



ARTÍCULO ESPECIAL

Nuevas estrategias terapéuticas para el neuroblastoma basadas en el uso de microRNAs



Ariadna Boloix^a, Laia París-Coderch^a, Aroa Soriano^a, Josep Roma^a, Soledad Gallego^{a,b}, Josep Sánchez de Toledo^{a,b} y Miguel F. Segura^{a,*}

^a Grupo de Investigación Traslacional en el Cáncer de la infancia y adolescencia, Institut de Recerca, Vall d'Hebron, Barcelona, España

^b Servicio de Oncología y Hematología Pediátricas, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España

Recibido el 25 de junio de 2015; aceptado el 12 de julio de 2015

Disponible en Internet el 29 de agosto de 2015

PALABRAS CLAVE

Neuroblastoma;
Epigenética;
MicroRNA

Resumen El neuroblastoma (NB) es el tumor sólido más común en niños y adolescentes y representa hasta un 15% de la muerte infantil asociada al cáncer. Tiene su origen en el sistema nervioso simpático y su comportamiento puede llegar a ser muy agresivo y no responder a los tratamientos actuales. En esta revisión se recogen nuevas alternativas terapéuticas basadas en la epigenética, es decir, en moduladores de la expresión génica como los microRNAs y su potencial aplicación clínica en NB.

© 2015 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Neuroblastoma;
Epigenetics;
MicroRNA

Novel micro RNA-based therapies for the treatment of neuroblastoma

Abstract Neuroblastoma (NB) is the most common solid tumour in children and adolescents, and accounts for up to 15% of all cancer deaths in this group. It originates in the sympathetic nervous system, and its behaviour can be very aggressive and become resistant to current treatments. A review is presented, summarising the new alternative therapies based on epigenetics, i.e., modulators of gene expression, such as microRNAs and their potential application in the clinical practice of NB treatment.

© 2015 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: miguel.segura@vhir.org, miguelsegu@gmail.com (M.F. Segura).

Introducción

El neuroblastoma (NB) es un tumor del sistema nervioso simpático. Es considerado un cáncer embrionario y ocurre mayoritariamente en niños y adolescentes. Se estima que en Europa se diagnostican unos 15.000 nuevos cánceres pediátricos cada año, siendo aproximadamente el 8-10% neuroblastomas, alcanzando una incidencia de 1,8 casos por millón. El NB representa el 15% de todas las muertes por cáncer en niños y es el tumor embrionario con menor supervivencia relativa a los cinco años¹. Aparece con frecuencia en una de las glándulas adrenales, pero también puede originarse en tejidos nerviosos del área cervical, tórax, abdomen y pelvis. Los pacientes con NB se asignan a diferentes grupos de riesgo en función a las variables clínico-patológicas que presentan, como puede ser el estadio (clasificación ISSN), la edad al diagnóstico, la amplificación del oncogén MYCN, la histología de tumor (clasificación Shimada) y la ploidía del ADN.

Mientras que la supervivencia de los pacientes de bajo riesgo e intermedio es excelente, los pacientes de alto riesgo tienen mal pronóstico y requieren regímenes intensos de quimioterapia. A pesar del tratamiento intensivo, más del 60% de los niños con NB no se curan^{2,3}.

Tratamiento para los neuroblastomas de alto riesgo

La secuencia del tratamiento que se aplica a los NB de alto riesgo consiste en 4 fases: inducción, control local, consolidación y tratamiento de la enfermedad residual con agentes biológicos⁴. El régimen de inducción consiste en una combinación de antraciclinas, agentes alquilantes, compuestos de platino e inhibidores de la topoisomerasa II, al que se le llama COJEC (cisplatino, vincristina, carboplatino, etopósido y ciclofosfamida). Se suele administrar en 8 ciclos de 10 días de duración. Este período de quimioterapia intensa está enfocado a reducir el tamaño del tumor primario (control local) para facilitar su resección quirúrgica⁵. Tras la cirugía, el tratamiento entra en la fase de consolidación con altas dosis de quimioterapia mieloablativa (busulfán, melfalán), seguido de un autotrasplante de células madre hematopoyéticas. Tras la recuperación, se aplica radioterapia focal en el lugar del tumor primario, así como en lugares con focos metastásicos.

Por último, se recurre al uso de agentes biológicos para el tratamiento de la enfermedad residual como anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos del NB (p. ej., anti-GD2) y el ácido 13-cis-retinoico como agente diferenciador, solo o en combinación con IL-2, que ayuda a activar el sistema inmunitario.

Resistencia a la terapia

A pesar de los tratamientos secuenciales y combinatorios, el 60% de los pacientes desarrollan recidivas y metástasis^{2,5}. La progresión del NB de alto riesgo está ligada a la adquisición de resistencia al tratamiento, lo que comúnmente se caracteriza como resistencia múltiple a drogas (MDR, del inglés *multi drug resistance*). La MDR suele deberse a varios

factores celulares y vías de señalización celular, siendo uno de los mayores obstáculos para el éxito de la quimioterapia. En la MDR participan elementos típicos de los NB de alto riesgo, como un incremento de la expresión de oncogenes (p. ej., MYCN), aumento de la señalización por receptores tirosina quinasa (TrkB/BDNF) o alteraciones en la función de genes supresores de tumores (p. ej., p53)⁶⁻⁹. También se ha demostrado que elementos cruciales de las vías de señalización apoptótica presentan una expresión o patrones de activación anormales^{10,11}. Además, la quimiorresistencia adquirida también puede ser causada por un incremento en la expulsión celular de fármacos debido a la sobreexpresión de transportadores de membrana del tipo ABC^{12,13}.

Debido a los múltiples mecanismos que pueden desencadenar la resistencia a las terapias convencionales en NB, es probable que enfocar las terapias a única diana no sea suficiente para tratar a los tumores con éxito. En este sentido, sería deseable encontrar moléculas que fueran capaces de afectar a múltiples procesos celulares y así mejorar la respuesta terapéutica.

Terapias epigenéticas como nueva alternativa

La epigenética engloba diversos mecanismos de la regulación de expresión génica a través de modificaciones estructurales de la cromatina (p. ej., metilación del ADN, acetilación de histonas) y regulación postranscripcional mediante ARN no codificantes (p. ej., microRNA). En el NB se han observado alteraciones en el patrón epigenético de las células tumorales, tales como alteraciones en la acetilación de histonas o metilación aberrante en las regiones promotoras del ADN de genes concretos como la caspasa-8¹⁴ o en grandes fragmentos de cromosomas¹⁵. Estas alteraciones están relacionadas directamente con la supervivencia de los pacientes¹⁶, con la capacidad metastásica de los tumores¹⁷ o con la resistencia a terapia¹⁸.

Así pues, las *terapias epigenéticas* surgen como una alternativa a los tratamientos convencionales y tienen como objetivo revertir las alteraciones epigenéticas que puedan estar contribuyendo a la agresividad de los tumores. Un ejemplo de los primeros «fármacos epigenéticos» que están actualmente en fase clínica son los inhibidores de las histonas deacetilasas (p. ej., ácido valproico), que actualmente están siendo probados en ensayos clínicos con efectos beneficiosos para los pacientes y con efectos secundarios mínimos¹⁹.

A la par de los fármacos moduladores de la estructura o de la función de la cromatina, crece el interés por el uso terapéutico de reguladores postranscripcionales, como son los ARN no codificantes. A la cabeza de este tipo de moléculas se hallan los microRNAs (miRNAs), que son ARN no codificantes de pequeño tamaño (18-25 nucleótidos) que regulan la expresión génica a través de la interacción directa con sus genes diana en la región 3'UTR, impidiendo su traducción o induciendo su degradación.

Génesis y función de los microRNAs

Los genes de miRNAs pueden estar localizados en secuencias intergénicas, en intrones (también llamados *mirtrons*) o en exones de genes codificantes como en los no codificantes.

Su transcripción puede ser llevada a cabo por la ARN polimerasa II-III y transcribirse en unidades simples a partir de su propio promotor, o bien en moléculas más complejas de 2 o más miRNAs (llamadas *clusters*) a partir de un promotor común. El transcrito inicial (llamado *pri-miRNA*) tiene la estructura CAP (del inglés, caperuza o casquete) en el extremo 5' y una cola de poliadeninas en el extremo 3'. Esta molécula se pliega en forma de horquilla y es reconocida por las enzimas DROSHA y DGCR8 que cortan los extremos de la horquilla generando la forma precursora más corta (~70-80 nucleótidos) llamada *pre-miRNA*. El *pre-miRNA* se exporta al citoplasma gracias a la acción de la enzima XPO5 y se procesa por la endonucleasa DICER1 dando lugar a la molécula funcional de doble cadena (18-25 nucleótidos). Finalmente, se separan las 2 hebras y se incorporan en el complejo multiproteico RISC (del inglés, *RNA-induced signaling complex*), cuya función es dirigir a los miRNAs a sus ARNm diana. Ambas hebras (-5p y -3p) pueden ser funcionalmente relevantes, independientemente de su abundancia y estabilidad.

Generalmente, la forma madura del miRNA se une a la región 3'UTR de sus genes diana a través de una secuencia de 7-8 nucleótidos localizados en el extremo 5' del miRNA, que se conoce como *seed sequence*, que tiene una alta complementariedad con la secuencia del 3'UTR de su gen diana. Una vez que el complejo RISC-miRNA se posiciona en el gen diana, ocurre la inhibición de la traducción y/o la degradación del ARNm. En casos muy concretos, los miRNAs pueden ejercer su papel regulador de la expresión uniéndose a la región 5'UTR²⁰.

Uso de microRNAs como herramienta clínica

Existe un creciente número de estudios preclínicos basados en miRNAs que han demostrado tener efectos mejorados, aditivos o similares a los tratamientos convencionales. Su uso puede suponer diferentes ventajas técnicas:

1. Los miRNAs son elementos reguladores que pueden afectar a múltiples ARNm simultáneamente y, por tanto, afectar a diferentes componentes de la misma vía de señalización molecular o incluso a diferentes vías. Esto minimiza la posibilidad de compensación por otras vías redundantes o por diferentes proteínas de la misma familia.
2. A diferencia de los ARNm, los miRNAs maduros ya son directamente el producto funcional del gen, y no requieren de otro tipo de regulación transcripcional para ejercer su función.
3. Por último, los miRNAs son estables en tejido congelado, así como en muestras de tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina (FFPE, del inglés *formalin-fixed paraffin-embedded*). Ello permite la extracción a partir de biopsias clínicas y su cuantificación por métodos estandarizados como PCR cuantitativa, en cualquier momento durante el tratamiento del paciente.

MicroRNAs y neuroblastoma

Lin et al. fueron de los primeros investigadores en observar que el análisis de la expresión de un subconjunto de miRNAs permitía clasificar a pacientes de alto y bajo riesgo con

una elevada sensibilidad y especificidad²¹. Actualmente, se han identificado numerosos miRNAs que regulan las distintas propiedades oncogénicas de los NB. En esta sección nos centraremos en destacar aquellos en los que hay evidencias de efectos terapéuticos en modelos preclínicos (tabla 1).

MicroRNAs con función supresora de tumores

El primer ejemplo de miRNA que se consideró como supresor del NB fue miR-34a²². Este miRNA se encuentra en la región cromosómica 1p36 (comúnmente deletionada en NB) y está regulado por el gen supresor tumoral TP53²³. Por tanto, la estrategia terapéutica se dirige a restaurar los niveles de este miRNA. De hecho, su sobreexpresión provoca una reducción de la proliferación celular y un aumento de la muerte celular por apoptosis, tanto *in vitro* como *in vivo*²⁴.

Una de las primeras estrategias para identificar miRNAs con potencial terapéutico fue analizando su expresión y correlación con distintos parámetros de agresividad tumoral. Siguiendo esta estrategia se identificó a miR-542, que parece ser uno de los miRNAs con expresión más baja en NB y que con más fuerza correlaciona con baja supervivencia. La sobreexpresión de su forma miR-542-5p en modelos ortotópicos de NB causó una clara reducción en el volumen tumoral²⁵. Recientemente, también se ha comprobado que el tratamiento de ratones con xenotrasplantes de NB con nanopartículas cargadas con miR-542-3p también provoca una disminución de la proliferación y aumento de muerte celular por apoptosis en los tumores²⁶.

Otra de las estrategias utilizadas ha sido la del estudio de miRNA que puedan estar modulando a genes o procesos claramente implicados en NB. El primer caso obvio a estudiar fue la regulación de MYCN por miRNAs. Los resultados de este estudio permitieron identificar una serie de miRNAs capaces de reprimir la expresión de la proteína MYCN, tales como miR-34a/c, miR-449, miR-19ab, miR-101 y let-7/miR-202²⁷. Sin embargo, solo en el caso de let-7 hay evidencias que demuestran su potencial terapéutico. Molenaar et al. demostraron elegantemente que el regulador del procesamiento de let-7, LIN28B está amplificado en NB de alto riesgo y, por tanto, es en parte responsable de la baja expresión de let-7 y el consiguiente aumento de la expresión de MYCN²⁸.

El factor de transcripción PPAR γ también se encuentra altamente expresado en NB, en parte, debido a la pérdida de la expresión de miRNA como miR-27b. Los niveles de expresión de miR-27b son bajos en NB y el tratamiento de ratones mediante administración intraperitoneal de este miRNA causa una importante reducción en el crecimiento tumoral²⁹. Resultados similares se obtuvieron también al tratar ratones xenotrasplantados con líneas celulares de NB con miR-200a. Este miRNA pertenece a la familia de miR-200, cuya alteración en su expresión ha sido demostrada en multitud de tumores³⁰. El efecto terapéutico al aumentar los niveles de miR-200a se ha relacionado con la disminución de la expresión del factor de transcripción AP2- γ ³¹.

Existe una serie de estudios en los que se pone de manifiesto que la terapia con miRNAs puede contribuir a limitar la capacidad metastásica de las células de NB. Un primer ejemplo lo encontramos en el trabajo de Zhang et al., donde analizaron la regulación de la metaloproteasa MMP-14 por miRNAs. MMP-14 es una proteína implicada en la migración,

Tabla 1 MicroRNA con potencial terapéutico en neuroblastoma

microRNA	↑/↓	Genes diana	Restauración causa	Referencias
<i>miR-34a</i>	↓	TIMP2	↓ proliferación, ↑ apoptosis, ↓ vascularización	24
<i>miR-542-5p</i>	↓	NA	↓ proliferación, ↓ metástasis	25,26
<i>Let-7</i>	↓	LIN28B	↓ crecimiento, ↓ clonabilidad, ↓ viabilidad celular, arresto celular en fase G1	28
<i>miR-27b</i>	↓	PPAR γ	↓ proliferación, ↓ inflamación	29
<i>miR-200a</i>	↓	AP-2 γ	↓ proliferación, ↓ crecimiento tumoral	31
<i>miR-9</i>	↓	MMP14	↓ proliferación, ↓ metástasis	32
<i>miR-145</i>	↓	HIF-2 α	↓ crecimiento celular y tumoral, ↓ migración, ↓ invasión y metástasis, ↓ angiogénesis	33
<i>miR-335</i>	↓	SOX4, TNC	↓ clonabilidad, ↓ metástasis	34
<i>miR-363</i>	↓	AMDM15, MYO1B	↓ clonabilidad, ↓ metástasis	34
<i>miR-183</i>	↓	NA	↓ proliferación, ↑ apoptosis	35
<i>miR-138</i>	↓	Proteínas implicadas en la apoptosis (Bcl-2, Bax, Caspasa-3, calpain...)	↓ clonabilidad, ↑ apoptosis, ↓ viabilidad celular, ↓ crecimiento tumoral	36
<i>miR-558</i>	↑	HPSE	↓ crecimiento tumoral, ↓ invasión, ↓ metástasis, ↓ angiogénesis	38
<i>miR-380-5p</i>	↑	TP53	↓ proliferación, ↑ apoptosis	40

NA: no analizado; ↑: aumentado/a; ↓: disminuido/a.

la invasión y la metástasis, por lo que representa una diana terapéutica para el NB. Los autores demostraron que la sobreexpresión de miR-9 es capaz de reducir los niveles de MMP-14 y provocar una disminución del crecimiento tumoral y de la capacidad metastásica de las células de NB³². La expresión de MMP-14 está regulada directamente por el factor HIF-2 α (del inglés, *hypoxia-inducible factor 2 alpha*). Recientemente, se ha observado que este factor también puede estar expresado en áreas del tumor no hipóxicas. A su vez, este factor puede estar regulado epigenéticamente por miR-145. La sobreexpresión de miR-145 en xenotrasplantes de NB causó una disminución en el crecimiento tumoral, angiogénesis y capacidad de metástasis³³.

Otro de los miRNAs implicado en metástasis es miR-335. La expresión de este miRNA está directamente reprimida por el oncogén MYCN. Como consecuencia, la expresión de diversos elementos de la vía de señalización de TGF β (p. ej., ROCK, MAPK1 y LRGR1) puede verse aumentada, confiriendo una mayor capacidad de metástasis a las células de NB. En un estudio independiente, se identificaron miR-335 y miR-363 como genes regulados por la proteína GRP-R (del inglés, *gastrin-releasing peptide receptor*), implicada en la tumorigénesis y metástasis del NB. La sobreexpresión de miR-335 y miR-363 en líneas celulares de NB disminuyó su capacidad de crecimiento tumoral y de metástasis *in vivo*³⁴. También se ha visto que MYCN puede cooperar con HDAC2 para reprimir la expresión de miRNAs, como el miR-183. En este caso, también la sobreexpresión de miR-183 fue suficiente para disminuir el crecimiento tumoral *in vivo*³⁵.

En ocasiones, puede que recuperar la expresión de un solo miRNA no sea suficiente para obtener un efecto terapéutico, pero sí en combinación con tratamientos convencionales o experimentales. Tal es el caso de miR-138, que regula la expresión del gen de la telomerasa (hTERT), responsable del crecimiento indefinido de los tumores. El

incremento de la expresión de miR-138 por introducción de ADN en xenotrasplantes de NB no afectó al crecimiento tumoral por sí solo, pero incrementa los efectos terapéuticos de flavonoides como la apigenina³⁶.

MicroRNA con función oncogénica

Se ha identificado una serie de miRNAs cuya expresión se encuentra elevada en los tumores con mal pronóstico, que pueden tener funciones oncogénicas y cuya inhibición puede resultar en un efecto terapéutico. Un ejemplo es el recientemente descrito miR-558. Este miRNA tiene un mecanismo de acción no convencional. A diferencia de la gran mayoría de miRNAs cuya principal función es reprimir la traducción e inducir la degradación del ARNm, miR-558 se une a la región promotora de sus genes diana, como el gen de la heparanasa (HSPE), estabilizando el ARNm y aumentando los niveles de la proteína. Esta enzima está involucrada en procesos de invasión, crecimiento tumoral y angiogénesis (revisado en ³⁷). Por otro lado, Qu et al. demostraron que la inyección por vía intravenosa de moléculas para inhibir la función de miR-558 (antimirs) resultaba en una disminución de la proteína HSPE, provocando una disminución del crecimiento tumoral, reducción en el número de vasos sanguíneos y reducción de metástasis pulmonares³⁸.

Otro de los principales miRNAs cuya inhibición tiene un gran potencial terapéutico es miR-380-5p. Este miRNA fue identificado como regulador del gen supresor de tumores TP53. Si bien este gen está mutado o deletado frecuentemente en multitud de tumores, las alteraciones genéticas de este gen son poco habituales en NB³⁹. Sin embargo, sabemos que la función de TP53 es esencial para la transducción de señal de estímulos genotóxicos como los generados por los fármacos quimioterapéuticos. Por tanto, uno de los

mecanismos por los que las células tumorales pueden tolerar la expresión del gen *TP53* es a través del control postranscripcional a través de miRNAs. Esta opción parece plausible para un determinado subconjunto de pacientes de NB. Concretamente, en pacientes con amplificación del oncogén *MYCN* y mal pronóstico, se hallaron altos niveles de miR-380-5p. La inhibición de miR-380-5p mediante la inyección intraperitoneal de antimirs fue capaz de reducir el crecimiento del tumor en tumores dependientes del oncogén *MYCN* induciendo muerte celular dependiente de *TP53*⁴⁰.

Conclusiones y perspectivas futuras

El uso de los miRNAs en la práctica clínica ya es una realidad. En el campo de la oncología, la primera molécula en entrar en fase clínica ha sido MIRX34. Este compuesto imita a miR-34, un miRNA con función supresora de tumores, cuya expresión está reducida en multitud de tumores.

Una limitación de estos compuestos es que, al administrarse por vía venosa y sin ningún tipo de encapsulación, su distribución se concentra mayoritariamente en el hígado, donde es muy efectivo pero se metaboliza y excreta rápidamente, limitando su potencial terapéutico en tejidos menos irrigados. Por tanto, se requiere un aumento en la investigación para mejorar la biodistribución de los miRNAs posiblemente mediante su encapsulación en nanopartículas vesiculares fabricadas con materiales biocompatibles, confiriendo así una mayor estabilidad y permanencia en el torrente sanguíneo, de forma que tengan más tiempo de acumularse en los tejidos tumorales y ejerzan con mayor eficiencia su función antitumoral.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado por Instituto de Salud Carlos III (CP11/00052, PI14/00561, RD12/0036/0016) cofinanciado por la European Regional Development Fund (ERDF), Generalitat de Catalunya (2014-SGR-660) y Marie Curie Career Integration Grants (n° 618301).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Gatta G, Ferrari A, Stiller CA, Pastore G, Bisogno G, Trama A, et al. Embryonal cancers in Europe. *Eur J Cancer*. 2012;48:1425–33.
- Zage PE, Kletzel M, Murray K, Marcus R, Castleberry R, Zhang Y, et al. Outcomes of the POG 9340/9341/9342 trials for children with high-risk neuroblastoma: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;51:747–53.
- Seeger RC, Reynolds CP. Treatment of high-risk solid tumors of childhood with intensive therapy and autologous bone marrow transplantation. *Pediatr Clin North Am*. 1991;38:393–424.
- Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: Biology, prognosis, and treatment. *Pediatr Clin North Am*. 2008;55:97–120.
- Pearson AD, Pinkerton CR, Lewis IJ, Imeson J, Ellershaw C, Machin D. High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: A randomised trial. *Lancet Oncol*. 2008;9:247–56.
- Ho R, Eggert A, Hishiki T, Minturn JE, Ikegaki N, Foster P, et al. Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer Res*. 2002;62:6462–6.
- Jaboin J, Kim CJ, Kaplan DR, Thiele CJ. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Res*. 2002;62:6756–63.
- Scala S, Wosikowski K, Giannakakou P, Valle P, Biedler JL, Spengler BA, et al. Brain-derived neurotrophic factor protects neuroblastoma cells from vinblastine toxicity. *Cancer Res*. 1996;56:3737–42.
- Keshelava N, Zuo JJ, Chen P, Waidyaratne SN, Luna MC, Gomer CJ, et al. Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res*. 2001;61:6185–93.
- Castle VP, Heidelberger KP, Bromberg J, Ou X, Dole M, Nunez G. Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2, in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification. *Am J Pathol*. 1993;143:1543–50.
- Hopkins-Donaldson S, Bodmer JL, Bourlout KB, Brognara CB, Tschopp J, Gross N. Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res*. 2000;60:4315–9.
- Goldstein LJ, Fojo AT, Ueda K, Crist W, Green A, Brodeur G, et al. Expression of the multidrug resistance, *MDR1*, gene in neuroblastomas. *J Clin Oncol*. 1990;8:128–36.
- Norris MD, Bordow SB, Marshall GM, Haber PS, Cohn SL, Haber M. Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1996;334:231–8.
- Yang Q, Kiernan CM, Tian Y, Salwen HR, Chlenski A, Brumback BA, et al. Methylation of *CASP8*, *DCR2*, and *HIN-1* in neuroblastoma is associated with poor outcome. *Clin Cancer Res*. 2007;13:3191–7.
- Buckley PG, Das S, Bryan K, Watters KM, Alcock L, Koster J, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of neuroblastic tumors reveals clinically relevant epigenetic events and large-scale epigenomic alterations localized to telomeric regions. *Int J Cancer*. 2011;128:2296–305.
- Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet*. 2005;37:853–62.
- Grau E, Martinez F, Orellana C, Canete A, Yanez Y, Oltra S, et al. Epigenetic alterations in disseminated neuroblastoma tumour cells: Influence of TMS1 gene hypermethylation in relapse risk in NB patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136:1415–21.
- Charlet J, Schneckenger M, Brown KW, Diederich M. DNA demethylation increases sensitivity of neuroblastoma cells to chemotherapeutic drugs. *Biochem Pharmacol*. 2012;83:858–65.
- Stiborova M, Poljakova J, Eckschlager T, Kizek R, Frei E. DNA and histone deacetylases as targets for neuroblastoma treatment. *Interdiscip Toxicol*. 2010;3:47–52.
- Soriano A, Jubierre L, Almazan-Moga A, Molist C, Roma J, de Toledo JS, et al. MicroRNAs as pharmacological targets in cancer. *Pharmacol Res*. 2013;75:3–14.
- Lin RJ, Lin YC, Chen J, Kuo HH, Chen YY, Diccianni MB, et al. microRNA signature and expression of Dicer and Drosha can predict prognosis and delineate risk groups in neuroblastoma. *Cancer Res*. 2010;70:7841–50.
- Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2007;26:5017–22.

23. Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*. 2007;26:731–43.
24. Tivnan A, Orr WS, Gubala V, Nooney R, Williams DE, McDonagh C, et al. Inhibition of neuroblastoma tumor growth by targeted delivery of microRNA-34a using anti-disialoganglioside GD2 coated nanoparticles. *PLoS One*. 2012;7:e38129.
25. Bray I, Tivnan A, Bryan K, Foley NH, Watters KM, Tracey L, et al. MicroRNA-542-5p as a novel tumor suppressor in neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2011;303:56–64.
26. Althoff K, Lindner S, Odersky A, Mestdagh P, Beckers A, Karczewski S, et al. miR-542-3p exerts tumor suppressive functions in neuroblastoma by downregulating Survivin. *Int J Cancer*. 2015;136:1308–20.
27. Buechner J, Tomte E, Haug BH, Henriksen JR, Lokke C, Flaegstad T, et al. Tumour-suppressor microRNAs let-7 and mir-101 target the proto-oncogene MYCN and inhibit cell proliferation in MYCN-amplified neuroblastoma. *Br J Cancer*. 2011;105:296–303.
28. Molenaar JJ, Domingo-Fernandez R, Ebus ME, Lindner S, Koster J, Drabek K, et al. LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nat Genet*. 2012;44:1199–206.
29. Lee JJ, Drakaki A, Iliopoulos D, Struhl K. MiR-27b targets PPAR-gamma to inhibit growth, tumor progression and the inflammatory response in neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2012;31:3818–25.
30. Feng X, Wang Z, Fillmore R, Xi Y. MiR 200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer Lett*. 2014;344:166–73.
31. Gao SL, Wang LZ, Liu HY, Liu DL, Xie LM, Zhang ZW. miR-200a inhibits tumor proliferation by targeting AP-2gamma in neuroblastoma cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15:4671–6.
32. Zhang H, Qi M, Li S, Qi T, Mei H, Huang K, et al. microRNA-9 targets matrix metalloproteinase 14 to inhibit invasion, metastasis, and angiogenesis of neuroblastoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2012;11:1454–66.
33. Zhang H, Pu J, Qi T, Qi M, Yang C, Li S, et al. MicroRNA-145 inhibits the growth, invasion, metastasis and angiogenesis of neuroblastoma cells through targeting hypoxia-inducible factor 2 alpha. *Oncogene*. 2014;33:387–97.
34. Qiao J, Lee S, Paul P, Theiss L, Tiao J, Qiao L, et al. miR-335 and miR-363 regulation of neuroblastoma tumorigenesis and metastasis. *Surgery*. 2013;154:226–33.
35. Lodrini M, Oehme I, Schroeder C, Milde T, Schier MC, Kopp-Schneider A, et al. MYCN and HDAC2 cooperate to repress miR-183 signaling in neuroblastoma. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:6018–33.
36. Chakrabarti M, Banik NL, Ray SK. miR-138 overexpression is more powerful than hTERT knockdown to potentiate apigenin for apoptosis in neuroblastoma in vitro and in vivo. *Exp Cell Res*. 2013;319:1575–85.
37. Nadir Y, Brenner B. Heparanase multiple effects in cancer. *Thromb Res*. 2014;133 Suppl 2:S90–4.
38. Qu H, Zheng L, Pu J, Mei H, Xiang X, Zhao X, et al. miRNA-558 promotes tumorigenesis and aggressiveness of neuroblastoma cells through activating the transcription of heparanase. *Hum Mol Genet*. 2015;24:2539–51.
39. Tweddle DA, Pearson AD, Haber M, Norris MD, Xue C, Flemming C, et al. The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2003;197:93–8.
40. Swarbrick A, Woods SL, Shaw A, Balakrishnan A, Phua Y, Nguyen A, et al. miR-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN-amplified neuroblastoma. *Nat Med*. 2010;16:1134–40.