



VII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica y I Congreso de Preparaciones Virtuales por Internet

Del 1 al 31 de octubre de 2005



ESTUDIO DEL NEUROBLASTOMA DE ALTO RIESGO CON HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA

ROSA NOGUERA*, MANUEL J. ENCISO*, SAMUEL NAVARRO*, VICTORIA CASTEL**, JULIA CRUZ*, MARTA PIQUERAS*, AMPARO RUIZ*, ANTONIO LLOMBART-BOSCH*

* DPTO. PATOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE VALENCIA ESPAÑA

** UNIDAD ONCOPEDIATRIA, HOSP. UNIV. LA FE, VALENCIA ESPAÑA

Resumen

Introducción. Existen diversos subtipos de tumores neuroblásticos con diferentes anomalías genéticas que predicen su evolución clínica. Las ganancias cromosómicas completas generalmente están asociadas a estadios clínicos no avanzados (1, 2, y 4S) y evolución favorable, mientras que las pérdidas de 1p, ganancia de 17q y amplificación de *MYCN* (MN-A) son indicativas de estadios clínicos avanzados (3 y 4) y pronóstico desfavorable. Los neuroblastomas (NB) de alto riesgo (HR), siguiendo la clasificación utilizada en los estudios cooperativos europeos (SIOP-Europa), incluyen los NB presentes en niños mayores de 1 año: estadio 4 o con amplificación del oncogén *MYCN* en cualquier estadio de la enfermedad, excluyendo el estadio 1. El pronóstico de estos enfermos sigue siendo malo, incluso con tratamientos muy agresivos. Los estudios biológicos y otros factores clínicos que tienen valor pronóstico en el NB localizado son irrelevantes en los pacientes de HR. Sólo la amplificación del *MYCN* confiere un valor pronóstico negativo a los tumores que la presentan.

Material y métodos. Se han remitido al Centro de Referencia Nacional de Estudios Biológicos del NB (Dpto. Patología, Universidad de Valencia) de Enero 2002 a Febrero 2005, 60 casos de NB-HR. En todos los casos hemos analizado, como estudios obligatorios en SIOP-Europa, la clínica, histopatología, ploidía y el estado del gen *MYCN* y de la región 1p36 con la técnica de hibridación in situ cromosómica (FISH). Como análisis complementario hemos estudiado el perfil genómico completo de 24 casos con la técnica de hibridación genómica comparada (CGH).

Resultados. Por FISH detectamos 31 casos MN-A presentando 29 casos pérdida del 1p (del 1p36); 21 casos no amplificados (MN-NA) estando presente la del 1p36 en 7 casos; y 8 casos con ganancia de *MYCN* (MN-G), 6 de ellos con del 1p36. Con CGH confirmamos las anomalías detectadas por FISH y detectamos otras anomalías cromosómicas. Del grupo de MN-A analizamos 11 casos -10 con del 1p36-, ningún caso presentó pérdidas en 11q y en todos los casos detectamos ganancias en 17q o disomía del cromosoma 17. Del grupo de MN-NA estudiamos 7 casos -5 con del 1p36-, presentando 4 casos la pérdida de 11q, 2 de ellos junto a la pérdida de 3p. La ganancia de 17q o la disomía del cromosoma 17 esta presente en todos los casos. Del grupo de MN-G analizamos 6 casos -5 con del 1p36- detectando la pérdida de 11q en 4 casos y ganancia de 17q o cromosoma 17 en disomía en 5 casos.

Conclusión. El estudio del perfil genómico completo con CGH en los NB-HR revela la compleja interacción de anomalías genéticas con significación pronóstica.

Ayudas FIS G03/089 y PI04/0822, Madrid.

Introducción

Los tumores neuroblásticos son los tumores sólidos extracraneales más frecuentes de la infancia y están caracterizados por una evolución clínica heterogénea que abarca desde una progresión maligna rápida a una regresión espontánea. Como resultado, tanto el pronóstico como la respuesta al tratamiento varía ampliamente [1,2]. La identificación de los factores pronósticos sólo se puede realizar con garantía si el enfermo ha sido completamente estudiado, para lo que es imprescindible siempre realizar una biopsia, y que ésta sea estudiada en un laboratorio de referencia o con amplia experiencia. Existe una estandarización de criterios clínicos para diagnóstico, estadiaje, y respuesta al tratamiento conocida como Internacional Neuroblastoma Staging System (INSS) [3], definiéndose internacionalmente la necesidad de obtener datos biológicos (histopatológicos y genéticos) para crear nuevos grupos terapéuticos. Los análisis histopatológicos tienen un importante valor para conocer la biología tumoral [4-6]. En 1984, Shimada y colaboradores [7] describieron un sistema de clasificación basado en la cantidad del estroma schwanniano, el grado de diferenciación, el índice de mitosis-cariorrexis (MKI) y la edad al diagnóstico, distinguiendo dos grupos de histopronóstico: favorable y desfavorable. Actualmente se utiliza la Internacional Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) [8,9], basada en la clasificación original de Shimada con pequeñas modificaciones. Las anomalías genéticas que caracterizan estos tumores son conocidas desde hace tiempo y algunas de ellas poseen claro valor pronóstico [10-14]. Entre los marcadores genéticos de NB agresivos se incluyen la diploidía o tetraploidía [15,16], la amplificación del proto-oncogén *MYCN* [17-19], la delección del 1p [20-22], y la ganancia del 17q [23-26]. Esta última reestructuración, que se presenta con una alta frecuencia, puede resultar de una traslocación no balanceada del 17q con más de 20 regiones cromosómicas diferentes [27,28]. Recientemente, se ha encontrado que los tumores con disomía del cromosoma 17 y un presumible estadio favorable puede representar un subgrupo de riesgo alto [29]. Además, se han descrito como marcadores de posible valor pronóstico las pérdidas frecuentes de heterocigosidad (LOH) en otras regiones cromosómicas, especialmente 2q (30%), 3p (15.3%), 4p (19.5%), 9p (36%), 11q (5-44%), 14q (18-23%) y 18q (31%) [30-34]. Se han descrito asociaciones entre pérdidas de 11q, 3p y 14q, que se correlacionan inversamente con la amplificación de *MYCN* y la delección de 1p, identificando subgrupos diferentes de tumores avanzados [30-33].

De la multitud de factores pronósticos conocidos, muchos de ellos no tienen un valor independiente y se presentan asociados con otros de mayor peso específico. La edad, el estadio y la amplificación del *MYCN* son los factores admitidos por todos los grupos cooperativos como marcadores con valor pronóstico independiente. A ellos se añaden, con menor valor, la clasificación histológica de Shimada, la delección del 1p y la ploidía. Otros marcadores biológicos como el TRKA/B, el MDR1, la ganancia de 17q, y otras LOH han demostrado valor pronóstico en estudios aislados, pero no han sido utilizados todavía en grandes estudios cooperativos para conocer cuál es su valor pronóstico real [35-37].

Los enfermos se clasifican, por tanto, en grupos de riesgo con recomendaciones terapéuticas diferentes para cada uno de ellos, existiendo una concordancia del 85% entre las clasificaciones utilizadas por los mayores grupos cooperativos en NB. El grupo de alto riesgo (HR) es el más numeroso (45%), compuesto principalmente por pacientes mayores de 1 año con estadio 4, pero también incluye a cualquier otro estadio de la enfermedad, excluyendo el estadio 1 con amplificación del *MYCN*, independientemente de la edad (grupo de NB SIOP-Europa). El pronóstico de estos enfermos es

malo, incluso con tratamientos muy agresivos. Sólo la amplificación del *MYCN* confiere un valor pronóstico negativo a los tumores que la presentan [38-40].

Debido a que los estudios de citogenética clásica de NB primarios son sólo posibles en un 20-30% de los casos y los estudios genético-moleculares y de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) están limitados a regiones genéticas particulares correspondientes a las sondas específicas utilizadas, en este estudio hemos aplicado la técnica de hibridación genómica comparada (CGH) en 24 tumores neuroblásticos del grupo HR para examinar su perfil genómico completo e identificar anomalías cromosómicas adicionales que puedan ser útiles para la estratificación terapéutica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

El material tumoral de los pacientes estudiados fue remitido entre Enero 2002 a Febrero 2005 al Centro de Referencia Nacional de Estudios Anatomopatológicos y Biológicos (Dpto. Patología, Universidad de Valencia). La edad de los pacientes oscilaba entre 14 meses y 15 años. El diagnóstico de NB y estadije fue realizado según la INSS: estadio 3 (n=9), estadio 4 (n=51). Fueron estudiados 52 tumores primarios y 8 casos metastásicos: infiltraciones medulares (n=2), ganglionares (n=2), ósea (n=1), intestinal (n=1), hepáticas (n=1) y pancreática (n=1) sin terapia previa. Todos los pacientes recibieron la terapia según los protocolos de SIOP-Europa para HR.

Histopatología

El diagnóstico histológico, basado en las recomendaciones de la INPC fue revisado por el patólogo del Centro de Referencia Nacional. Fueron analizados los siguientes parámetros morfológicos: porcentaje de estroma schwanniano, MKI (bajo, medio y alto siendo <100, 100 a 200 y >200 mitosis o cariorrexis por 5.000 células tumorales respectivamente), grado de diferenciación basado en la presencia o ausencia de neuropilo, diferenciación gangliónica (indiferenciado, pobremente diferenciado o en diferenciación), y la presencia o ausencia de calcificación.

Análisis genéticos

Los tumores fueron analizados genéticamente usando la técnica de citometría estática (50 casos), de FISH (60 casos) y de CGH (24 casos). Para ello se realizaron secciones de las piezas incluidas en parafina, improntas celulares y se extrajo DNA de la misma pieza tumoral utilizada para el estudio histopatológico. Para interpretar los resultados de todas estas técnicas genéticas fue imprescindible conocer el porcentaje de células neuroblásticas en las secciones tumorales.

Para la medición del índice de DNA por citometría estática se utilizaron secciones de material incluido en parafina de 6m de grosor teñidas con el reactivo de Feulgen (hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 30-50 minutos y Schiff 1 hora) y el sistema de análisis de imagen Olympus CUE-2. Se midió la densidad óptica integrada de 250-500 núcleos de células tumorales y 25-50 núcleos linfocitarios (referencia interna) por caso y los resultados se basaron en el Consenso Europeo [41].

Las improntas celulares con más de 200 células neuroblásticas fueron utilizadas para detectar amplificación de *MYCN* y para conocer la delección de la región 1p36 por FISH. Las sondas utilizadas y las condiciones de hibridación, lavados, detección han sido previamente descritas [42,43]. Brevemente, se utilizaron sondas Q-BIOgene N-myc (2p24)/ 2 a-satélite y 1p36 midisatélite/ 1 alfasatélite de doble color. La hibridación se realizó en cámara húmeda a 37°C durante 16 horas. Los lavados posteriores se hicieron con 50% formamida/2X SSC y 2X SSC. Las preparaciones fueron contraténidas con Dapi/antifade. Se analizaron de 200 a 500 núcleos por caso con un microscopio epifluorescente Zeiss axioplan2. La amplificación de *MYCN* fue considerada cuando existía incrementado más de 4 veces el número de señales de N-Myc en relación con el número de señales de cromosoma 2 a-satélite. La ganancia de *MYCN* fue reconocida cuando aparecía de 1 a 4 veces incrementado el número de señales de N-Myc en relación con el número de señales de cromosoma 2 alfasatélite. La delección de 1p36 fue detectada por la presencia única de una región subtelomérica del brazo corto del cromosoma 1 (p36 midisatélite). Consideramos como desequilibrio de 1p36 cuando existía una desproporción entre el número de centrómeros del cromosoma 1 y la región 1p36, siempre con la existencia de más de una región subtelomérica del brazo corto del cromosoma 1.

Utilizamos la técnica de CGH descrita por Kallioniemi y colaboradores [44] con algunas modificaciones. Brevemente, se utilizaron metafases (46XY) (Vysis). EL DNA tumoral fue marcado con fluoresceína-12-dUTP (Vector), y el DNA de referencia comercial y previamente marcado con Spectrum red (Vysis). El tamaño de los fragmentos finales fue de 500-2.000 bp. Se mezcló la misma cantidad (300ng) de DNA tumoral y de DNA de referencia precipitándose con 20 mg de DNA Cot-1 (Roche). Los distintos DNAs fueron disueltos en 50% formamida/2X SSC y desnaturalizados 5-7 minutos a 75°C. Las preparaciones de metafases fueron desnaturalizadas en 70% formamida/2X SSC, 3-5 minutos a 73°C y deshidratadas en series de etanol. La co-hibridación de los DNAs sobre las metafases normales se realizó en cámara húmeda durante 48-72 horas. Los lavados posteriores se realizaron con 50% formamida/2X SSC y 2X SSC a 45°C, seguidos de 0.2X SSC y tampón fosfato. Las preparaciones fueron contraténidas con Dapi/antifade. Se analizaron entre 10 y 20 metafases por caso con un microscopio epifluorescente Zeiss axioplan2 con video cámara CCD S31. El análisis de las imágenes se hizo usando el software ISIS v.3.1. Consideramos los ratios verde/rojo >1.2 y >1.5 como número de copias de DNA con ganancia y amplificación, respectivamente, y ratios <0.8 como pérdidas del número de copias de DNA.

RESULTADOS

El análisis por FISH del oncogén *MYCN* y de la integridad de la región 1p36 en los 60 casos estudiados permite dividir la serie tumoral en tres grupos. Grupo 1: amplificación del *MYCN*, con delección de 1p36 (n=29) y no delección de 1p36 (n=2); grupo 2: no amplificación del *MYCN* con delección de 1p36 (n=7) y no delección de 1p36 (n=14); grupo 3: ganancia del *MYCN* con delección de 1p36 (n=6), no delección de 1p36 (n=1) y desequilibrio de 1p36 (n=1). Los datos clínicos, histopatológicos y de ploidía relacionados con dichos grupos están resumidos en la tabla 1.

Todas las anomalías genéticas diagnosticadas por FISH son confirmadas en los 24 casos analizados con la técnica de CGH. La mayor parte de los casos (14/24) presentan asociados amplificación o ganancia de *MYCN*, delección de 1p36 y ganancia del brazo q del cromosoma 17 o presencia de cromosoma 17 en disomía (Fig. 1). En la tabla 2 se presenta la asociación de los grupos 1, 2 y 3 con los resultados de ploidía, número de desequilibrios cromosómicos y alteraciones cromosómicas presentes, descritas en la literatura como marcadores de posible valor pronóstico), INPC y las características clínicas.

La amplificación del *MYCN* (Tabla 2, Fig. 2-3) presente en 11 casos se asocia a delección de 1p36 (10/11) y ganancia del brazo largo del cromosoma 17 (7/11) o cromosoma 17 en disomía (4/11). La amplificación de *MYCN* (región 2p24) está asociada a ganancia de otras regiones del brazo corto del cromosoma 2 (p21-23) o ganancia completa del cromosoma 2. La delección de 1p se limita a la región 1p36 en un caso siendo en el resto de casos la delección del brazo corto del cromosoma 1 mayor; en tres casos la delección del brazo 1p es completa. Únicamente en un caso el cromosoma 1 está sin delección. Estos casos *MYCN* amplificados (11/24) presentan pocas ganancias y pérdidas completas cromosómicas y un número escaso de reestructuraciones parciales del resto de cromosomas (media de 3.9 reestructuraciones por tumor). Un caso presenta delección de 3p22 y en otro caso se observa una delección de 14q31 estando ausente en todos los casos la delección del brazo del cromosoma 11q. Ocho de estos casos son diploides y tres triploides. Todos los casos siguiendo la INPC presentan un histopronóstico desfavorable y todos excepto uno presentan un alto MKI junto con una alta expresión de Ki67. La edad media al diagnóstico es de 39.09 meses. A pesar de que todos los enfermos excepto 1 respondieron inicialmente al tratamiento, fallecieron 5 enfermos por progresión y uno por complicaciones.

La no amplificación del *MYCN* (Tabla 2, Fig. 4-5) presente en 7 casos se asocia a delección de 1p36 y a la ganancia del brazo q del cromosoma 17 en 5/24 casos. La delección de 1p se limita en todos los casos a la región 1p36 asociándose en tres casos a ganancias parciales de regiones en 1q,

un caso presenta una delección intersticial 1p33-35 y otro caso presenta el brazo 1p íntegro. Las ganancias y pérdidas cromosómicas parciales son frecuentes en estos casos sin amplificación de *MYCN* (media de 6'3 reestructuraciones por tumor), entre ellas la delección del 11q14-23 está presente en 4 casos, en dos de ellos asociada a delección de 3p21 y en los otros dos casos asociada a delección 14q31. Un caso presenta delección de 3p21 sin delección de 11q. Cinco de estos casos son diploides/tetraploides y dos triploides (ambos casos presentan delección de 11q). El histopronóstico en los cuatro casos valorables es desfavorable aunque únicamente dos casos presentan un alto IMK junto con una alta expresión de Ki67. La edad media al diagnóstico es de 51.57 meses. Todos los enfermos excepto 1 respondieron inicialmente al tratamiento falleciendo 2 enfermos por progresión. Dos casos se encuentran en progresión de su enfermedad.

Por último, la ganancia del *MYCN* (Tabla 2, Fig. 6-7) presente en 6 casos, se asocia a delección de 1p36 y a ganancia del brazo del cromosoma 17q en 5 casos; un caso no presenta delección de 1p36 sino desequilibrio de 1p36, estando en otro caso presente una ganancia completa del cromosoma 17. Cuatro casos presentan delecciones en 11q sin estar asociada a delección de 3p ni delección de 14q. Las ganancias y pérdidas cromosómicas parciales son frecuentes en todos los casos con ganancia de *MYCN* (media de 8'6 reestructuraciones por tumor). Cuatro de estos casos son diploides/tetraploides y dos triploides (uno de estos casos presenta delección de 11q). El histopronóstico en los cuatro casos valorables es desfavorable presentando un alto IMK junto con una alta expresión de Ki67. La edad media al diagnóstico se encuentra en 44.17 meses. Tres casos no responden al tratamiento, encontrándose en progresión de su enfermedad junto con un cuarto enfermo que tras responder inicialmente al tratamiento se encuentra en la misma situación.

DISCUSIÓN

La clasificación de riesgo dentro del NB se apoya actualmente en la histopatología y en la determinación de escasos factores clínicos y biológicos [1,34]. A pesar de que la estratificación en base a estos riesgos ha permitido una marcada mejora terapéutica, los datos sugieren un hipotético modelo donde el estadio final del NB es predeterminado en el momento que adquiere unos cambios genéticos específicos, por lo que nuestro objetivo principal en este estudio es la predicción más precisa del comportamiento de la enfermedad y de la valoración del riesgo de cada paciente al diagnóstico en base a cambios genéticos específicos, en el grupo de tumores neuroblásticos desfavorables de estadio avanzado (NB-HR).

Utilizando la técnica del FISH y de citometría estática hemos observado, en consonancia con estudios previos, que los 60 tumores neuroblásticos desfavorables de estadio avanzado recibidos en un periodo de tres años en el Centro de Referencia Nacional, son tumores en progresión con características genéticas heterogéneas. Por este motivo, nos planteamos aplicar la CGH metafásica, a un pequeño grupo de estos tumores para valorar la posibilidad de detectar nuevas diferencias genéticas, definir subtipos tumorales basados en estratificación genética y por tanto aplicar al diagnóstico de forma amplia esta técnica en el Centro de Referencia.

Con el método de CGH se obtiene una visión global o perfil genómico de la heterogeneidad genética y de las interrelaciones de sus desequilibrios [45,46]. Con el uso del análisis de CGH metafásico se detectan nuevas alteraciones genéticas, a pesar de que esta técnica tiene un límite de resolución de 10-20 Mb [47-50]. Subdividiendo los tumores únicamente según el estatus de *MYCN*, observamos que la ganancia del brazo largo del cromosoma 17 es la anomalía más frecuente compartida por los tres subgrupos seguida por la delección de 1p36. Recientemente Vandesompele y cols.[29] han detectado que en los tumores neuroblásticos favorables, la presencia del cromosoma 17 en disomía representa un signo de alto riesgo equiparable a la ganancia de 17q; por esta razón hemos englobado este dato en nuestro estudio junto con la ganancia de 17q. Estos hallazgos han sido descritos con alta frecuencia en los NB-HR pero no han sido utilizados todavía en grandes estudios cooperativos para conocer cuál es su valor pronóstico real [27,28]. Asimismo, en los grupos de *MYCN* no amplificado y ganancia de *MYCN* hemos observado tumores que presentan en común la pérdida del brazo largo del cromosoma 11, hallazgo no presente en el grupo de tumores con amplificación de *MYCN*. Debido a que los estudios realizados mediante las técnicas de CGH metafásica y micro-matrices de CGH con BAC, cDNA u oligonucleótidos que pueden detectar alteraciones genéticas y de expresión con una mayor resolución, están permitiendo la identificación en NB de patrones de expresión génica correlacionadas con desequilibrios genéticos específicos, en particular con la pérdida del cromosoma 11q [51-54], consideramos esta alteración como identificativa de un subgrupo tumoral. Así, en nuestro estudio podemos diferenciar dos grupos genéticos claros: el grupo 1 de tumores *MYCN* amplificados y el grupo 2 de tumores con del 11q.

El grupo 1 lo identificamos y definimos por la presencia de amplificación de *MYCN* no habiendo otros hallazgos genéticos específicos. Estos casos presentan muy pocas alteraciones genómicas, indicando que la amplificación de *MYCN* es suficiente para determinar en estos tumores un fenotipo agresivo, aunque ocurren otros cambios genéticos, incluidos la pérdida de 1p36 y la ganancia del 17q. La delección 1p asociada a la amplificación de *MYCN* afecta, en los diferentes tumores, a regiones amplias de dicho brazo cromosómico teniendo como consecuencia la pérdida de múltiples genes. Se observa así mismo la integridad del brazo largo del cromosoma 11. Dentro de los NB-HR los pacientes de este grupo presentaban una media de edad al diagnóstico menor (39.09 meses) y progresan rápidamente.

El grupo 2 presenta mayor número de anomalías estructurales, estando presente la delección 11q. Estos casos están incluidos tanto en el grupo *MYCN* no amplificado como en el grupo de ganancia de *MYCN*. Se han identificado genes cuyos patrones de expresión se correlacionan con la pérdida de 11q, apoyando el concepto de que la pérdida del 11q representa a un subtipo genético distinto dentro de los neuroblastomas. Por tanto consideramos que los tumores con la pérdida del cromosoma 11q forman un subgrupo diferenciado de tumores que a su vez pueden o no presentar asociada la ganancia del *MYCN*, pérdida del 1p, 3p o del 14q. Los tumores incluidos en este subgrupo crecen más despacio, siendo la media de edad al diagnóstico mayor (52 meses) y por tanto acumulan mayor número de anomalías genéticas secundarias, presumiblemente por el tiempo más largo de evolución.

El grupo de tumores que no presentan amplificación de *MYCN* ni delección del 11q sigue siendo un grupo genéticamente heterogéneo en donde no hemos podido detectar con la técnica de CGH metafásica anomalías comunes identificativas aunque sí están presentes la ganancia del 17q y/o el cromosoma 17 en disomía.

Como conclusión nuestro grupo ha identificado, utilizando la CGH metafásica, dos grupos genéticos diferenciados que pueden tener implicaciones diagnósticas y terapéuticas importantes. A pesar de tratarse de un reducido número de casos analizados y con un corto periodo de seguimiento, ha sido posible definir cambios genéticos asociados a los distintos subgrupos de pacientes. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de aplicar estas técnicas como complemento a las pruebas diagnósticas actuales.

	GRUPO 1 (A)	GRUPO 2 (NA)	GRUPO 3 (G)
nº pacientes	31 (11)	21 (7)	8 (6)
CLÍNICA			
SEXO			
varón	18 (7)	11 (2)	3 (2)
hembra	13 (4)	10 (5)	5 (4)
EDAD			
> 1 año	31 (11)	21 (7)	8 (6)
MEDIA EDAD (meses)	31,71 (39,09)	53,43 (51,57)	41,75 (44,17)
ESTADIO			
2,3	8 (4)	0	0
3	0	0	1
4	23 (7)	21 (7)	7 (6)
LOCALIZACIÓN			
abdominal	28 (11)	18 (7)	6 (5)
pélvica	0	0	1 (1)
torácico-abdominal	0	0	1
mixta	1	1	0
no valorable	2	2	0
RESPUESTA TTO. INICIAL			
sí	22 (10)	16 (5)	4 (3)
no	3 (1)	3 (1)	3 (3)
no valorable	6	2 (1)	1
SUPERVIVENCIA			
vivo (libre de enfermedad)	17 (5)	11 (2)	4 (2)
vivo con recaída	0	5 (2)	2 (2)
muerto x progresión/recaída	8 (3)	4 (2)	2 (2)
muerto x complicación	5 (3)	0	0
no valorable	0	1 (1)	0

(sigue tabla 1) -

HISTOPATOLOGIA			
% neuroblastos			
< 10%	1	1	0
10-60 %	15 (4)	13 (5)	3 (3)
>60%	14 (7)	7 (2)	5 (3)
no valorable	1	0	0
categoría y grado			
NB indiferenciado	6 (3)	5 (2)	2 (1)
NB en diferenciación	0	1	0
NB pobremente diferenciado	17 (6)	5 (4)	4 (3)
NB NOS + focos	1	5 (1)	0
GNB en diferenciación	0	4	1 (1)
Metástasis inclasificables	1 (1)	0	1 (1)
metástasis MO	3	1	0
metástasis ganglionares	2 (1)	0	0
MKI			
alto	23 (8)	4 (2)	4 (4)
intermedio	1 (1)	2 (1)	0
bajo	0	3 (1)	1
no valorable	7 (2)	12 (3)	3 (2)
KI 67			
alto	24 (9)	5 (2)	4 (4)
intermedia	0	0	0
bajo	0	4 (3)	1
no valorable	7 (2)	12 (2)	3 (2)
INPC			
desfavorable	24 (9)	10 (5)	5 (4)
favorable	0	5	1
no valorable	7 (2)	6 (2)	2 (2)

(sigue tabla 1) -

GENÉTICA			
PLOIDIA			
diploide/tetraploide	19 (8)	6 (5)	5 (4)
triploide	9 (3)	9 (2)	3 (2)
no valorable	3	6	0
FISH Nmyc			
amplificado	31 (11)	0	0
no amplificado	0	21 (7)	0
ganancia	0	0	8 (6)
no valorable	0	0	0
FISH 1p36			
delección	29 (10)	7 (5)	6 (5)
no delección	2 (1)	14 (2)	1
desbalance	0	0	1 (1)

Tabla 1. Datos clínicos, histopatológicos y genético de los 60 casos de NB-HR agrupados según el estatus de MYCN. (A): Amplificación de MYCN, (NA): No Amplificación de MYCN y (G): Ganancia de MYCN. Los números entre paréntesis corresponden a los casos analizados también por CGH.

	GRUPO 1 (A)	GRUPO 2 (NA)	GRUPO 3 (G)
nº pacientes	11	7	6
PLOIDIA			
2n / 4n	8	5	4
3n	3	2	3
nº desequilibrios numéricos	0,5	1,3	1,6
nº desequilibrios estructurales	3,9	5,3	8,5
CROMOSOMA 1			
pérdida 1p	10	5	5
ganancia 1p	0	3	1
normal	1	1	0
CROMOSOMA 2			
amplificación 2p24	1	0	0
ganancia 2p	4	0	6
ganancia 2	2	1	0
normal	0	5	0
CROMOSOMA 3			
pérdida 3p	2	3	0
pérdida 3	0	0	0
normal	6	4	6
CROMOSOMA 4			
pérdida 4p	0	0	1
pérdida 4	0	0	0
normal	10	5	4
CROMOSOMA 7			
ganancia 7q	0	2	2
ganancia 7	0	2	0
normal	11	3	2
CROMOSOMA 9			
pérdida 9p	1	2	1
pérdida 9	1	0	1
normal	8	5	4
CROMOSOMA 11			
pérdida 11p	0	4	4
pérdida 11	0	0	0
normal	9	3	2
CROMOSOMA 14			
pérdida 14q	1	2	0
pérdida 14	0	0	0
normal	10	5	5
CROMOSOMA 17			
ganancia 17q	7	5	5
ganancia 17	0	0	1
normal	4	2	0
CROMOSOMA 18			
ganancia 18q	0	1	2
ganancia 18	0	1	1
normal	11	5	3

Tabla 2. Datos de ploidía y desequilibrios cromosómicos (de los cromosomas descritos en la literatura como marcadores de posible valor pronóstico) de los 24 casos estudiados por CGH.

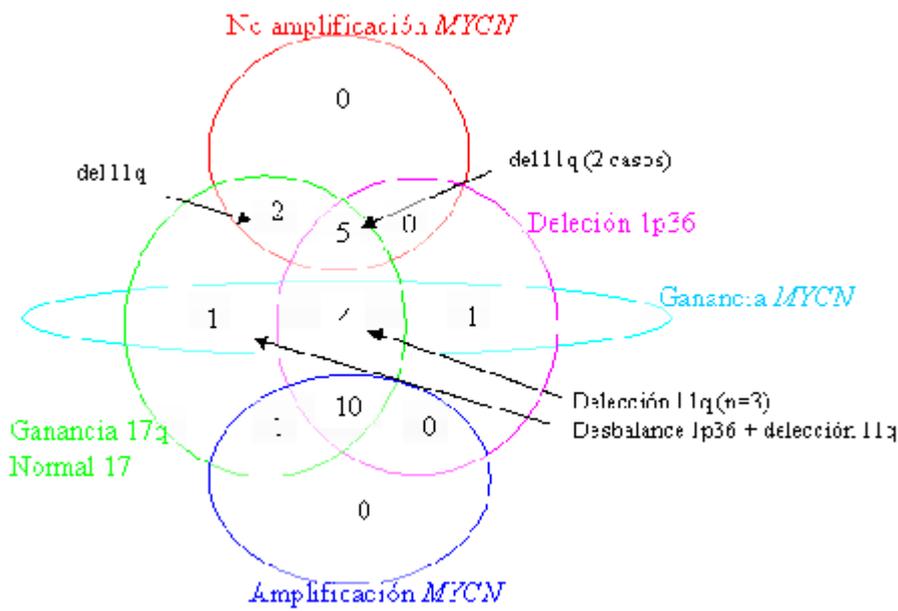


Fig. 1. Relaciones entre MYCN, 1p36, cromosoma 17 y 11q en los 24 casos analizados por CGH.

GRUPO 1 AMPLIFICACIONE

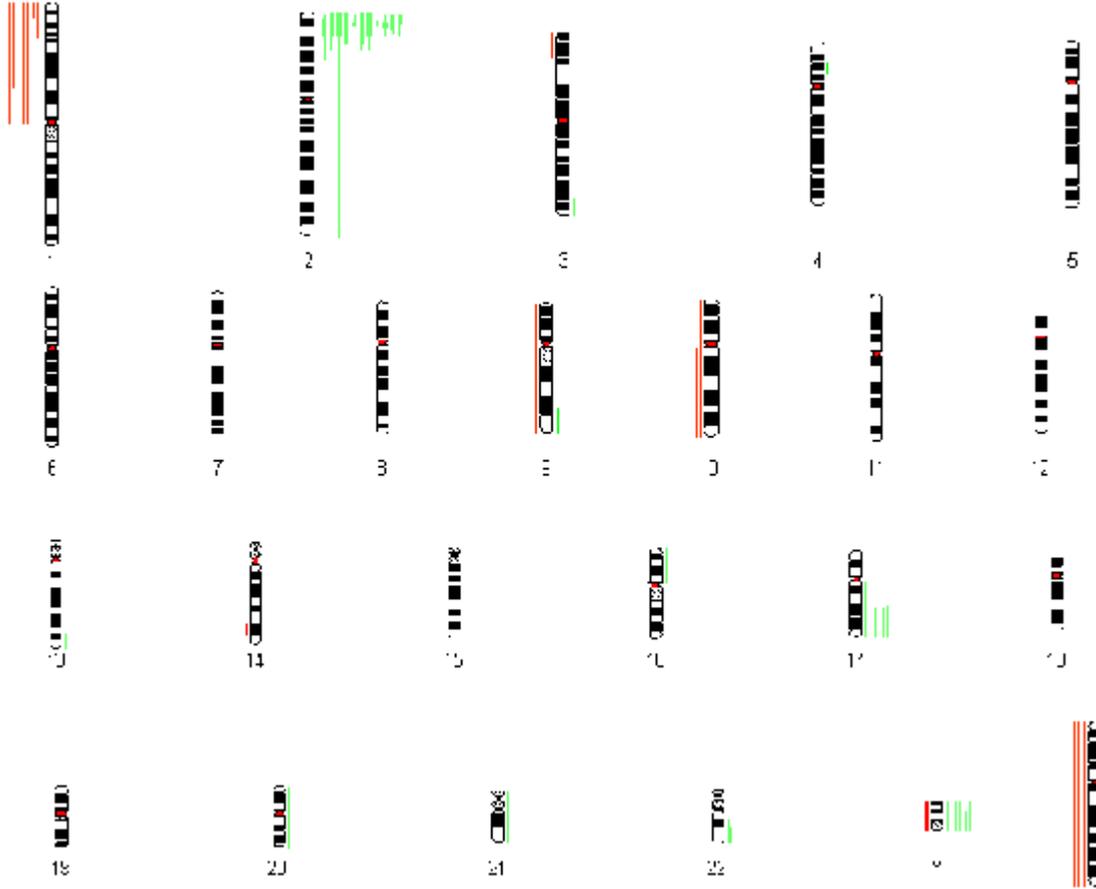


Fig. 2. Resumen de perfiles de CGH de amplificaciones (barras verde gruesas), ganancias (barras verde finas), y pérdidas (barras rojas) en el grupo de los casos con amplificación de MYCN

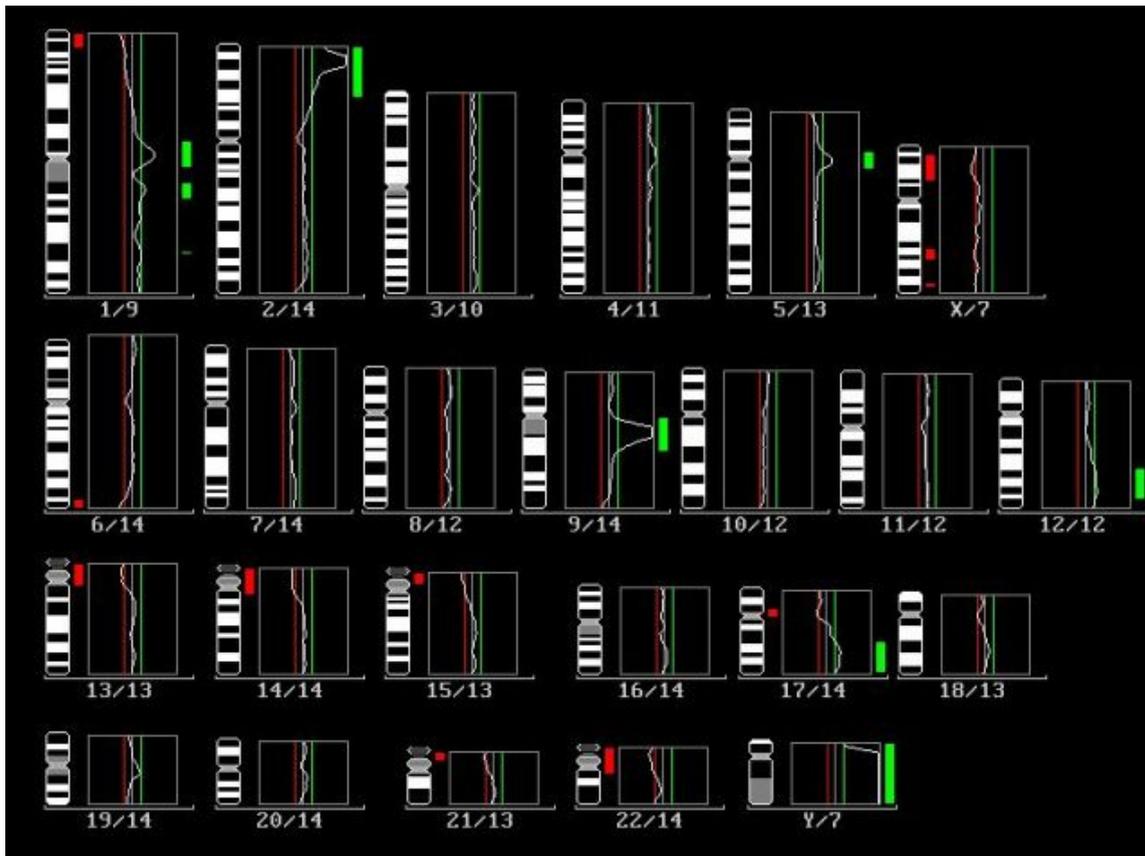


Fig. 3. Perfil de CGH de un caso amplificado.

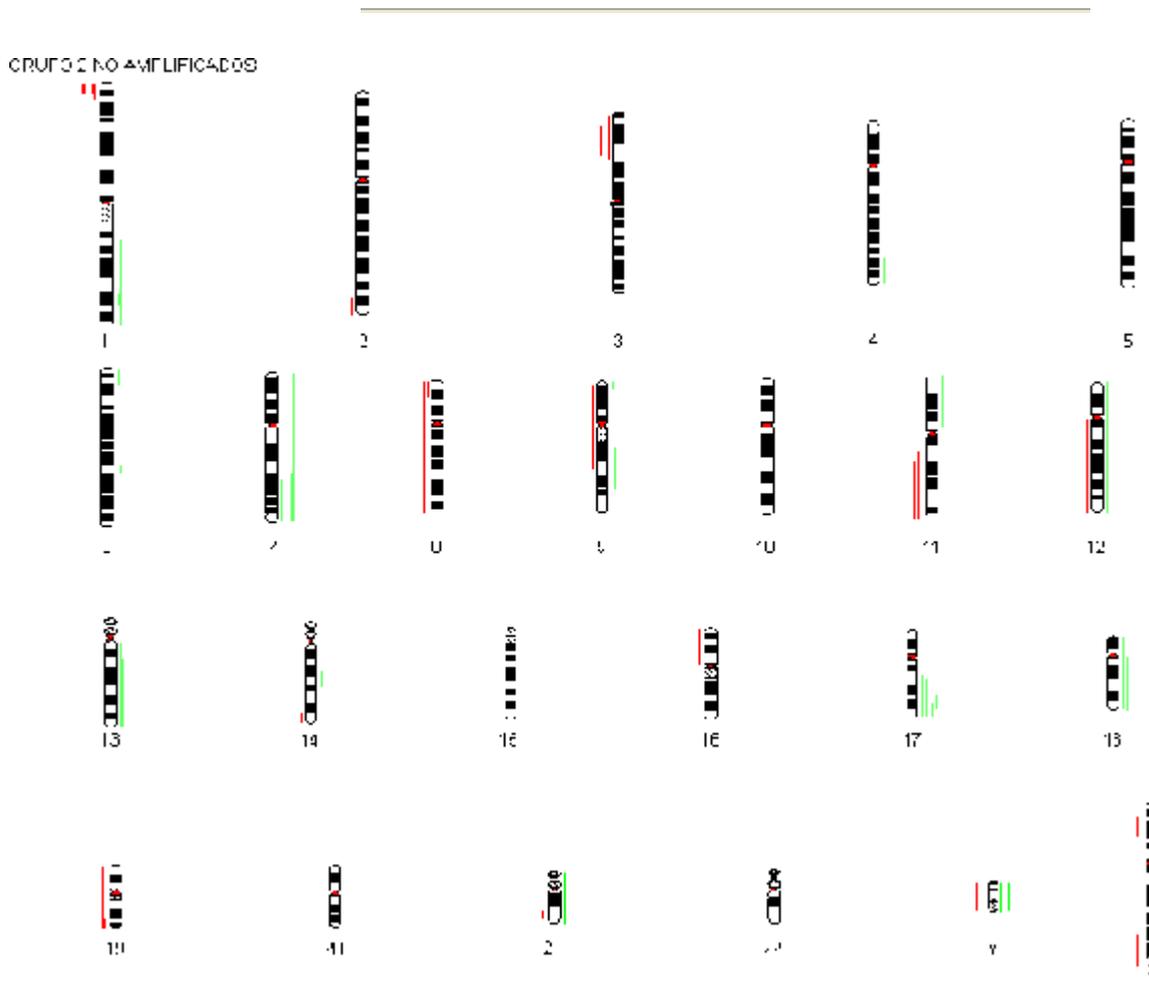


Fig. 4. Resumen de perfiles de CGH de casos no amplificados (barras verde finas), y pérdidas (barras rojas) en el grupo de los casos sin amplificación

de MYCN.

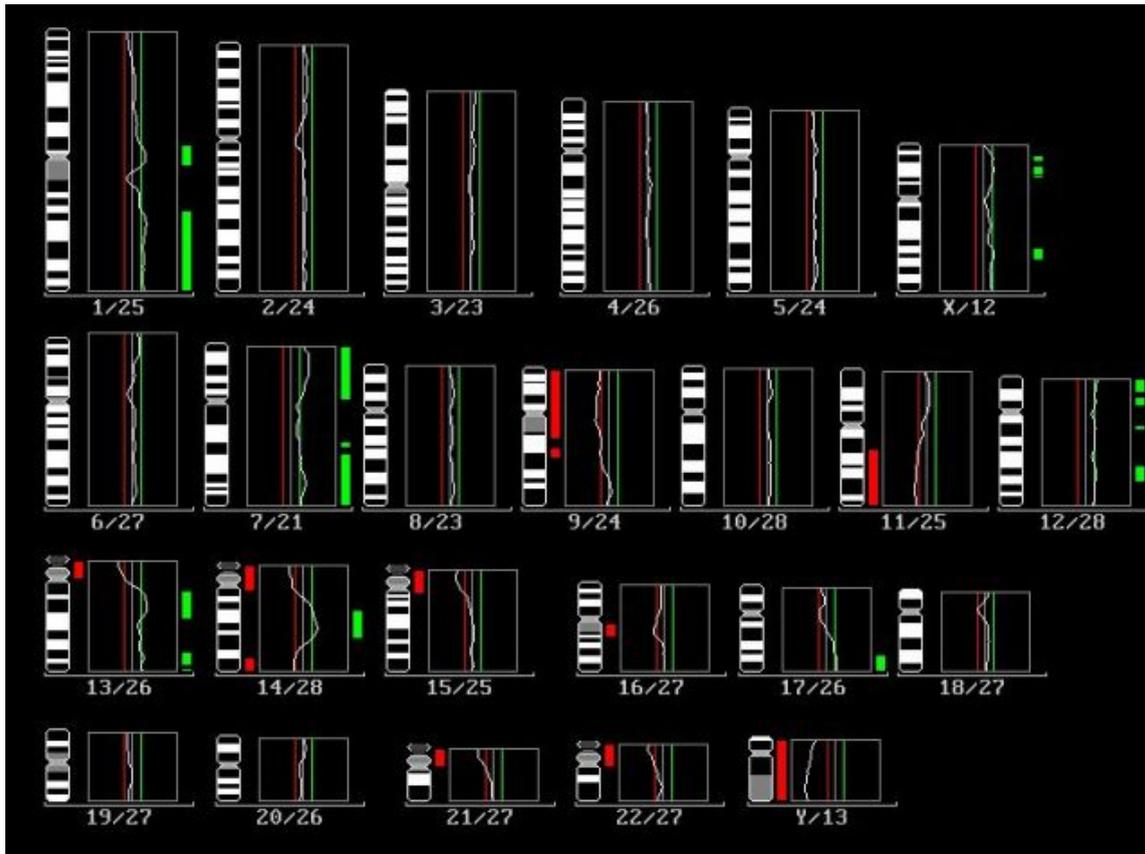


Fig. 5. Perfil de CGH de un caso no amplificado

GRUPO DE GANANCIAS

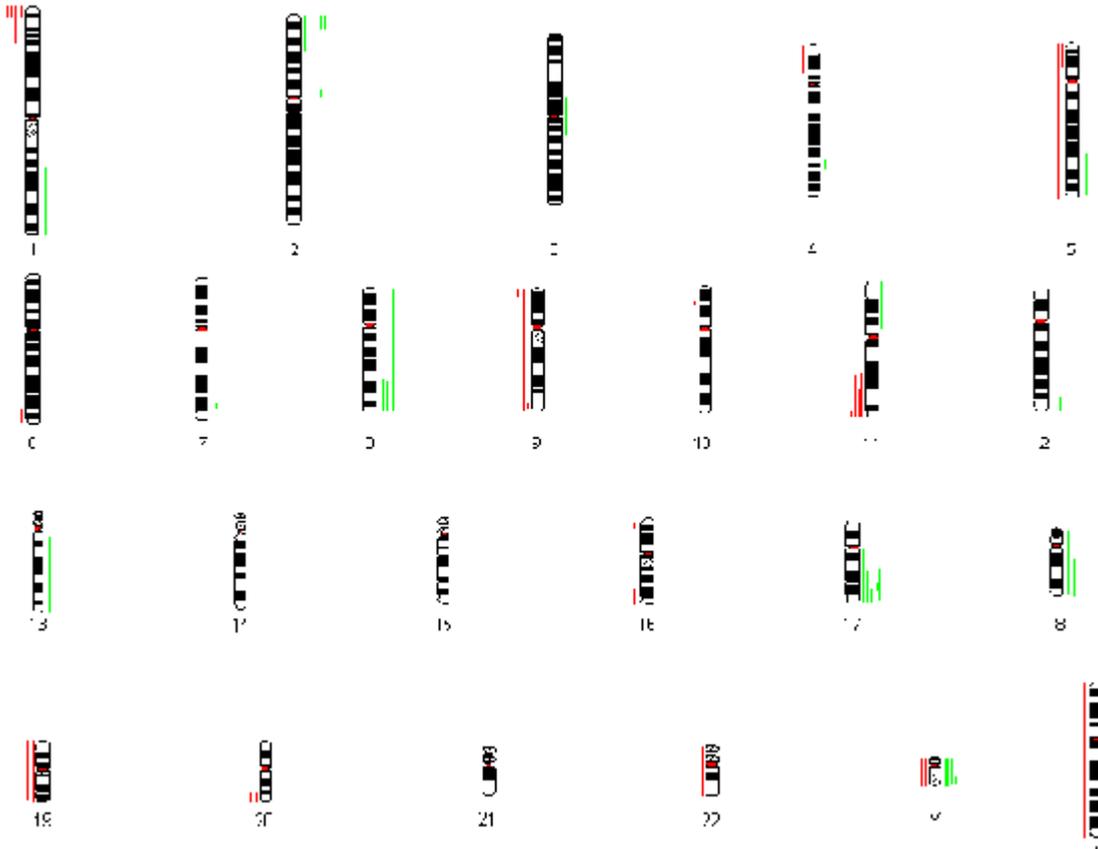


Fig. 6. Resumen de perfiles de CGH de casos con ganancia (barras verde finas), y pérdidas (barras rojas) en el grupo de los casos sin amplificación de MYCN.

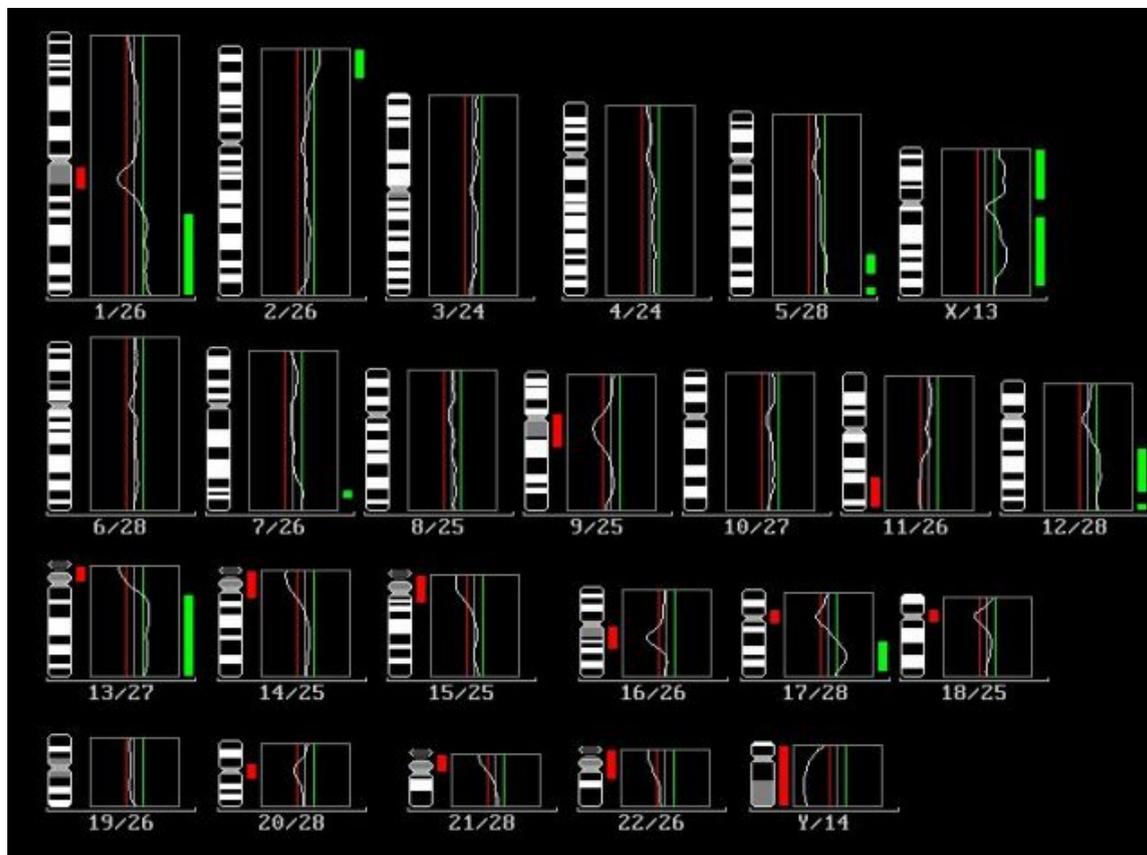


Fig. 7. Perfil de CGH de un caso con ganancia.

Bibliografía

1. Cotterill, S.J., Pearson, A.D., Pritchard, J., Foot, A.B., Roald, B., Kohler, J.A. and Imeson, J. (2000) Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: results of The European Neuroblastoma Study Group 'Survey' 1982-1992. *Eur J Cancer*, **36**, 901-8.
2. Evans, A.E., Silber, J.H., Shpilsky, A. and D'Angio, G.J. (1996) Successful management of low-stage neuroblastoma without adjuvant therapies: a comparison of two decades, 1972 through 1981 and 1982 through 1992, in a single institution. *J Clin Oncol*, **14**, 2504-10.
3. Brodeur, G.M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N.L., Castel, V., Castleberry, R.P., De Bernardi, B., Evans, A.E., Favrot, M., Hedborg, F. and et al. (1993) Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*, **11**, 1466-77.
4. Chatten, J., Shimada, H., Sather, H.N., Wong, K.Y., Siegel, S.E. and Hammond, G.D. (1988) Prognostic value of histopathology in advanced neuroblastoma: a report from the Childrens Cancer Study Group. *Hum Pathol*, **19**, 1187-98.
5. Joshi, V.V., Rao, P.V., Cantor, A.B., Altshuler, G., Shuster, J.J. and Castleberry, R.P. (1996) Modified histologic grading of neuroblastomas by replacement of mitotic rate with mitosis karyorrhexis index. A clinicopathologic study of 223 cases from the Pediatric Oncology Group. *Cancer*, **77**, 1582-8.
6. Shimada, H., Stram, D.O., Chatten, J., Joshi, V.V., Hachitanda, Y., Brodeur, G.M., Lukens, J.N., Matthay, K.K. and Seeger, R.C. (1995) Identification of subsets of neuroblastomas by combined histopathologic and N-myc analysis. *J Natl Cancer Inst*, **87**, 1470-6.
7. Shimada, H., Chatten, J., Newton, W.A., Jr., Sachs, N., Hamoudi, A.B., Chiba, T., Marsden, H.B. and Misugi, K. (1984) Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst*, **73**, 405-16.
8. Shimada, H., Umehara, S., Monobe, Y., Hachitanda, Y., Nakagawa, A., Goto, S., Gerbing, R.B., Stram, D.O., Lukens, J.N. and Matthay, K.K. (2001) International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*, **92**, 2451-61.
9. Shimada, H., Ambros, I.M., Dehner, L.P., Hata, J., Joshi, V.V., Roald, B., Stram, D.O., Gerbing, R.B., Lukens, J.N., Matthay, K.K. and Castleberry, R.P. (1999) The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*, **86**, 364-72.
10. Cox, D., Yuncken, C. and Spriggs, A.I. (1965) Minute Chromatin Bodies in Malignant Tumours of Childhood. *Lancet*, **62**, 55-8.
11. Brodeur, G.M., Sekhon, G. and Goldstein, M.N. (1977) Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer*, **40**, 2256-63.
12. Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K.H., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M. and Trent, J. (1983) Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*, **305**, 245-8.
13. Gilbert, F., Feder, M., Balaban, G., Brangman, D., Lurie, D.K., Podolsky, R., Rinaldt, V., Vinikoor, N. and Weisband, J. (1984) Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. *Cancer Res*, **44**, 5444-9.
14. Maris, J.M. and Matthay, K.K. (1999) Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol*, **17**, 2264-79.
15. Hayashi, Y., Habu, Y., Fujii, Y., Hanada, R. and Yamamoto, K. (1986) Chromosome abnormalities in neuroblastomas found by VMA mass screening. *Cancer Genet Cytogenet*, **22**, 363-4.
16. Look, A.T., Hayes, F.A., Nitschke, R., McWilliams, N.B. and Green, A.A. (1984) Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med*, **311**, 231-5.
17. Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E. and Bishop, J.M. (1984) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*, **224**, 1121-4.
18. Tsuda, T., Obara, M., Hirano, H., Gotoh, S., Kubomura, S., Higashi, K., Kuroiwa, A., Nakagawara, A., Nagahara, N. and Shimizu, K. (1987) Analysis of N-myc amplification in relation to disease stage and histologic types in human neuroblastomas. *Cancer*, **60**, 820-6.
19. Christiansen, H., Sahin, K., Berthold, F., Hero, B., Terpe, H.J. and Lampert, F. (1995) Comparison of DNA aneuploidy, chromosome 1 abnormalities, MYCN amplification and CD44 expression as prognostic factors in neuroblastoma. *Eur J Cancer*, **31A**, 541-4.
20. Christiansen, H. and Lampert, F. (1988) Tumour karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma. *Br J Cancer*, **57**, 121-6.
21. Maris, J.M., White, P.S., Beltinger, C.P., Sulman, E.P., Castleberry, R.P., Shuster, J.J., Look, A.T. and Brodeur, G.M. (1995) Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma. *Cancer Res*, **55**, 4664-9.
22. Caron, H., van Sluis, P., de Kraker, J., Bokkerink, J., Egeler, M., Laureys, G., Slater, R., Westerveld, A., Voute, P.A. and Versteeg, R. (1996) Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*, **334**, 225-30.
23. Plantaz, D., Mohapatra, G., Matthay, K.K., Pelliar, M., Seeger, R.C. and Feuerstein, B.G. (1997) Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol*, **150**, 81-9.
24. Brinkschmidt, C., Christiansen, H., Terpe, H.J., Simon, R., Boecker, W., Lampert, F. and Stoerckel, S. (1997) Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of neuroblastomas--an important methodological approach in paediatric tumour pathology. *J Pathol*, **181**, 394-400.
25. Vandesompele, J., Van Roy, N., Van Gele, M., Laureys, G., Ambros, P., Heimann, P., Devalck, C., Schuurin, E., Brock, P., Otten, J., Gyselinck, J., De Paepe, A. and Speleman, F. (1998) Genetic heterogeneity of neuroblastoma studied by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, **23**, 141-52.
26. Bown, N., Cotterill, S., Lastowska, M., O'Neill, S., Pearson, A.D., Plantaz, D., Meddeb, M., Danglot, G., Brinkschmidt, C., Christiansen, H., Laureys, G., Speleman, F., Nicholson, J., Bernheim, A., Betts, D.R., Vandesompele, J. and Van Roy, N. (1999) Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*, **340**, 1954-61.
27. Janoueix-Lerosey, I., Penther, D., Thioux, M., de Cremoux, P., Derre, J., Ambros, P., Vielh, P., Benard, J., Aurias, A. and Delattre, O. (2000) Molecular analysis of chromosome arm 17q gain in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*, **28**, 276-84.
28. Cunsolo, C.L., Biccocchi, M.P., Petti, A.R. and Tonini, G.P. (2000) Numerical and structural aberrations in advanced neuroblastoma tumours by CGH analysis: survival correlates with chromosome 17 status. *Br J Cancer*, **83**, 1295-300.
29. Vandesompele, J., Baudis, M., De Preter, K., Van Roy, N., Ambros, P., Bown, N., Brinkschmidt, C., Christiansen, H., Combaret, V., Lastowska, M., Nicholson, J., O'Meara, A., Plantaz, D., Stallings, R., Bricard, B., Van den Broecke, C., De Bie, S., De Paepe, A., Laureys, G. and Speleman, F. (2005) Unequivocal delineation of clinicogenetic subgroups and development of a new model for improved outcome prediction in neuroblastoma. *J Clin Oncol*, **23**, 2280-99.
30. Takita, J., Hayashi, Y., Kohno, T., Shiseki, M., Yamaguchi, N., Hanada, R., Yamamoto, K. and Yokota, J. (1995) Allelotype of neuroblastoma. *Oncogene*, **11**, 1829-34.
31. Ejekar, K., Aburatani, H., Abrahamsson, J., Kogner, P. and Martinsson, T. (1998) Loss of heterozygosity of 3p markers in neuroblastoma tumours implicate a tumour-suppressor locus distal to the FHIT gene. *Br J Cancer*, **77**, 1787-91.
32. Guo, C., White, P.S., Weiss, M.J., Hogarty, M.D., Thompson, P.M., Stram, D.O., Gerbing, R., Matthay, K.K., Seeger, R.C., Brodeur, G.M. and Maris, J.M. (1999) Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene*, **18**, 4948-57.
33. Luttkhuis, M.E., Powell, J.E., Rees, S.A., Genus, T., Chughtai, S., Ramani, P., Mann, J.R. and McConville, C.M. (2001) Neuroblastomas with chromosome 11q loss and single copy MYCN comprise a biologically distinct group of tumours with adverse prognosis. *Br J Cancer*, **85**, 531-7.
34. Westermann, F. and Schwab, M. (2002) Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Lett*, **184**, 127-47.
35. Maris, J.M., Weiss, M.J., Guo, C., Gerbing, R.B., Stram, D.O., White, P.S., Hogarty, M.D., Sulman, E.P., Thompson, P.M., Lukens, J.N.,

- Matthay, K.K., Seeger, R.C. and Brodeur, G.M. (2000) Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *J Clin Oncol*, **18**, 1888-99.
36. Schwab, M., Westermann, F., Hero, B. and Berthold, F. (2003) Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol*, **4**, 472-80.
37. Brodeur, G.M. (2003) Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*, **3**, 203-16.
38. Castel, V., Canete, A., Navarro, S., Garcia-Miguel, P., Melero, C., Acha, T., Navajas, A. and Badal, M.D. (2001) Outcome of high-risk neuroblastoma using a dose intensity approach: improvement in initial but not in long-term results. *Med Pediatr Oncol*, **37**, 537-42.
39. Kaneko, M., Tsuchida, Y., Mugishima, H., Ohnuma, N., Yamamoto, K., Kawa, K., Iwafuchi, M., Sawada, T. and Suita, S. (2002) Intensified chemotherapy increases the survival rates in patients with stage 4 neuroblastoma with MYCN amplification. *J Pediatr Hematol Oncol*, **24**, 613-21.
40. Castel, V., Canete, A., Noguera, R., Navarro, S. and Oltra, S. (2005) [Neuroblastoma.]. *Clin Transl Oncol*, **7**, 133-45.
41. Bocking, A., Giroud, F. and Reith, A. (1995) Consensus report of the European Society for Analytical Cellular Pathology task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol*, **17**, 1-7.
42. Navarro, S., Noguera, R., Pellin, A., Mejia, C., Ruiz, A. and Llombart-Bosch, A. (2000) Pleomorphic anaplastic neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*, **35**, 498-502.
43. Noguera, R., Canete, A., Pellin, A., Ruiz, A., Tasso, M., Navarro, S., Castel, V. and Llombart-Bosch, A. (2003) MYCN gain and MYCN amplification in a stage 4S neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*, **140**, 157-61.
44. Kallioniemi, O.P., Kallioniemi, A., Piper, J., Isola, J., Waldman, F.M., Gray, J.W. and Pinkel, D. (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, **10**, 231-43.
45. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F. and Pinkel, D. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, **258**, 818-21.
46. Lastowska, M., Nacheva, E., McGuckin, A., Curtis, A., Grace, C., Pearson, A. and Bown, N. (1997) Comparative genomic hybridization study of primary neuroblastoma tumors. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Genes Chromosomes Cancer*, **18**, 162-9.
47. Breen, C.J., O'Meara, A., McDermott, M., Mullarkey, M. and Stallings, R.L. (2000) Coordinate deletion of chromosome 3p and 11q in neuroblastoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, **120**, 44-9.
48. Plantaz, D., Vandesompele, J., Van Roy, N., Lastowska, M., Bown, N., Combaret, V., Favrot, M.C., Delattre, O., Michon, J., Benard, J., Hartmann, O., Nicholson, J.C., Ross, F.M., Brinkschmidt, C., Laureys, G., Caron, H., Matthay, K.K., Feuerstein, B.G. and Speleman, F. (2001) Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification. *Int J Cancer*, **91**, 680-6.
49. Lastowska, M., Cullinane, C., Variend, S., Cotterill, S., Bown, N., O'Neill, S., Mazzocco, K., Roberts, P., Nicholson, J., Ellershaw, C., Pearson, A.D. and Jackson, M.S. (2001) Comprehensive genetic and histopathologic study reveals three types of neuroblastoma tumors. *J Clin Oncol*, **19**, 3080-90.
50. Schleiermacher, G., Janoueix-Lerosey, I., Combaret, V., Derre, J., Couturier, J., Aurias, A. and Delattre, O. (2003) Combined 24-color karyotyping and comparative genomic hybridization analysis indicates predominant rearrangements of early replicating chromosome regions in neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*, **141**, 32-42.
51. Guo, C., White, P.S., Hogarty, M.D., Brodeur, G.M., Gerbing, R., Stram, D.O. and Maris, J.M. (2000) Deletion of 11q23 is a frequent event in the evolution of MYCN single-copy high-risk neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol*, **35**, 544-6.
52. Spitz, R., Hero, B., Ernestus, K. and Berthold, F. (2003) FISH analyses for alterations in chromosomes 1, 2, 3, and 11 define high-risk groups in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*, **41**, 30-5.
53. McArdle, L., McDermott, M., Purcell, R., Grehan, D., O'Meara, A., Breatnach, F., Catchpole, D., Culhane, A.C., Jeffery, I., Gallagher, W.M. and Stallings, R.L. (2004) Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in neuroblastoma displaying loss of chromosome 11q. *Carcinogenesis*, **25**, 1599-609.
54. Scaruffi, P., Valent, A., Schramm, A., Astrahantseff, K., Eggert, A. and Tonini, G.P. (2005) Application of microarray-based technology to neuroblastoma. *Cancer Lett*, **228**, 13-20.