon Cancer Family Registry. *Carcinogenesis* 2010; 31:1412-1416

Janicic N, Soliman E, Pausova Z, Seldin MF, Rivière M, Szpirer J, Szpirer C, Hendy GN. Mapping of the calcium-sensing receptor gene (CASR) to human chromosome 3q13.3-21 by fluorescence in situ hybridization, and localization to rat chromosome 11 and mouse chromosome 16. *Mamm Genome* 1995; 6:798-801

Jensen AA, Greenwood JR, Bräuner-Osborne H. The dance of the clams: twists and turns in the family C GPCR homodimer. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23:491-493

Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128:683-692

Journé F, Dumon JC, Kheddoumi N, Fox J, Laïos I, Leclercq G, Body JJ. Extracellular calcium downregulates estrogen receptor alpha and increases its transcriptional activity through calcium-sensing receptor in breast cancer cells. *Bone* 2004; 35:479-88

Justinich CJ, Mak N, Pacheco I, Mulder D, Wells RW, Blennerhassett MG, MacLeod RJ. The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) on human esophagus and evidence of expression of the CaSR on the esophageal epithelial cell line (HET-1A). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294:G120-G129

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

Kallay E, Bajna E, Wrba F, Kriwanek S, Peterlik M, Cross HS. Dietary calcium and growth modulation of human colon cancer cells: role of the extracellular calcium-sensing Receptor. *Cancer Detect Prev* 2000; 24:127-136

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258:818-821

Kantarjian HM, Issa JP. Decitabine dosing schedules. *Semin Hematol* 2005; 42:S17-S22

Kantham L, Quinn SJ, Egbuna OI, Baxi K, Butters R, Pang J, Pollak MR, Goltzman D, Brown EM. The calcium-sensing receptor (CaSR) defends against hypercalcemia independent of its regulation of parathyroid hormone secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297:E915-E923

Kaneko Y, Cohn SL. Ploidy and cytogenetics of neuroblastoma. In: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA (ed). *Neuroblastoma*. Elsevier Science. Amsterdam 2000; 41-56

Kapur K, Johnson T, Beckmann ND, Sehmi J, Tanaka T, Kutalik Z, Styrkarsdottir U, Zhang W, Marek D, Gudbjartsson DF, Milaneschi Y, Holm H, Diiorio A, Waterworth D, Li Y, Singleton AB, Bjornsdottir US, Sigurdsson G, Hernandez DG, Desilva R, Elliott P, Eyjolfsson GI, Guralnik JM, Scott J, Thorsteinsdottir U, Bandinelli S, Chambers J, Stefansson K, Waeber G, Ferrucci L, Kooner JS, Mooser V, Vollenweider P, Beckmann JS, Bochud M, Bergmann S. Genome-wide meta-analysis for serum calcium identifies significantly associated SNPs near the calcium-sensing receptor (CASR) gene. *PLOS Genet* 2010; 6:e1001035

Kifor O, MacLeod RJ, Diaz R, Bai M, Yamaguchi T, Yao T, Kifor I, Brown EM. Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280:F291-F302

Kilpatrick SE, Teot LA, Geisinger KR, Martin PL, Schumate DK, Zbieranski N, Russell GB, Fletcher CD. Relationship of DNA ploidy to histology and prognosis in rhabdomyosarcoma. *Cancer* 1994; 74:3227-3233

Kim TY, Bang YJ, Robertson KD. Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy. *Epigenetics* 2006; 1:14-23

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68:820-823

Kushner BH. Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies. *J Nucl Med* 2004; 45:1172-1188

Lagmay JP, London WB, Gross TG, Termuhlen A, Sullivan N, Axel A, Mundy B, Ranalli M, Canner J, McGrady P, Hall B. Prognostic significance of interleukin-6 single nucleotide polymorphism genotypes in neuroblastoma: rs1800795 (promoter) and rs8192284 (receptor). *Clin Cancer Res* 2009; 15:5234-5239

Lam BS, Cunningham C, Adams GB. Pharmacologic modulation of the calcium-sensing receptor enhances hematopoietic stem cell lodgement in the adult bone marrow. *Blood* 2011; 117:1167-1175

Lazarus S, Pretorius CJ, Khafagi F, Campion KL, Brennan SC, Conigrave AD, Brown EM, Ward DT. A novel mutation of the primary protein kinase C phosphorylation site in the calcium-sensing receptor causes autosomal dominant hypocalcemia. *Eur J Endocrinol* 2011; 164:429-435

Lastowska M, Cotterill S, Pearson AD, Roberts P, McGuckin A, Lewis I, Bown N. Gain of chromosome arm 17q predicts unfavourable outcome in neuroblastoma patients. U.K. Children's Cancer Study Group and the U.K. Cancer Cytogenetics Group. *Eur J Cancer* 1997; 33:1627-1633

Lawor ER, Thiele CJ. Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets. *Clin Cancer Res* 2012; 18:2768-2779

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396:643-649

Li S, Huang S, Peng SB. Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: involvement in tumor progression. *Int J Oncol* 2005; 27:1329-1339

Liao J, McCauley LK. Skeletal metastasis: Established and emerging roles of parathyroid hormone related protein (PTHrP). *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25:559-571

Light JE, Koyama H, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Mangino JL, Kolla V, London WB, Brodeur GM. Clinical significance of NTRK family gene expression in neuroblastomas. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59:226-232

Liu Z, Yang X, Li Z, McMahon C, Sizer C, Barenboim-Stapleton L, Bliskovsky V, Mock B, Ried T, London WB, Maris J, Khan J, Thiele CJ. CASZ1, a candidate tumor-suppressor gene, suppresses neuroblastoma tumor growth through reprogramming gene expression. *Cell Death Differ* 2011; 18:1174-1183

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Mutations: Types and Causes. In: Freeman WH (ed). *Molecular Cell Biology*. New York 2000; 352-361

Lundeberg G, Rosengren AH, Håkanson U, Stewénus H, Jin Y, Stewénus Y, Pählman S, Gisselsson D. Binomial mitotic segregation of MYCN-carrying double minutes in neuroblastoma illustrates the role of randomness in oncogene amplification. *PLoS ONE* 2008; 3:e3099

Magno AL, Ward BK, Ratajczak T. The calcium-sensing receptor: a molecular perspective. *Endocr Rev* 2011; 32:3-30

Mamillapalli R, VanHouten J, Zawalich W and Wysolmerski J. Switching of G-protein usage by the calcium-sensing receptor reverses its effect on parathyroid hormone-related protein secretion in normal versus malignant breast cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 24435-24447

Manhani R, Cristofani LM, Odone Filho V, Bendit I. Concomitant p53 mutation and MYCN amplification in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 1997; 29:206-207

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

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

Maris JM, Mosse YP, Bradfield JP, Hou C, Monni S, Scott RH, Asgharzadeh S, Attiyeh EF, Diskin SJ, Laudenslager M, Winter C, Cole KA, Glessner JT, Kim C, Frackelton EC, Casalunovo T, Eckert AW, Capasso M, Rappaport EF, McConville C, London WB, Seeger RC, Rahman N, Devoto M, Grant SF, Li H, Hakonarson H. Chromosome 6p22 locus associated with clinically aggressive neuroblastoma. *N Engl J Med* 2008 12; 358:2585-2593

März W, Seelhorst U, Wellnitz B, Tiran B, Obermayer-Pietsch B, Renner W, Boehm BO, Ritz E, Hoffmann MM. Alanine to serine polymorphism at position 986 of the calcium-sensing receptor associated with coronary heart disease, myocardial infarction, all-cause, and cardiovascular mortality. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:2363-2369

Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, Haas-Kogan D, Gerbing RB, London WB, Villablanca JG. Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J Clin Oncol* 2009; 27:1007-1013

McLarnon S, Holden D, Ward D, Jones M, Elliott A, Riccardi D. Aminoglycoside antibiotics induce pH sensitive activation of the calcium-sensing receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297:71-77

McNeish IA, Bell SJ, Lemoine NR. Gene therapy progress and prospects: cancer gene therapy using tumour suppressor genes. *Gene Ther* 2004; 11:497-503

Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 2007; 26:3227-39

Miedlich S, Lamesch P, Mueller A, Paschke R. Frequency of the calcium-sensing receptor variant A986S in patients with primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 2001; 145:421-427

Miettinen M, Chatten J, Paetau A, Stevenson A. Monoclonal antibody NB84 in the differential diagnosis of neuroblastoma and other small round cell tumors. *Am J Surg Pathol* 1998; 22:327-332

Mizobuchi M, Ritter CS, Krits I, Slatopolsky E, Sicard G, Brown AJ. Calcium-sensing receptor expression is regulated by glial cells missing-2 in human parathyroid cells. *J Bone Miner Res* 2009; 24:1173-1179

Mora J, Cheung NK, Kushner BH, LaQuaglia MP, Kramer K, Fazzari M, Heller G, Chen L and Gerald WL. LOH on chromosome arm 1p correlates with clinical categories of neuroblastoma. *J Mol Diagn* 2000; 2:37-46

Mora J, Gerald WL. The origin of neuroblastic tumors: clues for future therapeutics. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4:293-302

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; 6:263-268

Mora J, Cruz O, Morales L. Tumores neuroblásticos. In: Cruz M (ed). Neuroblastoma. Tratado de pediatría 9ª ed. Ergon. Madrid 2006

Moreau LA, McGrady P, London WB, Shimada H, Cohn SL, Maris JM, Diller L, Look AT, George RE. Does MYCN amplification manifested as homogeneously staining regions at diagnosis predict a worse outcome in children with neuroblastoma? A Children's Oncology Group study. Clin Cancer Res 2006; 12:5693-5697

Mosammaparast N, Shi Y. Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. Annu Rev Biochem 2010; 79:155-179

Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D, Carisle AJ, Winter CL, Rapport E, Maris JM. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. Am J Hum Genet 2004; 75:727-730

Mühlethaler-Mottet A, Meier R, Flahaut M, Bourlout KB, Nardou K, Joseph JM, Gross N. Complex molecular mechanisms cooperate to mediate histone deacetylase inhibitors anti-tumour activity in neuroblastoma cells. Mol Cancer 2008; 7:55

Murphy DM, Buckley PG, Bryan K, Das S, Alcock L, Foley NH, Prenter S, Bray I, Watters KM, Higgins D, Stallings RL. Global MYCN transcription factor binding analysis in neuroblastoma reveals association with distinct E-box motifs and regions of DNA hypermethylation. PLoS One 2009; 4:e8154

Nair SS, Kumar R. Chromatin remodeling in cancer: a gateway to regulate gene transcription. Mol Oncol 2012; 6:611-619

Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. N Engl J Med 1993; 328:847-854

Nemeth EF, Heaton WH, Miller M, Fox J, Balandrin MF, Van Wagenen BC, Colloton M, Karbon W, Scherrer J, Shatzen E, Rishton G, Scully S, Qi M, Harris R, Lacey D, Martin D. Pharmacodynamics of the type II calcimimetic compound cinacalcet HCl. J Pharmacol Exp Ther 2004; 308:627-35

Nguyen le B, Diskin SJ, Capasso M, Wang K, Diamond MA, Glessner J, Kim C, Attiyeh EF, Mosse YP, Cole K, Iolascon A, Devoto M, Hakonarson H, Li HK, Maris JM. Phenotype restricted genome-wide association study using a gene-centric approach identifies three low-risk neuroblastoma susceptibility Loci. PLoS Genet 2011; 7:e1002026

Oda Y, TuCL, Pillai S, Bikle DD. The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 1998; 273:23344-23352

Okawa ER, Gotoh T, Manne J, Igarashi J, Fujita T, Silverman KA, Xhao H, Mosse YP, White PS, Brodeur GM. Expression and sequence analysis of candidates for the 1p36.31 tumor suppressor gene deleted in neuroblastomas. *Oncogene* 2007; 27:803-810

Onken MD, Worley LA, Person E, Char DH, Bowcock AM, Harbour JW. Loss of heterozygosity of chromosome 3 detected with single nucleotide polymorphisms is superior to monosomy 3 for predicting metastasis in uveal melanoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13:2923-7

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

Peters U, Chatterjee N, Yeager M, Chanock SJ, Schoen RE, McGlynn KA, Church TR, Weissfeld JL, Schatzkin A, Hayes RB. Association of genetic variants in the calcium-sensing receptor with risk of colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13:2181-2186

Pellicer A, Robins D, Wold B, Sweet R, Jackson J, Lowy I, Roberts JM, Sim GK, Silverstein S, Axel R. Altering genotype and phenotype by DNA-mediated gene transfer. *Science* 1980; 209:1414-1422

Peuchmaur M, d'Amore ES, Joshi VV, Hata J, Roald B, Dehner LP, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK, Shimada H. Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* 2003; 98:2274-2281

Pidasheva S, D'Souza-Li L, Canaff L, Cole DE, Hendy GN. CASRdb: calcium-sensing receptor locus-specific database for mutations causing familial (benign) hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum Mutat* 2004; 24:107-111

Pikaard CS. Methylating the DNA of the most repressed: special access required. *Mol Cell* 2013; 49:1021-1022

Pollak MR, Brown EM, Chou YH, Hebert SC, Marx SJ, Steinmann B, Levi T, Seidman CE, Seidman JG. Mutations in the human Ca(2+)-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell* 1993; 75:1297-1303

Prochazka P, Hrabeta J, Vícha A, Eckschlager T. Expulsion of amplified MYCN from homogenously staining chromosomal regions in neuroblastoma cell lines after cultivation with cisplatin, doxorubicin, hydroxyurea, and vincristine. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 196:96-104

Pui CH, Raimondi SC, Dodge RK, Rivera GK, Fuchs LA, Abromowitch M, Look AT, Furman WL, Crist WM and Williams DL. Prognostic importance of structural chromosomal abnormalities in children with hyperdiploid (>50 chromosomes) acute lymphoblastic leukaemia. *Blood* 1989; 73:1963-1967

Quinn SJ, Ye CP, Diaz R, Kifor O, Bai M, Vassilev P, Brown E. The Ca²⁺ sensing receptor: a target for polyamines. *Am J Physiol* 1997; 273:C1315-C1323

Quinn SJ, Bai M, Brown EM. pH sensing by the calcium-sensing receptor. *J Biol Chem* 2004; 279:37241-37249

Ray K, Clapp P, Goldsmith PK, Spiegel AM. Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction. *J Biol Chem* 1998; 273:34558-34567

Rey O, Young SH, Jacamo R, Moyer MP, Rozengurt E. Extracellular calcium sensing receptor stimulation in human colonic epithelial cells induces intracellular calcium oscillations and proliferation inhibition. *J Cel Physiol* 2010; 225:73-83

Rey O, Young SH, Yuan J, Slice L, Rozengurt E. Amino acid-stimulated Ca²⁺ oscillations produced by the Ca²⁺-sensing receptor are mediated by a phospholipase C/inositol 1,4,5-trisphosphate-independent pathway that requires G12, Rho, filamin-A, and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 2005; 280:22875-22882

Riccardi D. Cell surface, ion-sensing receptors. *Exp Physiol* 2002; 87:403-411

Riccardi D, Brown EM. Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298:F485-F499

Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000; 405:847-856

Roderick HL, Cook SJ. Ca²⁺ signaling checkpoints in cancer: remodeling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:361-375

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

Rodriguez L, Tu C, Cheng Z, Chen TH, Bikle D, Shoback D, Chang W. Expression and functional assessment of an alternatively spliced extracellular Ca²⁺-sensing receptor in growth plate chondrocytes. *Endocrinology* 2005; 146:5294-5303

Romoli R, Lania A, Mantovani G, Corbetta S, Persani L, Spada A. Expression of calcium-sensing receptor and characterization of intracellular signaling in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2848-2853

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; 8:35-39

Ross RA, Hein AM, Braca JA 3rd, Spengler BA, Biedler JL, Scammell JG. Glucocorticoids induce neuroendocrine cell differentiation and increase expression of N-myc in N-type human neuroblastoma cells. *Oncol Res* 2002; 13:87-94

Ross RA, Spengler BA. Human neuroblastoma stem cells. *Semin Cancer Biol* 2007; 17:241-247

Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1983; 71:741-747

Rothenberg AB, Berdon WE, D'Angio GJ, Yamashiro DJ, Cowles RA. Neuroblastoma: remembering the three physicians who described it a century ago: James Homer Wright, William Pepper, and Robert Hutchison. *Pediatr Radiol* 2009; 39:155-160

Russo J, Mills MJ, Moussalli MJ, Russo IH. Influence of human breast development on the growth properties of primary cultures. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989; 25:643-649

Saidak Z, Mentaverri R, Brown EM. The role of the calcium-sensing receptor in the development and progression of cancer. *Endocr Reviews* 2009; 30:178-195

Savas S, Liu G. Genetic variations as cancer prognostic markers: review and update. *Hum Mutat* 2009; 30:1369-1377

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

Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Fehse N, Hero B, Klein G, Sander J, Schwarz K, Treuner J, Zorn U, Michaelis J. Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med* 2002; 346:1047-1053

Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 2003; 4:472-480

Schwartz GG, John EM, Rowland G, Ingles SA. Prostate cancer in African-American men and polymorphism in the calcium-sensing receptor. *Cancer Biol Ther* 2010; 9:994-999

Scillitani A, Guarnieri V, De Geronimo S, Muscarella LA, Battista C, D'Agruma L, Bertoldo F, Florio C, Minisola S, Hendy GN, Cole DE. Blood ionized calcium is associated with clustered polymorphisms in the carboxyl-terminal tail of the calcium-sensing receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:5634-8

Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985; 313:1111-1116

Sergeev IN. Calcium signalling in cancer and vitamin D. *J Ster Biochem Mol Biol* 2005; 97:145-151

Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31:27-36

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

Shimada H, Chatten J, Newton WA Jr, Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, Marsden HB, Misugi K. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 1984; 73:405-16

Shimada H, Roald B. Histology: tumors of the neuroblastoma group. In Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute PA (ed). *Neuroblastoma*. Elsevier Science. Amsterdam 2000; 341-354

Shimada H, Umehara S, Monobe Y, Hachitanda Y, Nakagawa A, Goto S, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 2001; 92:2451-2461.

Shui IM, Mucci LA, Wilson KM, Kraft P, Penney KL, Stampfer MJ, Giovannucci E. Common genetic variation of the calcium sensing receptor and lethal prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; 22:118-126

Sidell N, Altman A, Hassler MR, Seeger RC. Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res* 1983; 148:21-30

Smajilovic S, Tfelt-Hansen J. Calcium acts as a first messenger through the calcium-sensing receptor in the cardiovascular system. *Cardio Res* 2007; 75:457-467

Solé, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006; 22:1928-1929

Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Watts C, Tavaré S. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110:4009-4014

Soufi A, Donahue G, Zaret KS. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* 2012; 151:994-1004

Southern PJ, Berg P. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* 1982; 1:327-341

Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: Blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Rev Gen* 2005; 6:782-792

Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F. Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9:52-8

Sun YH, Liu MN, Li H, Shi S, Zhao YJ, Wang R, Xu CQ. Calcium-sensing receptor induces rat neonatal ventricular cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 350:942-948

Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall RE, Hammonds RG, Moseley JM, Diefenbach-Jagger H, Rodda CP, Kemp BE, Rodríguez H, Chen EY, et al. A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. *Science* 1987; 237:893-896

Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2000; 6:529-535

Tfelt-Hansen J, Hansen JL, Smajilovic S, Terwilliger EF, Haunso S, Sheikh SP. Calcium receptor is functionally expressed in rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290:H1165–H1171

Tfelt-Hansen J, MacLeod RJ, Chattopadhyay N, Yano S, Quinn S, Ren X, Terwilliger EF, Schwarz P, Brown EM. Calcium-sensing receptor stimulates PTHrP release by pathways dependent on PKC, p38 MAPK, JNK, and ERK1/2 in H-500 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:E329-337

Trent R. Genetic Changes in Cancer. *Cancer Facts*. In: Bishop J. Harwood Academic Publishers. The Neetherlands 1999; 4:17-21

Trivedi R, Mithal A, Chattopadhyay N. Recent up-dates on the calcium-sensing receptor as a drug target. *Curr Med Chem* 2008; 15:178–186

Tu CL, Chang W, Bikle DD. The extracellular calcium-sensing receptor is required for calcium-induced differentiation in human keratinocytes. *J Biol Chem* 2001; 276:41079-41085

Van Devanter DR, Piaskowski VD, Casper JT, Douglass EC and Von Hoff DD. Ability of circular extrachromosomal DNA molecules to carry amplified MYCN proto-oncogenes in human neuroblastomas in vivo. *J Nat Cancer Inst* 1990; 23:1815-1821

VanHouten J, Dann P, McGeoch G, Brown EM, Krapcho, K, Neville M, Wysolmerski JJ. The calcium-sensing receptor regulates mammary gland parathyroid hormone-related protein production and calcium transport. *J Clin Invest* 2004; 113:598–608

van Noesel MM. Neuroblastoma stage 4S: a multifocal stem-cell disease of the developing neural crest. *Lancet Oncol* 2012; 13:229-230

Van Noesel MM, Hählen K, Hakvoort-Cammel FG, Egeler RM. Neuroblastoma 4S: a heterogeneous disease with variable risk factors and treatment strategies. *Cancer* 1997; 80:834-43.

van Noesel MM, van Bezouw S, Voûte PA, Herman JG, Pieters R, Versteeg R. Clustering of hypermethylated genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 38:226-233

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

Varani J. Calcium, calcium-sensing receptor and growth control in the colonic mucosa. *Histol Histopathol* 2011; 26: 769-77

Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T, Gambaro G, Milanesi L, Mosca E, Soldati L. Calcium kidney stones are associated with haplotype of the calcium-sensing receptor gene regulatory region. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25:2245-2252

Vezzoli G, Scillitani A, Corbetta S, Terranegra A, Dogliotti E, Guarnieri V, Arcidiacono T, Paloschi V, Rainone F, Eller-Vainicher C, Borghi L, Nouvenne A, Guerra A, Meschi T, Allegri F, Cusi D, Spada A, Cole DE, Hendy GN, Spotti D, Soldati L. Polymorphisms at the regulatory regions of the CASR gene influence stone risk in primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 2011; 164:421-427

Vezzoli G, Terranegra A, Soldati L. Calcium-sensing receptor gene polymorphisms in patients with calcium nephrolithiasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012; 21:355-361

Virchow R. Hiperplasia Der Zirbel un der Nebennieren Die Krankhaften Geschwulste 1858; 11:149-150

Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10:789-99

Walton JD, Kattan DR, Thomas SK, Spengler BA, Guo HF, Biedler JL, Cheung NK, Ross RA. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia* 2004; 6:838-845

Wang K, Diskin SJ, Zhang H, Attiyeh EF, Winter C, Hou C, Schnepf RW, Diamond M, Bosse K, Mayes PA, Glessner J, Kim C, Frackelton E, Garris M, Wang Q, Glaberson W, Chiavacci R, Nguyen L, Jagannathan J, Saeki N, Sasaki H, Grant SF, Iolascon A, Mosse YP, Cole KA, Li H, Devoto M, McGrady PW, London WB, Capasso M, Rahman N, Hakonarson H, Maris JM. Integrative genomics identifies LMO1 as a neuroblastoma oncogene. *Nature* 2011; 469:216-220

Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour* 1942; 1:18-20

Ward DT. Calcium receptor-mediated intracellular signalling. *Cell Calcium* 2004; 35:217-228

Ward DT, Riccardi D. New concepts in calcium-sensing receptor pharmacology and signaling. *Br J Pharmacol* 2012; 165:35-48

Wellendorph P, Bräuner-Osborne H. Molecular basis for amino acid sensing by family C G-protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 2009; 156:869-884

Wellendorph P, Johansen LD, Bräuner-Osborne H. The emerging role of promiscuous 7TM receptors as chemosensors for food intake. *Vitam Horm* 2010; 84:151-184

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

Wilkins K, LaFramboise T. Losing balance: Hardy-Weinberg disequilibrium as a marker for recurrent loss-of-heterozygosity in cancer. *Hum Mol Genet* 2011; 20:4831-4839

Witteveen JE, Hamdy NA, Dekkers OM, Kievit J, van Wezel T, Teh BT, Romijn JA, Morreau H. Downregulation of CASR expression and global loss of parafibromin staining are strong negative determinants of prognosis in parathyroid carcinoma. *Mod Pathol* 2011; 24:688-697

Wolf M, Korja M, Karhu R, Edgren H, Kilpinen S, Ojala K, Mouses S, Kallioniemi A, Haapasalo H. Array-based gene expression, CGH and tissue data defines a 12q24 gain in neuroblastic tumors with prognostic implication. *BMC Cancer* 2010; 10:181

Wood MA, McMahon SB, Cole MD. An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol Cell* 2000; 5:321-30.

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

Wurm, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnol* 2004; 22:1393-1398.

Xing WJ, Kong FJ, Li GW, Qiao K, Zhang WH, Zhang L, Bai SZ, Xi YH, Li HX, Tian Y, Ren H, Wu LY, Wang R, Xu CQ. Calcium-sensing receptors induce apoptosis during simulated ischaemia-reperfusion in Buffalo rat liver cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38:605-612

Yadav AK, Renfrow JJ, Scholtens DM, Xie H, Duran GE, Bredel C, Vogel H, Chandler JP, Chakravarti A, Robe PA, Das S, Scheck AC, Kessler JA, Soares MB, Sikic BI, Harsh GR, Bredel M. Monosomy of chromosome 10 associated with dysregulation of epidermal growth factor signaling in glioblastomas. *JAMA* 2009; 302:276-289

Yang Q, Tian Y, Ostler KR, Chlenski A, Guerrero LJ, Salwen HR, Godley LA, Cohn S. Epigenetic alterations differ in phenotypically distinct human neuroblastoma cell lines. *BMC Cancer* 2010; 10:286

Yano S, Macleod RJ, Chattopadhyay N, Tfelt-Hansen J, Kifor O, Butters RR, Brown EM. Calcium-sensing receptor activation stimulates parathyroid hormone-related protein secretion in prostate cancer cells: role of epidermal growth factor receptor transactivation. *Bone* 2004; 35:664-672

Yano S, Sugimoto T, Tsukamoto T, Chihara K, Kobayashi A, Kitazawa S, Maeda S, Kitazawa R. Decrease in vitamin D receptor and calcium-sensing receptor in highly proliferative parathyroid adenomas. *Eur J Endocrinol* 2003; 148:403-411

Ye CJ, Stevens JB, Liu G, Bremer SW, Jaiswal AS, Ye KJ, Lin MF, Lawrenson L, Lancaster WD, Kurkinen M, Liao JD, Gairola CG, Shekhar MP, Narayan S, Miller FR, Heng HH. Genome based cell population heterogeneity promotes tumorigenicity: the evolutionary mechanism of cancer. *J Cell Physiol* 2009; 219:288-300

Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 1990; 265:17174-17179

Yun FH, Wong BY, Chase M, Shuen AY, Canaff L, Thongthai K, Siminovitch K, Hendy GN, Cole DE. Genetic variation at the calcium-sensing receptor (CASR) locus: implications for clinical molecular diagnostics. *Clin Biochem* 2007; 40:551-561

Young SH, Rozengurt E. Amino acids and Ca²⁺ stimulate different patterns of Ca²⁺ oscillations through the Ca²⁺-sensing receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282:C1414-1422

Zhang M, Breitwieser GE. High affinity interaction with filamin A protects against calcium-sensing receptor degradation. *J Biol Chem* 2005; 280:11140-11146

Zhang Z, Sun S, Quinn SJ, Brown EM, Bai M. The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *J Biol Chem* 2001; 276:5316-5322

Zhu WG, Otterson GA. The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003; 3:187-199

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

ABREVIATURAS

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- AMPc:** Adenosín monofosfato-3',5' cíclico.
- AMSH:** Molécula asociada a SH3.
- ALK:** *Anaplastic Lymphoma Kinase*.
- ARN:** Ácido ribonucleico.
- ARNm:** ARN mensajero.
- Aza:** 5-Aza-2'-desoxicitidina.
- BARD1:** *BRCA-1-associated RING domain-1*
- bHLH:** *Basic Helix-loop-helix*.
- BLU:** *Zinc finger, MYND-type containing 10*.
- BSP:** PCR específica de bisulfito.
- C:** Citosina.
- CaR:** Receptor sensor de calcio, del inglés *Calcium-sensing Receptor*.
- CCND2:** Ciclina D2.
- CDKN2A:** Quinasa inhibidora ciclina dependiente 2A.
- CG:** Dinucleótido citosina-guanina.
- CGH:** Hibridación genómica comparada.
- CH3:** Grupo metilo.
- CpG:** Isla de dinucleótidos CG.
- D':** Asociación alélica.
- DCR, 2;** *Dicer 1 y 2, ribonuclease type III*.
- DDX4:** *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 isoform*.
- DL:** Desequilibrio de ligamiento.
- DM:** Cuerpos geométricos, del inglés *Double Minute*.
- DNMT:** Enzima ADN metil-transferasa.
- dNTP:** Deoxi-nucleótido fosfato, del inglés *Deoxyribonucleotide triphosphate*.
- DR:** *Death receptor*.
- DUSP12:** *Dual-specificity phosphatase 12 gene*.
- EMP3:** *Epithelial membrane protein 3*.
- ERK1/2:** Serina/treonina quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2.
- FISH:** Hibridación *in situ* fluorescente.

FOLH1: Folato hidrolasa 1.

FOXO3: *Forkhead box 3*.

G: Guanina.

GABA: Subunidades de los receptores ácidos γ -aminobutíricos.

GAP43: *Growth Associated Protein 43*.

GCM: *Glial Cells Missing*.

GD2 synthase: *Beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 1*.

GN: Ganglioneuroma.

GNB: Ganglioneuroblastoma.

GPCR: Receptor acoplado a proteínas G.

GPCR6A: Receptor de L- α -aminoácidos del grupo 6 subtipo A.

GRKs: Quinasas asociadas a proteínas G.

GTP: Guanosina-5'-trifosfato.

GST: Gen supresor de tumores.

HACE1: *HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase 1*.

HDCAi: Inhibidores de las desacetilasas de histonas.

HSD17B12: *Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12*.

HOXA9: Homeobox A9.

HSR: Regiones cromosómicas de tinción homogénea.

iFISH: Hibridación *in situ* fluorescente de células en interfase.

IL31RA: *Interleukin-31 receptor precursor 4*.

IGF1: *Insulin-like growth factor 1*.

INPC: *International Neuroblastoma Pathology Classification* o Clasificación Histopatológica Internacional de los Neuroblastomas.

INRG: *International Neuroblastoma Risk Group* o Clasificación Internacional de Grupos de Riesgo en Neuroblastoma.

INSS: *International Neuroblastoma Staging System* o Sistema Internacional de Estadiaje de los Neuroblastomas.

IL6: Interleucina 6.

IP3: Inositol- 3-(1,4,5) fosfato.

JNK: Quinasa activada por estrés c-Jun N-terminal.

kb: Kilobases.

KRT19: *Keratin 19.*

LMO1: *LIM domain only 1.*

LOH: Pérdida de heterocigosidad.

MAPK: Quinasas asociadas a mitógenos.

mC: Residuo 5-metilcitosina.

mGluR1-8: Receptores de glutamato metabotrópicos.

MKI: Índice de mitosis/cariorrexis.

MLH1: Homólogo de mutL-1.

MSP: PCR específica de metilación.

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

NB: Neuroblastoma.

NBPF23: *Neuroblastoma breakpoint family member 23.*

NSD1: *Nuclear receptor binding SET domain protein.*

P1, P2: Promotores 1 y 2.

p38: Quinasa 38 fosforilada.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDGF: *Platelet-derived growth factor.*

PHOX2B: *Paired-like Homeobox Domain 2B.*

PI3K, PI4K: Fosfatidilinositol-3/4-quinasa.

PKC: Protein quinasa C.

PMP22: *Peripheral myelin protein 22.*

PLA, PLC, PLD: Fosfolipasa A, C y D.

PRC2: *Polycomb repressor complex 2.*

PRKCDBP: *Protein kinase C, delta binding protein.*

PTH: Hormona paratiroidea.

PTHrP: *Parathyroid-hormone related peptide* o Hormona relacionada con la hormona paratiroidea.

RAR β 2: Receptor de ácido retinoico- β 2.

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

- RB1:** Gen del retinoblastoma.
- SAM:** S-adenosin-metionina.
- SCNN1A:** *Sodium channel, non-voltage-gated 1 alpha subunit.*
- SNC:** Sistema nervioso central.
- SNP:** Polimorfismo de nucleótido simple.
- TGF β :** *Transforming growth factor- β .*
- TH:** Tirosina hidroxilasa.
- THBS-1:** Trombospodina 1.
- T1R:** Receptores del gusto.
- TM:** Dominio transmembrana.
- TMS1:** *Target of methylation-induced silencing 1.*
- TN:** Tumores neuroblásticos.
- TP73:** *Tumor protein p73.*
- TrkA:** *Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1.*
- TSA:** Tricostatina A.
- TSLC1:** *Tumor suppressor in lung cancer 1.*
- TSS:** Lugar de inicio de transcripción.
- VDRE:** Elemento de respuesta a vitamina D.
- VHL:** Von Hippel-Lindau.

ANEXO

INFORME DE LA DIRECTORA DE TESIS ACREDITANDO LA CONTRIBUCIÓN DE LA DOCTORANDA A LOS ARTÍCULOS QUE SUSTENTAN LA TESIS.

Artículo 1.

The calcium-sensing receptor is silenced by genetic and epigenetic mechanisms in unfavorable neuroblastomas and its reactivation induces ERK1/2-dependent apoptosis.

Carla Casalà, Estel Gil-Guiñón, José Luis Ordóñez, Solange Miguel-Queralt, Eva Rodríguez, Patricia Galván, Cinzia Lavarino, Francina Munell, Enrique de Alava, Jaume Mora and Carmen de Torres.

Carcinogenesis 2013; 34(2):268-76. Factor de impacto 2011: 5.702 (Q1).

La doctoranda ha contribuido a ejecutar una proporción mayoritaria de los experimentos incluidos en los siguientes apartados del artículo:

- **Análisis de mecanismos epigenéticos que contribuyen al silenciamiento del gen *CaR* en líneas celulares de neuroblastoma y en tumores neuroblásticos:** Tratamiento de líneas celulares con 5'-aza-2-deoxicitidina y/o tricostatina A, extracción de ARN, síntesis de cDNA y qPCR para analizar la expresión de *CaR*. Tratamiento con bisulfito de los ADN de dichas líneas celulares y de los tumores neuroblásticos (n=40), PCR específica de bisulfito, seguida de clonación de al menos 10 clones por fragmento de isla CpG (dividida en 3 fragmentos) y secuenciación.
- **Análisis de los efectos sobre la proliferación promovidos por la sobre-expresión de *CaR* en líneas celulares de neuroblastoma:** Transfección estable con pCMV-*CaR*-GFP o pCMV-GFP en dos líneas celulares de neuroblastoma. Generación y mantenimiento de los clones. Purificación

mediante *cell sorting*. Ensayos de proliferación y análisis de marcadores de diferenciación.

- **Análisis de los efectos de dicha sobre-expresión sobre la tumorigénesis de las líneas celulares de neuroblastoma.** Generación de *xenografts* en ratones inmunodeprimidos a partir de los clones pCMV-CaR-GFP o pCMV-GFP de dos líneas celulares. Seguimiento del crecimiento tumoral. Análisis de expresión de marcadores de diferenciación en los especímenes finales. Esta parte del trabajo (*in vivo*) ha sido casi exclusivamente ejecutada por la doctoranda.

Artículo 2.

Polymorphisms in the *calcium-sensing receptor* gene are associated with clinical outcome of neuroblastoma.

Laia Masvidal[†], Raquel Iniesta[†], **Carla Casalà**, Patricia Galván, Eva Rodríguez, Cinzia Lavarino, Jaume Mora and Carmen de Torres.

[†]Estas dos autoras han contribuido por igual al artículo, por lo que la doctoranda es segunda autora del mismo.

PloS One 2013; 8(3):e59762. Factor de impacto 2011: 4.092 (Q1).

Intencionadamente, y tal como se refleja en el artículo, las investigadoras responsables de los tres principales apartados experimentales (genotipado, preparación de los datos clínicos y análisis estadísticos) han sido tres personas diferentes, para eliminar posibles sesgos. La doctoranda ha contribuido al desarrollo de este artículo en la selección y preparación de las muestras de ADN (procedentes de sangre periférica, médula ósea y tumores). Ha sido, además, la principal responsable de la preparación y elaboración de los datos clínicos de los 65 pacientes (edad al diagnóstico, estadio clínico, estado de amplificación del oncogén *MYCN*, clasificación anatómo-patológica de los

tumores, raza, fechas de seguimiento clínico necesarias para calcular la supervivencia global y libre de eventos).

Por último, certifico asimismo que la doctoranda ha estado contribuyendo también a la ejecución de los experimentos que componen los resultados de un artículo actualmente en preparación (**Artículo 3**), en el que se examinan los efectos anti-tumorales derivados de la activación de este receptor en modelos *in vitro* e *in vivo* de neuroblastoma. Su contribución en el examen de los efectos *in vivo* ha sido extremadamente laboriosa, ya que consiste en la administración a ratones inmunodeprimidos de diversos fármacos que precisan utilizar distintas vías de administración (oral e intraperitoneal), 6 días por semana durante 50 días tras la generación de los xenoimplantes a partir de líneas celulares de neuroblastoma y de tumores primarios.

Atentamente,

Dra. Carmen de Torres.
Developmental Tumor Biology Laboratory.
Department of Oncology.
Hospital Sant Joan de Déu.
C/ Santa Rosa 39-57.
08950 Esplugues de Llobregat. Barcelona. Spain.
Tel: +34932532100 x4398.
cdetorres@hsjdbcn.org

Cuando tenía 4 años estuve en el Hospital Sant Joan de Déu porqué una bacteria decidió nadar por mi cuerpo.... cuando llegué de nuevo al hospital el círculo se cerró...

Agradecimientos

Al grupo de tumores del desarrollo del Hospital Sant Joan de Déu por darme la oportunidad de realizar la tesis y de crecer como científica.

A los “sexy ladies lab and man” por vuestro apoyo y por hacer que la tesis fuera divertida.

A las “niñas” por ser un salvavidas en momentos de tormenta...

A mi mejor amigo por ser quien es, no cambies.

A mi familia por estar a mi lado cuando mi mundo se derrumbaba y por ayudarme a ser quien soy y, lo más importante, quien quiero ser.

¡Ratoncitas, no podías faltar! ¡¡Gracias por vuestras cosquillas!!

Y por supuesto a mi rumbero, porque a pesar de los pesares.... sin ti esto nunca hubiera sido una realidad.