

Perfil genómico del neuroblastoma de alto riesgo mediante hibridación genómica comparada

R. Noguera Salvá^a, M. Piqueras Franco^a, A. Ruiz Saurí^a, A. Llombart-Bosch^a, V. Castel Sánchez^b y S. Navarro Fos^a

^aDepartamento de Patología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia. ^bUnidad Oncopediatria. Hospital La Fe. Valencia. España.

El neuroblastoma presenta alteraciones genéticas que predicen su evolución clínica. Ganancias cromosómicas completas están asociadas a estadios clínicos no avanzados y evolución favorable, mientras que pérdidas de 1p, ganancia de 17q y amplificación del gen *MYCN* (*MNA*) son indicativas de estadios clínicos avanzados y pronóstico desfavorable. Son neuroblastomas de alto riesgo (NB-HR) los presentes en niños mayores de un año: estadio 4 o *MNA* en cualquier estadio de enfermedad, excluyendo estadio 1. El pronóstico de estos enfermos es malo, incluso con tratamientos agresivos. Sólo *MNA* confiere valor pronóstico negativo. Se remitieron al Centro de Referencia Nacional del neuroblastoma 60 casos de NB-HR. En todos analizamos *MYCN* y 1p36 con la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y en 24 de ellos el perfil genómico con la técnica de hibridación genómica comparada (CGH). Mediante FISH detectamos 31 casos *MNA* presentando 29 pérdida de 1p36; 21 casos no amplificados (*MNNA*) con pérdida de 1p36 en 7 casos; y 8 casos con ganancia del gen *MYCN* (*MNG*), seis con pérdida de 1p36. Mediante CGH detectamos otros reordenamientos cromosómicos. De 11 casos *MNA* ninguno presentó pérdida en 11q, todos presentaban disomía del 17 o ganancia 17q. De 7 casos *MNNA*, cuatro mostraron pérdida de 11q, 2 con pérdida de 3p. Todos mostraron disomía del 17 o ganancia 17q. De 6 casos *MNG*, cuatro mostraron pérdida de 11q y cinco disomía del 17 o ganancia 17q. El estudio del perfil genómico en NB-HR revela la interacción de alteraciones genéticas cuyo significado pronóstico debe ser evaluado para establecer nuevos criterios terapéuticos.

Palabras clave:

Hibridación genómica comparada. Hibridación in situ fluorescente. MYCN. Neuroblastoma.

GENOMIC PROFILE IN HIGH RISK NEUROBLASTOMA BY COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION

Different subtypes of neuroblastoma (NB) carry associated genetic aberrations that predict their clinical course. Whole chromosome gains are usually associated with early clinical stages and good prognosis, while 1p deletion, 17q gain and *MYCN* amplification (*MNA*) are related to advanced stages and poor prognosis. High-risk neuroblastomas (NB-HR) include NB in children aged more than 1 year old, either stage 4 or any stages showing *MNA* except stage 1. The prognosis of NB-HR patients remains poor, despite aggressive therapy. Only *MNA* confers poor prognosis. Between January 2000 and February 2005, tumoral specimens from 60 patients with NB-HR were sent to the Spanish Reference Center for NB biological studies. In all cases, *MYCN* together with 1p36 status was analyzed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Comparative genomic hybridization (CGH) was performed in 24 cases. Using FISH we detected 31 *MNA* cases including 29 with 1p36 deletion; there were 21 cases without *MYCN* amplification (*MNNA*) but 7 of these had 1p36 deletion; 8 cases showed *MYCN* gain (*MNG*) but 6 of these had 1p36 deletion. CGH showed other chromosomal alterations. Of 11 *MNA* cases, none had 11q loss and all of them showed 17q gain or 17 disomy. Of the 7 *MNNA* cases, there were 4 with 11q loss including 2 with 3p loss and all presented 17q gain or 17 disomy. The 6 *MNG* cases included 4 cases with 11q loss and 5 cases with 17q gain or 17 disomy. Genomic profiling by CGH in NB-HR confirms the interaction among genetic alterations, the prognostic significance of which should be evaluated to establish new treatment criteria.

Financiado por el fondo de investigación sanitaria, proyectos: FIS G03/089 y PI04/0822, Madrid.

Correspondencia: Dra. Rosa Noguera Salvá.

Laboratorio de Patología Molecular. Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia. Avda. Blasco Ibáñez, 17. 46010 Valencia. España.
Correo electrónico: rosa.noguera@uv.es

Recibido en octubre de 2005.

Aceptado para su publicación en febrero de 2006.

Key words:

Comparative genomic hybridization. Fluorescence in situ hybridization. MYCN. Neuroblastoma.

INTRODUCCIÓN

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente de la infancia y se caracteriza 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 varían ampliamente^{1,2}. La identificación de los factores pronósticos requiere siempre realizar una biopsia, y que esta 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 International Neuroblastoma Staging System (INSS)³, que se usan junto con datos biológicos (histopatológicos y genéticos) para crear nuevos grupos terapéuticos. Los análisis histopatológicos tienen un importante valor para conocer la biología tumoral^{4,5}. En 1984, Shimada et al⁶ describieron un sistema de clasificación basado en la cantidad de la estroma schwanniana, el grado de diferenciación, el índice de mitosis-cariorrexis (MKI) y la edad al diagnóstico, que distinguía dos grupos de pronóstico histológico: favorable y desfavorable. Actualmente se utiliza la International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC)⁷, basada en la anterior. Las anomalías genéticas características de estos tumores se conocen desde hace tiempo y algunas de ellas poseen claro valor pronóstico⁸⁻¹⁰. Entre los marcadores genéticos de neuroblastomas agresivos se incluyen la diploidía o tetraploidía¹¹, la amplificación del gen *MYCN* (*MNA*)^{12,13}, la delección (del) 1p36^{14,15}, y la ganancia de 17q (+17q)^{16,17}. Esta última reestructuración, que se presenta con una alta frecuencia, puede resultar de una translocación no balanceada del 17q con más de 20 regiones cromosómicas diferentes¹⁸. Recientemente, se ha encontrado que los tumores con disomía del cromosoma 17 y un presumible estadio favorable pueden representar un subgrupo de riesgo alto¹⁹. Además, se han descrito como marcadores de posible valor pronóstico las pérdidas frecuentes de heterozigosidad (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%)²⁰⁻²³. Se han descrito asociaciones entre pérdidas de 11q, 3p y 14q, que se correlacionan inversamente con *MNA* y del 1p, y que identifica subgrupos diferentes de tumores avanzados²⁰⁻²².

La edad, el estadio y *MNA* son los marcadores con valor pronóstico independiente. A ellos se añaden, con menor valor, la clasificación histológica de Shimada, la del 1p y la ploidía. Otros marcadores biológicos han demostrado valor pronóstico en estudios aislados, pero no han sido utilizados todavía en grandes estudios cooperativos para

conocer cuál es su valor pronóstico real²⁴⁻²⁶. Los enfermos se clasifican, por tanto, en grupos de riesgo con recomendaciones terapéuticas diferentes para cada uno de ellos. El grupo de alto riesgo (NB-HR) es el más numeroso (45%), compuesto por pacientes mayores de un año con estadio 4, aunque también incluye a cualquier otro estadio de la enfermedad con *MNA*, excluyendo el estadio 1²⁷. El pronóstico de estos enfermos es malo, incluso con tratamientos muy agresivos. Sólo la *MNA* confiere un valor pronóstico negativo a los tumores que la presentan^{28,29}.

En este estudio se plantea la utilidad de la técnica de hibridación genómica comparada (CGH) que permite examinar el perfil genómico de un grupo de pacientes con pronóstico desfavorable para 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 (Departamento de Patología, Universidad de Valencia) con el correspondiente consentimiento informado. La edad de los pacientes oscilaba entre 14 meses y 15 años. El diagnóstico de neuroblastoma y estadiaje fue realizado según la INSS: estadio 2/3 (n = 9), estadio 4 (n = 51). Fueron estudiados 52 tumores primarios y ocho metástasis: 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 alto riesgo.

Histopatología

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

Análisis genéticos

El análisis genético de los tumores se realizó mediante la técnica de citometría estática (50 casos), de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) (60 casos) y de CGH (24 casos). Para ello se realizaron secciones de las piezas incluidas en parafina, improntas celulares y se extrajo ADN 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. El índice de ADN fue determinado por citome-

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

	<i>MNA</i>	<i>MNNA</i>	<i>MNG</i>
Nº pacientes	11	7	6
Ploidía			
2n/4n	8	5	4
3n	3	2	3
Media desequilibrios numéricos	0,5	1,3	1,6
Media desequilibrios estructurales	3,9	6,3	8,6
Cromosoma 1			
Pérdida 1p	10	5	5
Ganancia 1q	0	3	1
Cromosoma 2			
Amplificación 2p24	11	0	0
Ganancia 2p	4	0	6
Ganancia 2	2	1	0
Cromosoma 3			
Pérdida 3p	2	3	0
Pérdida 3	0	0	0
Cromosoma 4			
Pérdida 4p	0	0	1
Pérdida 4	0	0	0
Cromosoma 7			
Ganancia 7q	0	2	2
Ganancia 7	0	2	0
Cromosoma 9			
Pérdida 9p	1	2	1
Pérdida 9	1	0	1
Cromosoma 11			
Pérdida 11q	0	4	4
Pérdida 11	0	0	0
Cromosoma 14			
Pérdida 14q	1	2	0
Pérdida 14	0	0	0
Cromosoma 17			
Ganancia 17q	7	5	5
Ganancia 17	0	0	1
Disomía	4	2	0
Cromosoma 18			
Ganancia 18q	0	1	2
Ganancia 18	0	1	1

Se resalta la amplificación 2p24 y la del 11q como alteraciones inversamente relacionadas.

MNA: amplificación de *MYCN*; *MNNA*: no amplificación de *MYCN*; *MNG*: ganancia de *MYCN*.

giones del brazo corto del cromosoma 2 (p21-23) o ganancia completa del cromosoma 2. La del en 1p se limita a la región 1p36 en un caso y es mayor en el resto de casos (en tres de ellos es completa). Únicamente en un caso el cromosoma 1 está sin del. Estos casos *MNA* 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 del 3p22 y en otro caso se ob-

serva una del 14q31 estando ausente en todos los casos la del 11q. Ocho de estos casos son diploides y tres triploides. Todos los casos según la INPC presentan un pronóstico histológico 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 uno respondieron inicialmente al tratamiento, fallecieron 5 enfermos por progresión y uno por complicaciones.

La *MNNA* (fig. 3) presente en 7 casos (29%) se asocia a del 1p36 y a +17q en el 71% de los casos (5/7). La del 1p se limita en todos los casos a la región 1p36 y se asocia en 3 casos a ganancias parciales de regiones en 1q, un caso presenta una del intersticial 1p33-35 y otro caso presenta el brazo 1p íntegro. Las ganancias y pérdidas cromosómicas parciales son frecuentes en estos casos *MNNA* (media de 6,3 reestructuraciones por tumor), entre ellas la del 11q14-23 está presente en 4 casos, en dos de ellos asociada a del 3p21 y en los otros 2 casos asociada a del 14q31. Un caso presenta del 3p21 sin del 11q. Cinco de estos casos son diploides/tetraploides y dos triploides (ambos casos presentan del 11q). El pronóstico histológico en los 4 casos valorables es desfavorable aunque únicamente 2 casos presentan un alto MKI junto con una alta expresión de Ki67. La edad media al diagnóstico es de 51,57 meses. Todos los enfermos excepto uno respondieron inicialmente al tratamiento y 2 enfermos fallecieron por progresión. Dos casos se encuentran en progresión de su enfermedad.

Por último, la *MNG* (fig. 4) presente en 6 casos (25%), se asocia a del 1p36 y a +17q en 5 casos (83%); un caso no presenta del 1p36 sino desequilibrio de 1p36, y en otro caso se aprecia una ganancia completa del cromosoma 17. Cuatro casos presentan deleciones en 11q sin estar asociada a del 3p ni del 14q. Las ganancias y pérdidas cromosómicas parciales son frecuentes en todos los casos con *MNG* (media de 8,6 reestructuraciones por tumor). Cuatro de estos casos son diploides/tetraploides y dos triploides (uno de estos casos presenta del 11q). El pronóstico histológico en los cuatro casos valorables es desfavorable con un alto MKI y 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 neuroblastoma se basa actualmente en la determinación de escasos factores clínicos y biológicos^{1,23}. A pesar de permitir una marcada mejora terapéutica, los datos sugieren un modelo hipotético donde el riesgo podría depender también del momento en que la célula tumoral adquiere cambios genéticos específicos. El objetivo principal de este estudio

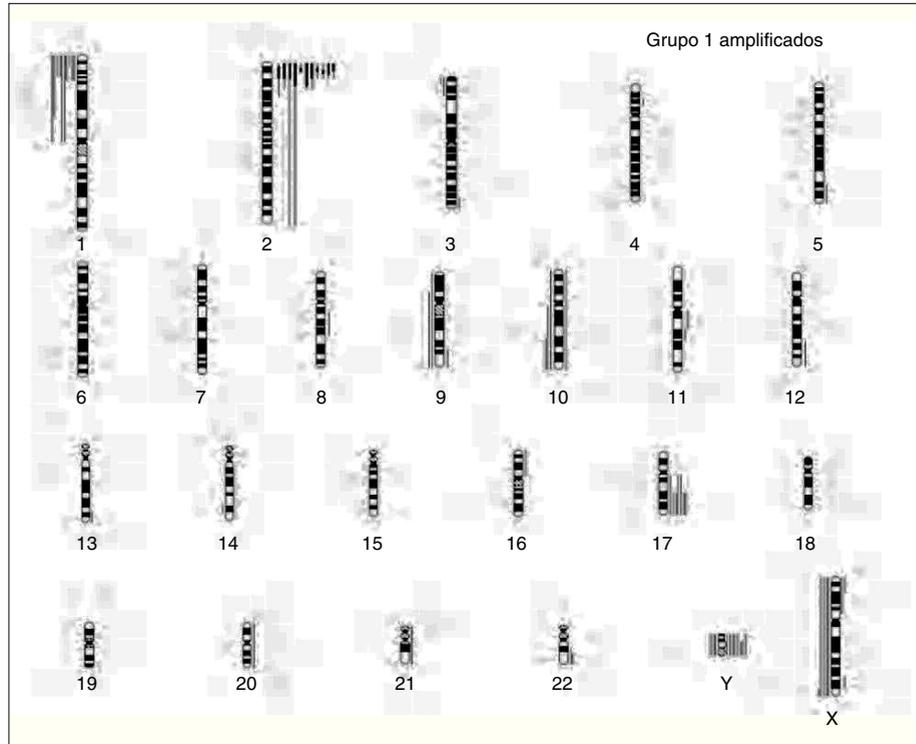


Figura 2. Ideograma de amplificaciones (barras gruesas a la derecha de cada idiograma cromosómico), ganancias (barras finas a la derecha de cada idiograma cromosómico), y pérdidas (barras a la izquierda de cada idiograma cromosómico) en el grupo de los casos con amplificación del gen MYCN.

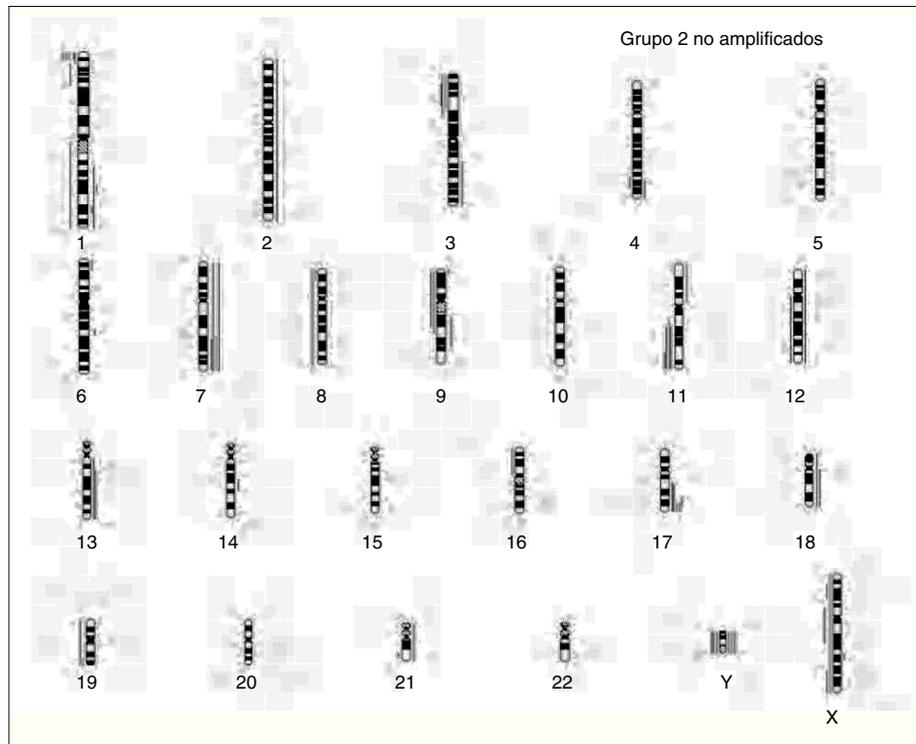


Figura 3. Ideograma de ganancias (barras a la derecha de cada idiograma cromosómico), y pérdidas (barras a la izquierda de cada idiograma cromosómico) en el grupo de los casos sin amplificación del gen MYCN.

es la valoración más precisa del riesgo en el momento del diagnóstico en el grupo de NB-HR, sobre la base de nuevos cambios genéticos específicos y por tanto con la detección de mayor número de anomalías genéticas.

Utilizando FISH y de citometría estática se observa, en consonancia con estudios previos, que los 60 NB-HR recibidos en un período de 3 años en el Centro de Referencia Nacional, son tumores en progresión con carac-

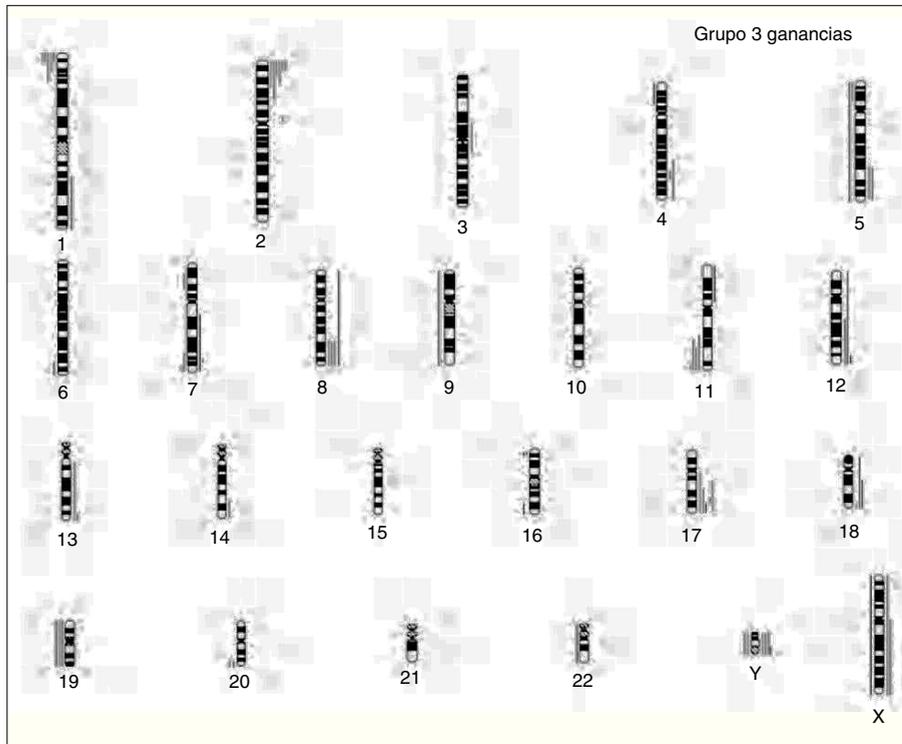


Figura 4. Ideograma de ganancias (barras a la derecha de cada ideograma cromosómico), y pérdidas (barras a la izquierda de cada ideograma cromosómico) en el grupo de los casos con ganancia del gen MYCN.

terísticas genéticas heterogéneas. Por este motivo, se plantea 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 esta técnica en el Centro de Referencia. 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^{34,35}. Si se clasifica los tumores únicamente según el estatus de *MYCN*, se observa que +17q es la anomalía más frecuente compartida por los tres subgrupos seguida por la del 1p36. Recientemente Vandesompele et al¹⁹ han detectado que en los neuroblastomas favorables, la presencia del cromosoma 17 en disomía representa un signo de alto riesgo equiparable a +17q; por esta razón se engloba este dato en nuestro estudio junto con +17q. Así mismo, en los grupos de *MNNA* y *MNG* se observa tumores que presentan del 11q, hallazgo ausente en el grupo de tumores *MNA*. Debido a que los estudios realizados mediante micromatrices de CGH con BAC, ADNc u oligonucleótidos, que pueden detectar alteraciones genéticas y de expresión con una mayor resolución, están permitiendo la identificación en neuroblastoma de patrones de expresión génica correlacionadas con desequilibrios genéticos específicos, en particular con del 11q^{36,37}, se considera esta alteración como identificativa de un subgrupo tumoral. Así, en este estudio se puede diferenciar dos grupos genéticos claros, tumores *MNA* y tumores con del 11q.

El grupo 1 se identifica y define por la presencia de *MNA* sin detectar otros hallazgos genéticos específicos. Se observa la integridad de 11q. Presentan muy pocas alteraciones genómicas, indicando que *MNA* es suficiente para determinar en estos tumores un fenotipo agresivo, aunque ocurren otros cambios genéticos, incluidos del 1p36 y +17q. La del 1p asociada a *MNA* afecta a regiones amplias y tiene como consecuencia la pérdida de múltiples genes. Dentro de los NB-HR los pacientes de este grupo presenta una media de edad al diagnóstico menor (39,09 meses) y progresan rápidamente. El grupo 2 presenta mayor número de anomalías estructurales, y está presente entre éstas la del 11q. Estos casos están incluidos tanto en el grupo *MNNA* como en el grupo de *MNG*. Por tanto se considera que los tumores con del 11q forman un subgrupo diferenciado de tumores que a su vez pueden o no presentar asociada *MNG*, del 1p, del 3p o del 14q. Los tumores incluidos en este subgrupo crecen más despacio, la media de edad al diagnóstico es 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 *MNA* ni del 11q sigue siendo un grupo genéticamente heterogéneo, en donde no se puede detectar con la técnica de CGH metafásica anomalías comunes identificativas, aunque sí están presentes la +17q y/o el cromosoma 17 en disomía.

Como conclusión, se identifica en este estudio utilizando la CGH metafásica, dos grupos genéticos diferenciados que pueden tener implicaciones diagnósticas y tera-

péuticas importantes. A pesar de tratarse de un reducido número de casos analizados y con un corto período de seguimiento, ha sido posible definir cambios genéticos asociados a los distintos subgrupos de pacientes. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de ampliar el estudio a un mayor número de pacientes para definir y establecer los factores de riesgo biológico mediante esta técnica y así garantizar su utilidad en la aplicación clínica junto con las pruebas diagnósticas actuales.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de los técnicos de E. Alonso y J. Benavent, las doctoras D. Sánchez-Izquierdo y J. Cruz así como al estudiante predoctoral M. Enciso en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Cotterill SJ, Pearson AD, Pritchard J, Foot AB, Roald B, Kohler JA, et al. Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: results of The European Neuroblastoma Study Group 'Survey' 1982-1992. *Eur J Cancer*. 2000;36:901-8.
- Evans AE, Silber JH, Shpilsky A, D'Angio GJ. 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*. 1996;14:2504-10.
- Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*. 1993;11:1466-77.
- Joshi VV, Rao PV, Cantor AB, Altshuler G, Shuster JJ, Castleberry RP. 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*. 1996;77:1582-8.
- Shimada H, Stram DO, Chatten J, Joshi VV, Hachitanda Y, Brodeur GM, et al. Identification of subsets of neuroblastomas by combined histopathologic and N-myc analysis. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:1470-6.
- Shimada H, Chatten J, Newton WA Jr, Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, et al. 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, Umehara S, Monobe Y, Hachitanda Y, Nakagawa A, Goto S, et al. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: A report from the Children's Cancer Group. *Cancer*. 2001;92:2451-61.
- Brodeur GM, Sekhon G, Goldstein MN. Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer*. 1977;40:2256-63.
- Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, et al. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*. 1983;305:245-8.
- Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 1999;17:2264-79.
- Hayashi Y, Habu Y, Fujii Y, Hanada R, Yamamoto K. Chromosome abnormalities in neuroblastomas found by VMA mass screening. *Cancer Genet Cytogenet*. 1986;22:363-4.
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. 1984;224:1121-4.
- Christiansen H, Sahin K, Berthold F, Hero B, Terpe HJ, Lampert F. Comparison of DNA aneuploidy, chromosome 1 abnormalities, MYCN amplification and CD44 expression as prognostic factors in neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 1995;31A:541-4.
- Christiansen H, Lampert F. Tumour karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma. *Br J Cancer*. 1988;57:121-6.
- Caron H, Van Sluis P, De Kraker J, Bokkerink J, Egeler M, Laureys G, et al. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1996;334:225-30.
- Plantaz D, Mohapatra G, Matthay KK, Pellarin M, Seeger RC, Feuerstein BG. Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol*. 1997;150:81-9.
- Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, et al. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1999;340:1954-61.
- Cunsolo CL, Biccocchi MP, Petti AR, Tonini GP. Numerical and structural aberrations in advanced neuroblastoma tumours by CGH analysis; survival correlates with chromosome 17 status. *Br J Cancer*. 2000;83:1295-300.
- Vandesompele J, Baudis M, De Preter K, Van Roy N, Ambros P, Bown N, et al. Unequivocal delineation of clinicogenetic subgroups and development of a new model for improved outcome prediction in neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2005;23:2280-99.
- Takita J, Hayashi Y, Kohno T, Shiseki M, Yamaguchi N, Hanada R, et al. Allelotype of neuroblastoma. *Oncogene*. 1995;11:1829-34.
- Ejeskar K, Aburatani H, Abrahamsson J, Kogner P, Martinsson T. Loss of heterozygosity of 3p markers in neuroblastoma tumours implicate a tumour-suppressor locus distal to the FHIT gene. *Br J Cancer*. 1998;77:1787-91.
- Luttikhuis ME, Powell JE, Rees SA, Genus T, Chughtai S, Ramani P, et al. Neuroblastomas with chromosome 11q loss and single copy MYCN comprise a biologically distinct group of tumours with adverse prognosis. *Br J Cancer*. 2001;85:531-7.
- Westermann F, Schwab M. Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Lett*. 2002;184:127-47.
- Maris JM, Weiss MJ, Guo C, Gerbing RB, Stram DO, White PS, et al. 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*. 2000;18:1888-99.
- Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol*. 2003;4:472-80.
- Brodeur GM. Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:203-16.
- Castel V, Canete A, Noguera R, Navarro S, Oltra S. Neuroblastoma. *Clin Transl Oncol*. 2005;7:133-45.
- Castel V, Canete A, Navarro S, García-Miguel P, Melero C, Acha T, et al. Outcome of high-risk neuroblastoma using a dose intensity approach: Improvement in initial but not in long-term results. *Med Pediatr Oncol*. 2001;37:537-42.
- Kaneko M, Tsuchida Y, Mugishima H, Ohnuma N, Yamamoto K, Kawa K, et al. Intensified chemotherapy increases the sur-

- vival rates in patients with stage 4 neuroblastoma with MYCN amplification. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2002;24:613-21.
30. Bocking A, Giroud F, Reith A. Consensus report of the European Society for Analytical Cellular Pathology task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol.* 1995;17:1-7.
 31. Navarro S, Noguera R, Pellin A, Mejía C, Ruiz A, Llombart-Bosch A. Pleomorphic anaplastic neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2000;35:498-502.
 32. Noguera R, Canete A, Pellin A, Ruiz A, Tasso M, Navarro S, et al. MYCN gain and MYCN amplification in a stage 4S neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003;140:157-61.
 33. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, et al. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 1994;10:231-43.
 34. Breen CJ, O'Meara A, McDermott M, Mullarkey M, Stallings RL. Coordinate deletion of chromosome 3p and 11q in neuroblastoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000;120:44-9.
 35. Lastowska M, Cullinane C, Variend S, Cotterill S, Bown N, O'Neill S, et al. Comprehensive genetic and histopathologic study reveals three types of neuroblastoma tumors. *J Clin Oncol.* 2001;19:3080-90.
 36. Guo C, White PS, Hogarty MD, Brodeur GM, Gerbing R, Stram DO, et al. Deletion of 11q23 is a frequent event in the evolution of MYCN single-copy high-risk neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol.* 2000;35:544-6.
 37. McArdle L, McDermott M, Purcell R, Grehan D, O'Meara A, Breatnach F, et al. Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in neuroblastoma displaying loss of chromosome 11q. *Carcinogenesis.* 2004;25:1599-609.