

DETERMINACIÓN DE DAÑO GENÓMICO EN TUMORES NEUROBLÁSTICOS POR ARBITRARILY PRIMED PCR (AP-PCR): AMPLIFICACIÓN DE MYCN COMO MARCADOR DE INESTABILIDAD GENÓMICA EN NEUROBLASTOMAS

Jorge Muñoz Aranda
UNED Tudela, Aula Universitaria de Milagro

El objetivo de este estudio es el establecer una estimación de la alteración genómica global en tumores neuroblásticos (ganglioneuromas, ganglioneuroblastomas y neuroblastomas) y correlacionarlos con distintos parámetros clínicos (edad, sexo, diagnóstico, índice Shimada, índice de proliferación, localización del tumor y estado de la región cromosómica 1p y el gen MYCN (*v*-avian myelocytomatosis viral related)) con el objetivo de encontrar nuevos marcadores moleculares o marcadores de pronóstico para el neuroblastoma. Para estudiar el daño genómico en tumores neuroblásticos utilizamos la técnica AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR), una técnica basada en la reproducibilidad de los patrones de bandas obtenidos al realizar una PCR con bajas temperaturas de *annealing* en sus primeros ciclos. El daño genómico fue analizado al comparar DNAs tumorales con DNA obtenido de sangre periférica de los mismos pacientes. Encontramos un mayor daño genómico (GDF (Genomic Damage Fraction)) en el grupo de mujeres (U-Mann Whitney ($p=0.025$, pero no pudimos encontrar ninguna asociación entre GDF y localización del tumor, índice de proliferación, diagnóstico o edad del paciente. No hubo ninguna relación entre el estado de 1p y el GDF, pero los tumores con amplificación del oncogén MYCN lo tenían ligeramente más elevado. La amplificación de MYCN puede contribuir de cierta manera en la inestabilidad genómica de los neuroblastomas.

I. INTRODUCCIÓN

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente en niños, con aproximadamente un caso cada 70000 nacimientos⁽¹⁾. La heterogeneidad clínica es una de las características más relevantes del neuroblastoma, debido a que algunos remiten espontáneamente (estadío

4S), mientras que otros pueden ser resueltos con una simple cirugía (estadios 1 y 2), o bien de comportan de manera agresiva (estadios 3 y 4). Además, la mayor parte de los niños con más de un año sufren metástasis progresiva y mueren a pesar de la terapia.

Algunas alteraciones, como la amplificación de MYCN y la pérdida de heterocigosidad (LOH, *Loss of Heterozygosity*) en el brazo cromosómico 1p, han sido asociadas con un peor pronóstico de la enfermedad, mientras que las pérdidas de heterocigosidad en 11q y 14, junto con la expresión del gen Trk A han sido asociados a una buena respuesta al tratamiento⁽²⁾. Estudios de hibridación genómica comparada (CGH, Comparative Genomic Hybridization) han apuntado a las ganancias en los cromosomas 7, 17q, y 22q, y las pérdidas en 11q, 14q, 3p, 9p y 1p como las aberraciones estructurales más frecuentes en neuroblastomas⁽²⁾. Se ha visto que algunas de estas alteraciones son exclusivas, como la pérdida de heterocigosidad de 1p y la amplificación de MYCN⁽³⁾. Otra alteración importante es la translocación no equilibrada 1:17 que afecta a las regiones cromosómicas 1p y 17q⁽⁴⁾. Sin embargo, la heterogeneidad en el comportamiento de los tumores neuroblásticos no es todavía del todo comprendida, siendo aún hoy un misterio la naturaleza de las rutas genéticas que originan estas enfermedades.

La AP-PCR (Arbitrarily Primed-PCR) es una técnica de screening de alteraciones basada en la huella genética obtenida en la misma PCR (Polymerase Chain Reaction) para distintos ADN procedentes de diferentes muestras, que pueden estar o no correlacionadas⁽⁵⁾. Al principio, esta técnica fue utilizada para encontrar diferencias filogenéticas entre diferentes especies, pero más tarde la AP-PCR fue utilizada en la investigación del cáncer⁽⁶⁾. En esta variante de la PCR, tan sólo es utilizado un *primer*, y los primeros ciclos son desarrollados en bajas condiciones de astringencia, de forma que se favorece la amplificación de bandas inespecíficas cuyas secuencias guarden cierta homología con el primer utilizado en la PCR. El *primer* genera varios fragmentos de DNA, que luego son selectivamente amplificados cuando elevamos la temperatura de *annealing* de la reacción. Los productos de PCR son resueltos en geles desnaturizantes de acrilamida, que son posteriormente secados y expuestos a autorradiografía. Cada primer tiene su propio perfil de bandas de forma reproducible, lo cual posibilita el comparar los perfiles de tejidos normales y tumorales procedentes del mismo paciente. Las alteraciones en el número de copia del ADN son observadas en formas de ganancias o pérdidas en la intensidad de las bandas. Pueden utilizarse diversos *primers* diferentes para distintas reacciones de AP-PCR, de modo que obtenemos mayor información cuanto mayor sea el número de bandas analizadas. Además, las bandas aberrantes

DETERMINACIÓN DE DAÑO GENÓMICO EN TUMORES NEUROBLÁSTICOS POR ARBITRARILY PRIMED PCR (AP-PCR)

pueden ser aisladas y secuenciadas, de manera que podamos asignar un locus cromosómico para cada banda de interés.

En nuestro trabajo utilizamos tres experimentos distintos de AP-PCR para estimar la fracción de daño genómico (GDF) en tres grupos de tumores neuroblásticos (ganglioneuroma (GN), ganglioneuroblastomas (GNB) y neuroblastomas (NB)), para los cuales disponíamos de diversos datos clínico-patológicos, tales como edad, sexo, localización del tumor, índice Shimada y alteraciones en MYCN y el cromosoma 1p. El conocimiento de las alteraciones del genoma a nivel global podría ayudar en la subclasificación de los neuroblastomas, así como para el establecimiento de una terapia más adecuada para cada tipo de tumor.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MUESTRAS TUMORALES

Diecisiete tumores neuroblásticos fueron obtenidos del Hospital Infantil La Paz (Madrid, España). Estos tumores eran nueve neuroblastomas (NB), seis ganglioneuroblastomas (GNB) y dos ganglioneuromas (GN). Nueve tumores astrocíticos (seis glioblastomas, un astrocitoma difuso de bajo grado y dos astrocitomas pilocíticos) fueron también incluidos en el estudio para poder realizar comparaciones en paralelo de los resultados. Se disponía de ADN procedente de linfocitos de sangre periférica para todos y cada uno de estos tumores.

El ADN procedente de las biopsias tumorales congeladas fue extraído mediante el protocolo tradicional de extracción por fenol-cloroformo. Todos los pacientes dieron un informe con su consentimiento. El protocolo para el proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Navarra (protocolo número 38/2002) y está de acuerdo a las previsiones de la Declaración de Helsinki.

2. CANTIDAD Y CALIDAD DEL ADN

Es de vital importancia el asegurarse que ambos ADN de cada paciente (ADN procedente del tumor y de la sangre) son similares en cuanto a calidad y cantidad antes de realizar el experimento, debido a que pequeñas variaciones entre ellos pueden causar serias interferencias en la interpretación de los resultados. Para realizar esta comprobación, todas las muestras de ADN fueron diluidas a 20 ng/ μ l, corridas en un gel de agarosa

al 0.8% y teñidas con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). La cantidad y calidad del ADN de cada muestra fue comparada visualmente con un control de buena calidad a una concentración de 20 ng/µl, que se corría en la misma electroforesis. Todas aquellas muestras que no se ajustaban a estos criterios de calidad fueron eliminadas del estudio.

3. ARBITRARILY PRIMED PCR

Para cada muestra fueron realizados tres ensayos de AP-PCR, que rindieron un número total de 146 bandas. Los *primers* utilizados para cada experimento y las condiciones de PCR habían sido previamente descritos^(7,8): Blue (5'-CCGAATTCGCAAAGCTCTGA-3'), 331db2 (5'-ACAGATCTGAAGGGTCAAATATTCTCC-3') y D12S77 (a: 5'-GAAGGGCAACAACAGTGAA-3' y b: 5'-CTTTTTTTTCTCCCCACTC-3').

4. ELECTROFORESIS EN GEL

Los productos de PCR fueron diluidos a 1:4 en búfer de carga desnaturalizante (93% formamida, 0.01 M NaOH, 0.01% azul de bromofenol y 0.01% xilenocianol), y desnaturalizados a 95 °C durante 3 minutos. Después de esto, las muestras fueron rápidamente enfriadas en hielo y sometidas a electroforesis en geles de secuenciación desnaturalizantes (6% poliacrilamida, 8 M urea).

Para mantener la temperatura uniforme en toda la superficie del gel, los geles fueron previamente corridos a 60 W durante una hora. La electroforesis de los productos de PCR fue realizada a 55 W, durante 4.5 horas (*primers* Blue y 331db2) ó 3.5 horas (*primer* D12S77). Después de la electroforesis, los geles fueron secados a vacío (85 °C, 1.5 horas) y expuestos a películas de autorradiografía entre 1 y 3 días a temperatura ambiente.

5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

El perfil de bandas obtenido para cada experimento de AP-PCR contenía entre 40 y 60 bandas identificables. Para poder realizar un análisis más objetivo de los resultados, realizamos un análisis densitométrico de la intensidad de las bandas. En primer lugar, los geles fueron escaneados (EPSON GT 8500, Seiko Epson Corporation, Nagano, Japón) y la intensidad de las bandas fue medida con el software densitométrico Phoretix 1D Advanced Versión 3.0 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle upon Tine, UK).

DETERMINACIÓN DE DAÑO GENÓMICO EN TUMORES NEUROBLÁSTICOS POR ARBITRARILY PRIMED PCR (AP-PCR)

Los datos numéricos fueron importados a una hoja de cálculo de Microsoft Excel. La reproducibilidad de la técnica había sido previamente demostrada para estos *primers* en las mismas condiciones de PCR y electroforesis⁽⁸⁾. Las bandas eran consideradas como susceptibles de análisis cuando eran claramente distinguibles del ruido de fondo del gel. Los cambios de intensidad superiores a un 20% entre el tumor y las bandas normales para cada paciente fueron considerados como positivos; los datos numéricos fueron corroborados visualmente por dos observadores independientes.

6. CÁLCULO DE LA FRACCIÓN DE DAÑO GENÓMICO

Un total de 146 bandas fueron analizadas para el estudio. Para cada muestra, fueron calculados tres índices: fracción de ganancias (GF: número de bandas que presentaron ganancia en intensidad/número total de bandas analizadas), fracción de pérdidas (LF: número de bandas que presentaron pérdida en intensidad/número total de bandas analizadas) y fracción de daño genómico (GDF = GF + LF). Los resultados obtenidos para GDF, GF y LF fueron correlacionados con los datos clínico-patológicos.

7. DETERMINACIÓN DE LOH EN 1P Y AMPLIFICACIÓN DE MYCN

La pérdida de heterocigosidad (LOH, Loss of Heterozygosity) en el brazo cromosómico 1p y la estimación de la amplificación del oncogén MYCN fueron determinados en base al ADN extraído de los tumores. La pérdida de heterocigosidad (LOH) fue determinada mediante una PCR basada en polimorfismos de ADN, y la amplificación de MYCN fue estudiada mediante Southern Blot convencional⁽⁹⁾.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Fueron utilizados test estadísticos no paramétricos (tests de U-Mann-Whitney y Kruskal Wallis), debido al pequeño tamaño de nuestras muestras.

III. RESULTADOS

En la Tabla 1 se resumen los datos obtenidos por AP-PCR (Figura 1) para todas las muestras disponibles. El cociente medio de bandas alteradas por tumor era de 0.389 ± 0.105 ; esta cifra incluye tanto bandas con

ganancia en intensidad ($GF = 0.181 \pm 0.048$) y otras con pérdida en intensidad ($LF = 0.208 \pm 0.068$). Las diferencias entre los tres grupos de tumores neuroblásticos no alcanzaron valores significativos, ni para GDF (Tabla 2), ni para GF ó LF ($p = 0.426$, $p = 0.068$, y $p = 0.549$, respectivamente). Más aún, los valores de GDF y GF para el grupo de ganglioneuromas eran ligeramente más elevados que para el resto de los grupos, al contrario de lo que hubiera sido de esperar.

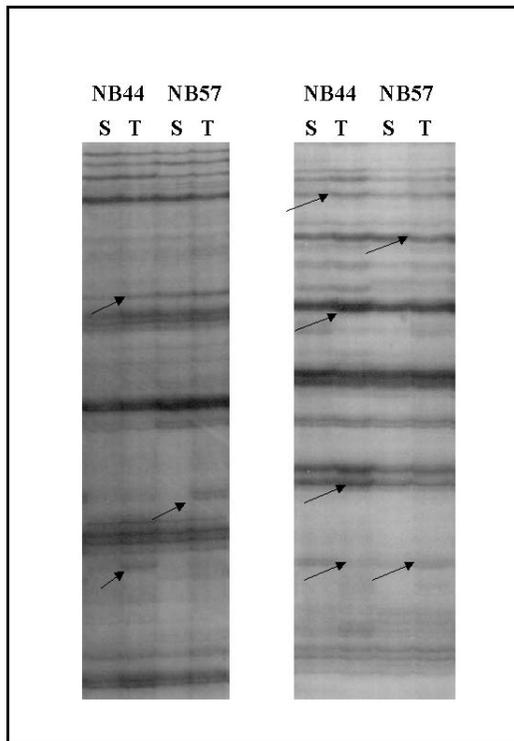


Figura 1: Técnica de AP-PCR utilizando los *primers* Blue y 331DB2. Los productos de PCR fueron marcados con α^{32} -dCTP en el mix de reacción, y sometidos a electroforesis en un gel de acrilamida al 6% no desnaturalizante. Después de la electroforesis (3.5 – 5.5 horas, a 55 W), los gels fueron secados a vacío a 85 °C y expuestos a autorradiografía entre 24 y 72 horas. Después de escanear y cuantificar los gels, las cambios en intensidad de las bandas fueron clasificados como ganancias o pérdidas. S: sangre; T: tumor.

DETERMINACIÓN DE DAÑO GENÓMICO EN TUMORES NEUROBLÁSTICOS POR ARBITRARILY PRIMED PCR (AP-PCR)

En los tumores astrocíticos tampoco pudimos encontrar ninguna diferencia significativa entre el GDF, LF ó GF. Sin embargo, el grupo de glioblastomas mostró valores ligeramente más elevados que el grupo de los tumores astrocíticos de bajo grado, tanto para el GDF como para los otros dos índices de daño genómico.

Comparamos los índices GDF, GF y LF con respecto a localización del tumor, grado de diferenciación, índice de proliferación y edades de los pacientes, sin obtener ninguna asociación estadísticamente significativa. El grupo de mujeres presentaba un GDF superior al del grupo de varones ($p = 0.034$, U de Mann-Whitney). Se disponía de datos sobre el estado de la región cromosómica 1p para 14 tumores, de los cuales once presentaron pérdida de heterozigosidad (LOH) para esta región, mientras que los otros tres tenían un número de copia normal. Uno de los tumores con pérdida de heterozigosidad en 1p presentó también amplificación del oncogén MYCN; este gen también se halló amplificado en uno de los tumores sin pérdida de heterozigosidad en 1p (Tabla 1). No encontramos ninguna asociación positiva cuando comparamos el GDF entre los distintos grupos de tumores según su estado de 1p y MYCN. Sin embargo, el GDF mostraba una ligera tendencia a ser algo superior en aquellos tumores que tenían amplificado el gen MYCN (U Mann-Whitney, $p = 0.076$); además, encontramos una asociación positiva entre aquellos tumores que presentaban amplificado MYCN y los valores más elevados para la fracción de ganancias (GF) (U Mann-Whitney, $p = 0.048$). Debido a que tan sólo dos de los tumores estudiados tenían amplificación de MYCN, pensamos que es necesario realizar nuevos estudios con series tumorales más largas para poder establecer una correlación más fiable entre ambas alteraciones.

Tabla 1: Parámetros clínicos y daño genómico en tumores neuroblásticos

	Edad	Sexo	Localización	Shimada	Ki-67	LOH 1p	MYCN	LF	GF	GDF
GN										
NB1	3 años	V	Mediastino	n.d.	1%	n.d.	n.d.	0,220	0,250	0,47
NB66	4 años	M	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	0,255	0,255	0,511
Media								0,229	0,251	0,49
GNB										
NB5	3 años	M	Suprarrenal	■, Nodular	5%	No	Normal	0,186	0,179	0,366
NB7	3 años	M	Retroperitoneo	■, Mixto	2%	No	Normal	0,205	0,141	0,346
NB8	1 año	M	Suprarrenal	■, Nodular	n.d.	No	Amplificado	0,231	0,254	0,485
NB82	2 años	V	Retroperitoneo	■, Nodular	n.d.	No	Normal	0,130	0,196	0,323
NB83	6 años	V	Mediastino	■, Nodular	15%	No	Normal	0,236	0,157	0,393
NB92	6 años	V	Mediastino	■, Nodular	15%	No	Normal	0,136	0,182	0,318
Media								0,193	0,189	0,372
NB										
NB34	2 meses	M	Mediastino	□, dif.	15%	Sí	Normal	0,164	0,151	0,315
NB51	4 semanas	V	Suprarrenal	□, dif.	20%	No	Normal	0,181	0,157	0,337
NB63	5 meses	V	Suprarrenal	□, indif.	40%	No	Normal	0,146	0,115	0,26
NB64	2 años	V	Suprarrenal	□, indif.	n.d.	n.d.	Normal	0,135	0,128	0,262
NB73	2 años	M	Sup.-retrop.-	□, indif.	85%	Sí	Amplificado	0,315	0,228	0,543
NB77	4 años	V	Retroperitoneo	□, indif.	25%	No	Normal	0,152	0,141	0,293
NB91	3 años	M	Retroperitoneo	□, indif.	25%	No	Normal	0,326	0,235	0,561
NB95	4 meses	M	Suprarrenal	□, indif.	n.d.	Sí	n.d.	0,346	0,198	0,543
NB97	4 meses	M	Suprarrenal	□, indif.	10%	No	n.d.	0,180	0,124	0,303
Media								0,212	0,164	0,376

GN: ganglioneuroma; GNB: ganglioneuroblastoma; NB: neuroblastoma; V: varón; M: mujer; ■: rico en estroma; □: pobre en estroma; dif.: diferenciado; indif.: indiferenciado; n.d.: no determinado; MYCN: v-myc avian mielocitomatosis viral related; LOH: pérdida de heterocigosidad; GDF: fracción de daño genómico; GF: fracción de ganancias; LF: fracción de pérdidas.

Tabla 2: Daño genómico en tumores neuroblásticos

Factor	Daño genómico (GDF)	p
Sexo		
Masculino (n=8)	0.332 ± 0,070	0.025
Femenino (n=9)	0.441 ± 0.107	
Edad		
<1 año (n=5)	0.352 ± 0.110	0.460
1-2 años (n=4)	0.403 ± 0.062	
>2 años (n=8)	0.407 ± 0.096	
Diagnóstico		
Ganglioneuroma (n=2)	0.440 ± 0.028	0.426
Ganglioneuroblastoma (n=6)	0.373 ± 0.062	
Neuroblastoma (n=9)	0.371 ± 0.029	
Localización		
Mediastino (n=4)	0.374 ± 0.073	0.690
Suprarrenal (n=7)	0.365 ± 0.109	
Retroperitoneo (n=5)	0.413 ± 0.028	
Índice Ki-67		
<10% (n=3)	0.394 ± 0.066	0.538
10-20% (n=5)	0.333 ± 0.035	
>20% (n=4)	0.414 ± 0.159	
1p status		
Con LOH (n=11)	0.467 ± 0.131	0.311
Sin LOH (n=3)	0.362 ± 0.088	
MYCN status		
Con amplificación (n=2)	0.514 ± 0.041	0.076
Sin amplificación (n=11)	0.343 ± 0.083	

IV. DISCUSIÓN

La técnica AP-PCR ha demostrado su enorme utilidad para encontrar nuevas aberraciones cromosómicas⁽⁶⁾, y de hecho ha sido previamente utilizada para descubrir mutaciones clonales muy ubicuas en células somáticas, bien en secuencias únicas o en secuencias repetitivas (microsatélites) en adenocarcinoma de colon⁽¹⁰⁾. Algunas de las principales ventajas de la AP-PCR con respecto de otras técnicas de screening de alteraciones cromosómicas, como la CGH (Hibridación Genómica Comparada) son la mayor sensibilidad y el hecho de que la AP-PCR no requiera de grandes equipos, con el consiguiente abaratamiento del estudio.

La AP-PCR permite la detección simultánea de pérdidas y ganancias de material genético, y hace posible el aislamiento y clonado de los fragmentos de ADN alterados sin la necesidad de utilizar *primers* específicos para amplificarlos. Malkoshyan y cols.⁽⁸⁾, utilizando AP-PCR, encontraron una frecuencia similar de ganancias y pérdidas de ADN en cáncer colorrectal, rechazando así la tradicional idea de que las pérdidas de ADN y la inactivación de genes supresores tumorales tenían mayor importancia en la etiología genética del cáncer que las ganancias genéticas y la amplificación de oncogenes. Otra ventaja de la AP-PCR es la posibilidad de estudiar varias muestras distintas en un mismo experimento. De esta forma, los resultados obtenidos en un estudio de AP-PCR pueden añadir información a aquellos resultados obtenidos por otras técnicas como la CGH, ya que ambas son compatibles⁽¹¹⁾.

Nuestro trabajo no encontró ninguna asociación significativa entre la fracción de daño genómico y cualquiera de los parámetros clínicos analizados, exceptuando el sexo de los pacientes. El diagnóstico del tumor no pareció estar relacionado con un mayor índice de alteraciones, tal y como hubiera sido esperado. Además, el grupo con pronóstico más favorable (GN) tenía un GDF ligeramente más elevado cuando era comparado con el grupo de ganglioneuroblastomas (GNB) y neuroblastomas (NB), que son tumores más agresivos. El índice de Shimada y el índice de proliferación tampoco se correlacionaban con el daño genómico. También intentamos buscar una correlación entre GDF, LF ó GF con la pérdida de heterocigosidad en 1p o el estado de amplificación del oncogén MYCN. Sin embargo, disponíamos de un grupo muy pequeño de tumores con pérdidas en 1p (tres NB) o amplificaciones de MYCN (un GNB y un NB), y no fuimos capaces de encontrar ninguna asociación significativa. Los tumores con amplificación de MYCN tendían a tener mayor GDF, y esta tendencia alcanzaba la significación cuando nos centrábamos tan sólo en el estudio de GF. A pesar de esto, pensamos que es necesario realizar más estudios con mayores tamaños muestrales para ratificar la verdadera importancia de la amplificación de MYCN en la inestabilidad genómica de los tumores neuroblásticos.

Distintos trabajos han asignado un valor predictivo para el GDF en otro tipo de tumores, como los NSCLC (*Non small cell lung carcinoma* (carcinoma de pulmón de células "no pequeñas") y cáncer colorrectal^(7, 12). Éste último grupo concluyó que la progresión del cáncer colorrectal podría estar asociada a la acumulación de alteraciones genéticas que son consecuencias de distintos mecanismos que producen inestabilidad genómica (ej., fallos en la reparación del ADN o en el control del ciclo celular). Con los datos obtenidos en nuestro trabajo no podemos apoyar

DETERMINACIÓN DE DAÑO GENÓMICO EN TUMORES NEUROBLÁSTICOS POR ARBITRARILY PRIMED PCR (AP-PCR)

dicha observación, puesto que los índices más altos de daño genómico no parecen ir asociados a los diagnósticos más agresivos. Probablemente, alteraciones genéticas puntuales como la amplificación de MYCN, o la pérdida de función de un gen supresor tumoral ubicado en 1p tengan más relevancia en la etiología del neuroblastoma que la mera acumulación de alteraciones genéticas.

Un estudio previo por la técnica CGH, que analizaba ocho de los tumores usados en nuestro trabajo (tres NB, cuatro GNB y un NB) encontró ganancias en 7, 7q, 2p y 17q, y pérdidas en 11q y 3p como las alteraciones genéticas más recurrentes (datos no mostrados). El descubrimiento de nuevos oncogenes o genes supresores tumorales en las regiones alteradas podría ser una contribución de valor incalculable para la subclasificación del neuroblastoma. Por la posibilidad que ofrece para aislar y clonar las bandas alteradas, la AP-PCR nos ofrece la posibilidad de encontrar nuevas alteraciones de un modo totalmente aleatorio, con mayor sensibilidad que la CGH. La posible implicación de la amplificación de MYCN en la acumulación de alteraciones genómicas en este tipo de tumor debería ser objeto de futuros estudios.

V. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Borja Sáez y a la Dra. M^a José Calasanz su inestimable ayuda en el apartado estadístico. En el momento de la realización del trabajo, el Dr. Jorge Muñoz era becario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

El resto de autores que participaron en el trabajo fueron: Miquel Angel Peinado, Elisendra Vendrell y Gemma Aiza (del Institut de Recerca Oncologica, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona) y Javier Sáez Castresana (Unidad de Biología Tumoral, Universidad de Navarra, Pamplona).

El Dr. Javier Sáez Castresana, director del trabajo, agradece a la Asociación Española de Pediatría, por el V Premio Nutribén de Investigación Pediátrica.

Este trabajo fue parcialmente apoyado por becas de los Departamentos de Salud y Educación del Gobierno de Navarra, Pamplona; Fondo de Investigación Sanitaria (PI031356) y el Ministerio de Ciencia y Tecnología y Fondo Europeo de Desarrollo Regional (BF12003-08775), Madrid.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Weinstein JL, Katzenstein HM, Cohn SL. *Advances in the diagnosis and treatment of Neuroblastoma*. Oncologist 2003; 8: 278-292
2. Brodeur GM. *Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma*. Nat Rev Cancer 2003; 3:206-216.
3. Plantaz D, Vandesompele J, Van Roy *et al*. *Comparative Genomic Hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high frequency of 11q deletion in tumours lacking MYCN amplification*. Int J Cancer 2001; 91:680-686.
4. Savelyeva L, Corvi R, Schwab M. *Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells*. Am J Hum Genet 1994; 55: 334-340
5. Welhs J, McClelland M. *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*. Nucleic Acid Res, 1990; 18: 7213-7218.
6. Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M. *Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumours by arbitrarily primed polymerase chain reaction*. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 10065-10069.
7. Arribas R, Capella G, Tortola S *et al*. *Assessment of genomic damage in colorectal cancer by DNA fingerprinting: prognostic applications*. J Clin Oncol 1997; 15: 3230-3240.
8. Malkhosyan S, Yasuda J, Soto JL, Sekiya T, Yokota J, Perucho M. *Molecular Karyotype (amplotype) of metastatic colorectal cancer by unbiased arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting*. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 10170-10175.
9. Martinsson T, Sjoberg RM, Hallstenson K, Nordling M, Hedborg F, Kogner P. *Delimitation of a critical tumor suppressor region at distal 1p in neuroblastoma tumours*. Eur J Cancer 1997; 33: 1997-2001.
10. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. *Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis*. Nature 1993; 363: 558-561.
11. Odero MD, Soto JL, Matutes E, *et al*. *Comparative genomic hybridization and amplotyping by arbitrarily primed PCR in stage A B-CLL*. Cancer Genet Cytogenet 2001; 130: 8-13.

DETERMINACIÓN DE DAÑO GENÓMICO EN TUMORES NEUROBLÁSTICOS POR ARBITRARILY
PRIMED PCR (AP-PCR)

12. de Juan C, Iniesta P, Vega FJ *et al.* *Prognostic value of genomic damage in non small cell lung cancer.* Br J Cancer 1998; 77: 1971-1977.