

Valencia, julio 2018



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Trabajo final de grado en Biotecnología

Identificación de nuevos biomarcadores genéticos en neuroblastoma a través del análisis de los perfiles pangenómicos

Autor:

Belén Carbó Muñoz

Tutor: Dra. Amparo Pascual-Ahuir Giner

Tutor externo: Dra. Rosa Noguera Salva



**Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural**

Curso: 2017-2018



RESUMEN

Datos del TFG:

Autor:	Belén Carbó Muñoz
Tutor de la UPV:	Dra. Amparo Pascual-Ahuir
Tutor externo:	Dra. Rosa Noguera Salva
Titulación:	Grado en Biotecnología
Título del trabajo:	"Identificación de nuevos biomarcadores genéticos en neuroblastoma a través del análisis de los perfiles pangenómicos"
Lugar de realización:	Fundación Incliva
Localidad y Fecha:	Valencia, Julio de 2018

Palabras clave:

Neuroblastoma, alteraciones cromosómicas segmentarias, amplificación *MYCN*, delección 11q

Resumen:

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más común durante la infancia y deriva de las células precursoras del sistema nervioso simpático. Es el responsable del 15% de muertes en niños con cáncer y se caracteriza por ser una enfermedad con una gran heterogeneidad clínica, genética, histológica y biológica. Los factores pronósticos considerados en la estratificación de riesgo pretratamiento de los pacientes son: el estadio, la edad, la histopatología (categoría y grado de diferenciación), la ploidía y alteraciones cromosómicas específicas como la amplificación del gen *MYCN* y la delección del brazo cromosómico 11q; de esta forma, se clasifica a los pacientes según su riesgo de muerte en los grupos: Muy Bajo, Bajo, Intermedio y Alto (Very Low, Low, Intermediate y High Risk).

El laboratorio de la Dra. Rosa Noguera está llevando a cabo un proyecto en el que se analizan los perfiles pangenómicos obtenidos mediante arrays de SNPs (Single Nucleotide Polimorfisms). En este trabajo, colaboré en el estudio de 195 tumores neuroblásticos, para evaluar el número total de alteraciones cromosómicas segmentarias, la localización cromosómica de estas alteraciones, y el tamaño total de material genético ganado y perdido, así como la presencia de alteraciones focales (bien en amplificaciones o bien en ganancias o pérdidas) y alteraciones cromosómicas numéricas. El objetivo fue determinar si existía una asociación entre la cantidad de material genético ganado y/o perdido (en kilobases) y el número de alteraciones segmentarias o numéricas cromosómicas. Consideramos que relacionando estos resultados con la clínica de los pacientes y el riesgo de recaída o muerte podemos contribuir en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en neuroblastoma.

Key words:

Neuroblastoma, segmental chromosomal aberrations, *MYCN* amplification, 11q deletion

Summary:

Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumor during childhood and is derived from the precursor cells of the sympathetic nervous system. It is responsible for 15% of deaths in children with cancer and is characterized as a disease with great clinical, genetic, histological and biological heterogeneity. The prognostic factors considered in the pretreatment risk stratification of patients are: stage, age, histopathology (category and degree of differentiation), ploidy and specific chromosomal alterations such as the amplification of the *MYCN* gene and the deletion of the 11q chromosome arm; in this way, patients are classified according to their risk of death in the Very Low, Low, Intermediate and High Risk.

The laboratory of Dr. Rosa Noguera carries out a project in which the pangenomic profiles obtained by arrays of SNPs (Single Nucleotide Polimorfisms) are analyzed. In this work, I will collaborate in the study of 195 neuroblastic tumors, to evaluate the total number of segmental chromosomal alterations, the chromosomal location of these alterations, and the total size of genetic material gained and lost, as well as the presence of focal alterations (well in amplifications or gains or losses) and numerical chromosomal alterations. The objective is to determine if there is an association between the amount of genetic material gained and/or lost (in kilobases) and the number of chromosomal segmental or numerical alterations. We believe that by relating these results to the patients' clinic and the risk of relapse or death we can contribute to the development of new therapeutic strategies in neuroblastoma.

AGRADECIMIENTOS:

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutora, la Dra. Rosa Noguera por ofrecerme esta grata oportunidad de adentrarme en el mundo de la ciencia y brindarme su apoyo y dedicación, para llevar a cabo este proyecto.

También quiero agradecer a la Dra. Ana Berbegall, por su ayuda y paciencia durante estos meses en los que he realizado el Trabajo de Fin de Grado.

Y finalmente, quisiera dar las gracias a mi familia, empezando por mis padres y terminando por tías, tío, abuelas, hermanos y primos, por acompañarme durante esta aventura de los últimos años: grazie mille!

ABREVIATURAS:

NB	Neuroblastoma
TNM	Clasificación de tumores malignos
MNA	Amplificación del gen <i>MYCN</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
SCAs	Alteraciones segmentarias cromosómicas
NCAs	Alteraciones numéricas cromosómicas
homMNA	Amplificación del gen <i>MYCN</i> homogénea
hetMNA	Amplificación del gen <i>MYCN</i> heterogénea
CNVs	Variación en el número de copias cromosómicas
FISH	Hibridación in situ fluorescente
CGH	Hibridación genómica comparativa
MLPA	Amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples
aSNPs	Arrays de polimorfismo de nucleótido único
SNPs	Polimorfismo de nucleótido único
A	Adenina
T	Timina
C	Citosina
G	Guanina
INSS	Sistema internacional de estadificación de neuroblastoma
INRG	Grupo internacional de riesgo de neuroblastoma
CNB	Ganglioneuroblastoma
FSCA	Alteración segmentaria cromosómica focal
Kb	Kilobases
BAF	Frecuencia del alelo B
N, n	Número de casos
Crom., cr	Cromosoma
Mb	Megabases

ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ¿QUÉ ES EL NEUROBLASTOMA?.....	1
1.2 EPIDEMIOLOGÍA.....	1
1.3 CLÍNICA	2
1.4 DIAGNÓSTICO	2
1.5 CLASIFICACIÓN DEL TUMOR.....	3
1.6 ALTERACIONES GENÉTICAS SOMÁTICAS EN NEUROBLASTOMA.....	4
1.6.1 Ploidía	4
1.6.2 Alteraciones cromosómicas segmentarias (SCAs)	4
1.6.2.1 Deleción del brazo corto del cromosoma 1 (1p-).....	4
1.6.2.2 Deleción del brazo largo del cromosoma 11 (11q-).....	5
1.6.2.3 Ganancia del brazo largo del cromosoma 17 (+17q).....	5
1.6.2.4 Amplificación del gen <i>MYCN</i> (MNA).....	5
1.7 TÉCNICAS PANGENÓMICAS	6
1.7.1 Arrays de SNPs	6
1.8 ESTRATIFICACIÓN DE GRUPOS DE RIESGO EN PACIENTES CON NB.....	7
1.9 PERFIL DE EXPRESIÓN EN NEUROBLASTOMA	8
1.10 TRATAMIENTO.....	8
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1 MUESTRAS ESTUDIO	11
3.2 TÉCNICA DE ARRAYS DE SNPs.....	11
3.3 ANÁLISIS DE PATRONES GENÉTICOS	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1 PERFIL GLOBAL DE CAMBIOS EN EL NÚMERO DE COPIAS: SCAs Y NCAs.....	14
4.2 ANÁLISIS DE LOS PERFILES GÉNICOS SCA SEGÚN EL NÚMERO DE KILOBASES	14



4.2.1	Grupos según el predominio de ganancia o pérdida del material genético generado.....	14
4.2.1.1	Asociación con el número de SCAs totales y SCAs típicas.....	15
4.2.1.2	Asociación con las diversas SCAs típicas y MNA.....	16
4.2.1.3	Asociación MNA y 11q-	17
4.2.2	Grupos de estado combinatorio del tamaño del material genético ganado y/o perdido.....	20
4.2.2.1	Asociación con el número de SCAs totales y SCAs típicas.....	21
4.2.2.2	Asociación con las diversas SCAs típicas y MNA.....	22
4.2.2.3	Asociación MNA y 11q-	24
4.3	ANÁLISIS DE LAS NCAs SEGÚN EL NÚMERO DE KILOBASES	26
5.	CONCLUSIONES	28
6.	REFERENCIAS	29
7.	ANEXOS.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1. Presentación clínica del NB.....	2
Figura 2. Esquema de los ensayos de arrays de SNPs.....	7
Figura 3. Ejemplos de visualización de perfiles de cambio en el número de copia.....	13
Figura 4. Representación de la cantidad (Mb) de material neto alterado según el estado de MYCN y 11q en los tumores.....	19
Figura 5. Representación esquemática de los perfiles de NCA en los 43 NBs analizados ...	27

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Clasificación de tumores según INRGSS.....	8
Tabla 2. Grupos de inestabilidad y sus características genéticas.....	15
Tabla 3. Detalle de SCAs típicas y MNA.....	16
Tabla 4. Combinación MNA 11q- en función de grupos de inestabilidad.....	18
Tabla 5. Subclasificación subgrupo b1 de inestabilidad.....	33
Tabla 6. Subclasificación subgrupo b2 de inestabilidad.....	33
Tabla 7. Subclasificación subgrupo c1 de inestabilidad.....	34
Tabla 8. Subclasificación subgrupo c2 de inestabilidad.....	34
Tabla 9. Subclasificación subgrupo c2 de inestabilidad.....	35
Tabla 10. Clasificación del número de SCAs y SCAs típicas en función de las ganancias y/o pérdidas de material genético.....	21
Tabla 11. Clasificación del material genético alterado de SCAs típicas en función de las ganancias y/o pérdidas de material genético.....	23
Tabla 12. Clasificación de SCAs típicas en función de las ganancias y/o pérdidas de material genético.....	24
Tabla 13. Combinación de MNA y 11q- en función de las ganancias y/o pérdidas de material genético.....	25
Tabla 14. Subclasificación de ganancias y pérdidas subgrupo 2-2.....	35
Tabla 15. Subclasificación de ganancias y pérdidas subgrupo 3-2.....	36
Tabla 16. Subclasificación de ganancias y pérdidas subgrupo 3-3.....	36
Tabla 17. Combinaciones de cromosomas en tumores con perfil NCA.....	37
Tabla 18. Combinaciones de cromosomas en tumores con perfil NCA.....	38

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ¿QUÉ ES EL NEUROBLASTOMA?

El término neuroblastoma fue introducido por primera vez en 1910 por el patólogo J. H. Wright (Owens & Irwin, 2012). Es un tumor formado por células precursoras del sistema nervioso simpático. Está considerado el tumor sólido más común durante la infancia (Brodeur, 2003). Este tumor se caracteriza por manifestar un curso clínico muy heterogéneo; gran parte de los niños afectados, experimenta una regresión completa de la enfermedad con una terapia mínima, a pesar de presentar metástasis en el momento del diagnóstico, mientras que, en otros pacientes con tumores muy agresivos, y aun siendo tratados con una terapia intensiva no se consigue evitar la progresión del tumor (Brodeur, 2003); Caren *et al.*, 2010).

La localización más frecuente del neuroblastoma es la médula suprarrenal (25-40%), los ganglios simpáticos paraespinales (tórax y abdomen) y los ganglios pélvicos. En la mayor parte de los casos, estos tumores se diseminan hacia los ganglios linfáticos regionales, huesos y médula ósea (Owens & Irwin, 2012). Si bien, en bebés es frecuente un patrón único de diseminación metastásica confinado en piel e hígado (Brodeur, 2003).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

El NB es el tumor extracraneal sólido más frecuente en niños. Constituyen el 14% de los cánceres en niños menores de 5 años y el 8-10% de los cánceres en niños (Owens & Irwin, 2012). El NB presenta una incidencia de 10,2 casos por cada millón de niños menores de 15 años siendo más alta en países industrializados (Maris, 2010). La prevalencia es de 1 caso por cada 7000 nacimientos. Estos tumores se presentan más frecuentemente durante la infancia con una edad media de 17-18 meses, según autores (Owens & Irwin, 2012; Maris, 2010), aunque pueden aparecer en cualquier edad de la niñez, siendo raros en adolescentes y adultos jóvenes. Es ligeramente más frecuente en niños que en niñas (1,2:1) y no hay diferencias entre razas (Park *et al.*, 2008).

Este tumor es el responsable de aproximadamente el 6% de cánceres que aparecen en la infancia (Bown, 2001). En las últimas décadas, la supervivencia ha aumentado de forma significativa, pero aun así este tumor es el responsable del 15% de muertes en niños con cáncer, por lo que mejorar dicha supervivencia sigue siendo reto. Esta probabilidad de supervivencia varía dependiendo de diversos factores, entre los cuales se encuentra la edad, de modo que los pacientes con una edad inferior a 18 meses, tienen una probabilidad de supervivencia del 88%; los que tienen entre 18 meses y 12 años, 49% y aquellos con una edad igual o superior a 12 años, tan solo tienen un 10% de supervivencia (Cheung *et al.*, 2012).

Otro factor relacionado con la supervivencia son las cifras urinarias de catecolaminas, que se encuentran elevadas en el 90% de los pacientes (Owens & Irwin, 2012).

1.3 CLÍNICA

La sintomatología clínica de los pacientes con neuroblastoma varía en función de la localización del tumor primario y de la diseminación de las células tumorales.

Los niños que presentan la enfermedad localizada suelen ser asintomáticos, Algunos pacientes debutan con masas torácicas, que se diagnostican casualmente en radiografías por enfermedades respiratorias agudas; otros con síndrome de Horner (miosis, ptosis y anhidrosis), En otros niños con tumores paraespinales se han observado evidencias de compresión de la espinal (parálisis) (Weinstein *et al.*, 2003; Maris, 2010). Otra sintomatología que puede aparecer es el síndrome opsoclon-mioclono-ataxia (2-3%), con secuelas neurológicas y dificultades en el aprendizaje en el 70% de los casos (Owens & Irwin, 2012).

En la práctica clínica, aproximadamente la mitad de los pacientes con estos tumores presentan metástasis en el momento del diagnóstico (Owens & Irwin, 2012). Estos niños presentan síntomas sistémicos debidos a la diseminación del tumor, como fiebre y dolor de huesos (Weinstein *et al.*, 2003).

Otra sintomatología clínica sistémica considerada como forma clásica de presentación puede ser cojera, irritabilidad e incluso palidez por la anemia en los casos con afectación de la médula ósea y dolor por la implicación ósea. Por ello, debemos realizar diagnóstico diferencial con la leucemia aguda. Otra localización metastásica frecuente es la órbita, por lo que pueden padecer el síndrome de Hutchison, con proptosis y equimosis orbital, y debido a ello, muchos pacientes son diagnosticados erróneamente como víctimas de abusos físicos (Owens & Irwin, 2012; Weinstein *et al.*, 2003).

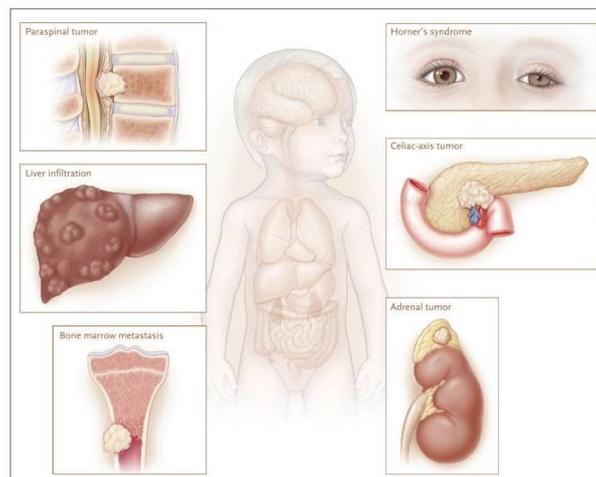


Figura 1. Presentación clínica del NB. Lugares más frecuentes donde aparecen los síntomas del NB (Maris, 2010).

1.4 DIAGNÓSTICO

La evaluación diagnóstica del neuroblastoma incluye diversas pruebas como la obtención de imágenes del tumor, mediante tomografía computarizada, resonancia magnética con contraste o exploración con metayodobencilguanidina, y otros screenings

como la medición de metabolitos de las catecolaminas en orina o en suero, que permiten el diagnóstico de neuroblastoma en pacientes asintomáticos (Park *et al.*, 2008).

Así mismo, se requiere el análisis de una muestra de tejido tumoral para la confirmación anatomopatológica del diagnóstico (biopsia) (Park *et al.*, 2008).

1.5 CLASIFICACIÓN DEL TUMOR

Existen muchas clasificaciones de los tumores NB, según diferentes características del tumor como la anatomopatología, la afectación molecular, extensión y estadificación del mismo (TNM).

No entraremos en todas ellas, aunque sí consideramos distinguir entre:

- **Neuroblastoma familiar/hereditario:**

El neuroblastoma suele darse en niños sin antecedentes familiares de la enfermedad (neuroblastoma esporádico), sin embargo, alrededor del 1-2% de los casos nuevos diagnosticados son heredados de forma autosómica dominante (Owens & Irwin, 2012). Los tumores de pacientes con neuroblastomas hereditarios, al igual que los de neuroblastomas esporádicos, presentan una gran heterogeneidad, incluso encontrándose en la misma familia, afectados por tumores benignos y malignos. Sin embargo, se diferencian en que los neuroblastomas hereditarios suelen ser diagnosticados a una edad más temprana y suelen tener más de un tumor primario (Mosse *et al.*, 2008).

La lesión más comúnmente asociada a los neuroblastomas familiares se produce en el gen que codifica el receptor de tirosina quinasa de linfoma anaplásico, llamado gen *ALK* (Mosse *et al.*, 2008), que se expresa en el sistema nervioso central durante la embriogénesis y tiene una gran importancia en el desarrollo neural, por lo tanto, esta quinasa representa una diana terapéutica para el tratamiento de estos tipos de neuroblastomas (Fransson *et al.*, 2015).

- **Neuroblastoma esporádico:**

La amplificación del gen *MYCN* (MNA) es la lesión focal más común en NB esporádico, ya que está presente en el 22% de los tumores NB. Esta alteración está asociada con un mal pronóstico del paciente, debido a que *MYCN* se expresa en el desarrollo de la cresta neural y en diversas vías que regulan su expresión y tiene como funciones la regulación de la proliferación, crecimiento, diferenciación y supervivencia de las células que desarrollan/forman el sistema nervioso central (Cheung & Dyer, 2013).

Otras características del NB esporádico son la presencia de mutaciones activadoras del gen *ALK*, en un 6-10 % de los casos, y la amplificación de este gen en un 3-4 % de los casos (Cheung & Dyer, 2013).

Por tanto, es una posibilidad que el gen *ALK* sea un conductor oncogénico en NB. Además, la alteración de este gen junto con la presencia de MNA está asociada con la letalidad del NB (Cheung & Dyer, 2013).



1.6 ALTERACIONES GENÉTICAS SOMÁTICAS EN NEUROBLASTOMA

1.6.1 Ploidía

La ploidía indica el número de cromosomas totales que contiene una célula en su núcleo. Normalmente, las células son diploides, es decir, tienen 46 cromosomas y un contenido de ADN de 1.0 determinado mediante citometría de flujo, pero existen otros tipos de ploidías, conocidas como hiperploidías, que contienen más de dos juegos de cromosomas completos y están causadas por un error en la segregación de los cromosomas durante la mitosis (Brodeur, 2003; Cheung & Dyer, 2013).

Este es el caso de las células triploides que tienen un cariotipo con 69 cromosomas y su contenido de ADN es de 1,5 (Brodeur, 2003).

El estado de ploidía es uno de los factores pronósticos considerados en bebés. Los tumores neuroblásticos diploides suelen estar asociados a MNA y a alteraciones cromosómicas segmentarias (SCAs), dando lugar a genomas inestables y por tanto a tumores agresivos con pronósticos desfavorables. Mientras que tumores con contenido de ADN situado en rangos de hiperdiploidía (>1) y cercanos a triploidía, no suelen tener alteraciones cromosómicas estructurales, sino que se asocian con alteraciones cromosómicas numéricas (NCAs) y a tumores con una menor agresividad (Brodeur, 2003; Owens & Irwin, 2012).

Sin embargo, en pacientes mayores de 1-2 años de edad, la ploidía no es un factor a tener en cuenta en el pronóstico. Esto puede ser debido a que con el transcurso de los años se van adquiriendo SCAs (Brodeur, 2003).

1.6.2 Alteraciones cromosómicas segmentarias (SCAs)

Un gran número de alteraciones genéticas han sido identificadas en NB y entre ellas destacan MNA, las variaciones en la ploidía y SCAs típicas o recurrentes, incluyendo la ganancia de cromosomas 1q, 2p y 17q, y las pérdidas de cromosomas 1p, 3p, 4p y 11q. La aplicación de técnicas multi y pangenómicas ha demostrado que estas SCAs típicas tienen impacto en el pronóstico de los pacientes (Schleiermacher *et al.*, 2012), mientras que las NCAs suelen encontrarse en pacientes con un buen pronóstico (Schleiermacher *et al.*, 2010).

Por ello, y especialmente las alteraciones 1p-, 11q- y +17q, junto con la presencia de MNA, se han incluido como marcadores genéticos para la estratificación terapéutica de los pacientes diagnosticados NB (Schleiermacher *et al.*, 2012).

Además de estas SCAs típicas, se han descrito diversas SCAs, amplificaciones, y reestructuraciones de material genético en otras regiones génicas que, aunque menos frecuentes, han mostrado asociación con la enfermedad neuroblástica (Bown, 2001).

1.6.2.1 Deleción del brazo corto del cromosoma 1 (1p-)

La importancia de la deleción terminal del brazo pequeño del cromosoma 1 (1p-) fue identificada por primera vez por Brodeur *et al.*, en 1977 y se encuentra presente en otras patologías como tumores sólidos y cánceres hematológicos (Bown, 2001).

En NB, esta alteración se suele producir en 1p22-1p36 (Bown, 2001) y es detectada en el 25-35% de los pacientes con esta enfermedad. Se cree que en la región alterada del

cromosoma 1, se encuentran diversos genes supresores de tumores que podrían explicar su agresividad, como por ejemplo *CHD5*, *KIF1B* y *p53* (Owens & Irwin, 2012).

La delección 1p- se asocia al estadio 4 según la estratificación de grupos de riesgo de NB, a un contenido cromosómico diploide, a la presencia de MNA y +17q. Pero también hay un número menor de tumores, diagnosticados en pacientes menores de 18 meses, que presentan 1p- y no presentan MNA (Owens & Irwin, 2012).

1.6.2.2 Delección del brazo largo del cromosoma 11 (11q-)

La pérdida de heterocigosidad del brazo largo del cromosoma 11 dando lugar a una delección (11q-) está presente en alrededor del 35-45% de los NBs (Owens & Irwin, 2012).

Como en el caso de la SCA típica 1p-, se cree que esta alteración, detectada principalmente en la región 11q23, es importante en esta patología porque esta región mencionada, contiene genes supresores de tumores. Sin embargo, a diferencia de 1p-, la alteración 11q- no suele asociarse a la presencia de MNA en tumores NB (Attiyeh *et al.*, 2005).

1.6.2.3 Ganancia del brazo largo del cromosoma 17 (+17q)

La ganancia terminal del brazo largo del cromosoma 17 (+17q) es la SCA más comúnmente detectada en NB (se encuentra en el 50% de los pacientes con NB). A menudo, esta alteración se encuentra en tumores NBs agresivos y como se ha comentado anteriormente, a menudo se relaciona con la delección 1p y 11q y MNA. Los puntos de corte de esta alteración son variables, si bien se ha descrito que muchas de las ganancias empiezan en 30-50 Mb y se extienden hasta el telómero (Owens & Irwin, 2012).

1.6.2.4 Amplificación del gen *MYCN* (MNA)

El proto-oncogen *MYCN*, se encuentra en el cromosoma 2p, en la región 2p24, y su amplificación se encuentra en el 16-25% de los pacientes con NB, pero en casi la mitad de las formas metastásicas de este tumor. Este gen codifica las proteínas Myc que son factores de transcripción involucrados en los mecanismos de crecimiento, proliferación, diferenciación y apoptosis celular, y en las células progenitoras neurales regula la proliferación y diferenciación (Owens & Irwin, 2012).

Por ello, cuando este gen se encuentra sobreexpresado, las células adquieren una capacidad de transformación maligna mayor, así como un aumento en la progresión del ciclo celular (Owens & Irwin, 2012).

La presencia de esta alteración, junto con la edad y el estadio, es uno de los mayores factores pronósticos en NB y está asociada a tumores muy agresivos, de forma que los pacientes con MNA se caracterizan por tener una supervivencia menor. Además, algunos pacientes clasificados en estadios de bajo riesgo sin presencia de MNA, pueden desarrollar esta alteración, pasando a tener un pronóstico pobre (Brodeur, 2003).

La amplificación homogénea de *MYCN* (homMNA) se describe como la presencia del cuádruple de la señal de referencia del gen *MYCN* mientras que la hetMNA (MNA heterogénea) se refiere a la heterogeneidad intratumoral de MNA, es decir, la coexistencia de células con MNA (y a menudo ganancias de MNA) con células sin MNA. (Berbegall *et al.*, 2016) La presencia de hetMNA es muy escasa en NB, estando solo presente en el 1-2% de



los NB. Se presenta en pacientes con características clínicas y pronósticas diferentes (P. F. Ambros *et al.*, 2009; Berbegall *et al.*, 2018).

A pesar de conocer la importancia de esta alteración como factor de pronóstico, aún no se ha conseguido desarrollar una terapia eficaz para el tratamiento del NB que tenga como diana el gen *MYCN* (Owens & Irwin, 2012).

1.7 TÉCNICAS PANGENÓMICAS

El NB presenta inestabilidad genómica y poblaciones de células genéticamente heterogéneas. Las técnicas para detectar variaciones en el número de copias cromosómicas (CNVs) han cambiado mucho con los años y han ido aumentando, su precisión y capacidad para detectar alteraciones genéticas más pequeñas, e incluso cubrir todo el genoma con una resolución mayor. Desde métodos de análisis como Fluorescence in situ hybridization (FISH) que permite un análisis más limitado de regiones génicas, pasando por métodos de análisis multilocus como las técnicas Comparative Genomic Hybridization (CGH) y Multiplex Ligation–dependent Probe Amplification (MLPA), hasta microarrays de alta densidad, más utilizados en la actualidad como Comparative Genomic Hybridization (CGH arrays) o Single Nucleotide Polymorphisms arrays (aSNP) con las que se obtiene un gran resolución con un escaso material tumoral de partida (I. M. Ambros *et al.*, 2011; Speicher & Carter, 2005). En definitiva, el avance técnico ha permitido estudiar de forma exhaustiva un mayor número de tumores y sus alteraciones cromosómicas en detalle con una gran resolución. Los resultados de estas técnicas han proporcionado información acerca de la asociación entre NCAs y una elevada supervivencia de los pacientes con tumores con perfil NCA frente a los pacientes con tumores con perfil SCAs que se han relacionado con un alto riesgo a recaídas y un tiempo de supervivencia menor (Villamon *et al.*, 2013).

1.7.1 Arrays de SNPs

Los CNVs son importantes contribuyentes a la variación genética humana, ya que representan más del 15% de la variabilidad genética del genoma. Los CNVs son segmentos cromosómicos, de al menos 1000 Kb que presentan un número variable de copias en comparación con el genoma de referencia (LaFramboise, 2009).

Como ya se ha mencionado, la técnica pangenómica más utilizada en la actualidad es el array de SNP, ya que permiten identificar zonas con CNVs en el genoma humano con una alta eficiencia. Aunque inicialmente esta técnica se concibió para genotipar, pronto se descubrió su capacidad y utilidad para detectar CNVs (Kennedy *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004).

Esta técnica se basa en el principio bioquímico de que las bases de nucleótidos se unen a sus bases complementarias específicamente (A se une a T y C se une a G). Los arrays de SNPs usan oligonucleótidos cortos que permiten cubrir un SNP en particular. Las sondas se sintetizan para que coincidan con cada uno de los posibles alelos, de forma que, al comparar la intensidad de fluorescencia de los dos conjuntos de sondas, se permite el genotipado y la intensidad de fluorescencia permite inferir el número de copias del array (LaFramboise, 2009).

Las plataformas de arrays de SNP más frecuentemente utilizadas son de las casas comerciales, Affymetrix e Illumina. A grandes rasgos los resultados que proporcionan son similares en resolución, análisis y presentación de los resultados con algunas diferencias debidas al fundamento de la técnica, ensayo, y las sondas contenidas en cada microarray.

En el ensayo de Affymetrix, hay sondas de 25 nucleótidos para ambos alelos, y la localización del locus SNP varía de sonda a sonda. El ADN monocatenario se une a las dos sondas independientemente del alelo que porta, pero la intensidad de señal nos permite identificar las uniones con más eficiencia (amarillo brillante) de aquellas uniones inespecíficas (amarillo tenue), como se observa en la Figura 2. En el caso de la plataforma Illumina, las sondas son de 50 nucleótidos, y la extensión se produce base a base, de manera que si la base añadida es complementaria al alelo portado en el ADN se une y se observa una señal del color correspondiente a dicha base (roja para A-T y verde para G-C). En ambas plataformas, se usan algoritmos computacionales que convierten las señales crudas en inferencias de acuerdo a la presencia o ausencia de cada uno de los dos alelos (LaFramboise, 2009).

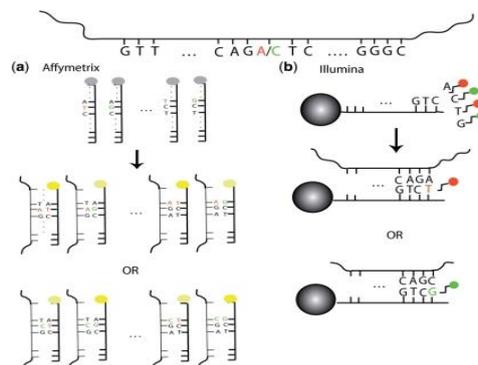


Figura 2. Esquema de los ensayos de arrays de SNPs. a) Plataforma Affymetrix; b) Plataforma Illumina. (LaFramboise, 2009)

1.8 ESTRATIFICACIÓN DE GRUPOS DE RIESGO EN PACIENTES CON NB

Los factores pronósticos se han utilizado para clasificar los pacientes con NB de acuerdo a su riesgo de recaída o muerte, desde hace varias décadas e incluso se han desarrollado diversos consensos como el International Neuroblastoma Staging System (INSS) que establecía una estratificación de los pacientes en diversos estadios. (Brodeur *et al.*, 1988) La clasificación más reciente, establecida en 2009, por el International Neuroblastoma Risk Group (INRG, Tabla 1) fue desarrollada para facilitar la comparación de los grupos de riesgo en todo el mundo y establecer la terapia más adecuada para cada paciente (Cohn *et al.*, 2009).

Esta estratificación atiende a distintos factores pronósticos (13): el estadio, la edad, la histopatología (categoría y grado de diferenciación), la ploidía y alteraciones cromosómicas específicas como la amplificación del gen *MYCN* y la delección del brazo cromosómico 11q; y de esta forma, clasifica a los pacientes según su riesgo de muerte en grupos: Muy Bajo, Bajo, Intermedio y Alto (Very Low, Low, Intermediate y High Risk) (Cohn *et al.*, 2009).

Tabla 1. Clasificación de tumores según INRG. Estratificación de los NB en 5 estadios: L1/L2, L1, L2, M y MS, según la edad, la histopatología, el estado del gen *MYCN*, la presencia de 11q- y la ploidía, para establecer el grupo de riesgo pre-tratamiento. M, meses; NA, no amplificado; Amp, amplificado; GNB, ganglioneuroblastoma. (Cohn *et al.*, 2009)

INRG Stage	Age months	Histological Category/Grade of Tumor Differentiation	MYCN	11q aberration	Ploidy	Pre-treatment Risk Group
L1/L2		GN maturing GNB intermixed				A Very Low
L1		Any, except GN maturing or intermixed	GNB	NA		B Very Low
				Amp		K High
L2	<18m	Any, except GN maturing or intermixed	GNB	NA	No	D Low
					Yes	G Intermediate
	≥18m	GNB nodular, differentiating NB, differentiating	NA	No	E Low	
				Yes	H Intermediate*	
		GNB nodular, poorly differentiated or undifferentiated NB, poorly differentiated or undifferentiated	NA		H Intermediate*	
				Amp	N High	
M	<18m		NA		Hyperdiploid	F Low
	<12m		NA		Diploid	I Intermediate
	12m-<18m		NA		Diploid	J Intermediate
	<18m		Amp			O High
	≥18 m					P High
MS	<18m			No		C Very Low
				Yes		Q High
				Amp		R High

1.9 PERFIL DE EXPRESIÓN EN NEUROBLASTOMA

Con los estudios del perfil de expresión, se intenta determinar qué genes son importantes en NB.

La expresión de los receptores neurotróficos de la tirosina quinasa *TRKA*, *TRKB* y *TRKC* están asociados al éxito de supervivencia en pacientes con NB. Se ha observado un nivel de expresión elevado de *TRKA* y *TRKC* en tumores NBs favorables, mientras que un nivel de expresión de estos genes bajo o ausente se relaciona con un mal pronóstico. Sin embargo, la expresión del gen *TRKB*, se asocia a MNA y tumores más agresivos (Brodeur, 2003).

La expresión del gen *MYCN* es importante en el proceso temprano de desarrollo y luego disminuye para completar el desarrollo de la diferenciación embrionaria. La expresión de este gen puede estar controlada por microARNs con funciones oncogénicas o supresoras de tumores (Beckers *et al.*, 2015).

1.10 TRATAMIENTO

El tratamiento va a depender de la localización o diseminación del tumor. Se hace necesaria una atención multidisciplinaria, que es crucial para optimizar los resultados. Dependiendo de la estratificación del riesgo del paciente, las opciones de tratamiento son:

- Observación
- Cirugía
- Quimioterapia
- Quimioterapia seguida de cirugía
- Y en los casos de alto riesgo, una combinación de quimioterapia, cirugía, radioterapia, inmunoterapia e incluso trasplante (Cohn *et al.*, 2009).



2. OBJETIVOS

La gran heterogeneidad de comportamientos clínicos del neuroblastoma viene condicionado en parte por la presencia de alteraciones cromosómicas segmentarias (SCAs) y alteraciones cromosómicas numéricas (NCAs) en el genoma tumoral de los pacientes con esta patología. Así que, es necesario obtener el perfil genético de los tumores para determinar los distintos factores pronósticos conocidos que poseen y utilizarlos para estratificar a los pacientes en función del grupo de riesgo al que pertenecen (establecido por la INRG). Una vez clasificado dentro de un grupo de riesgo, se establece la estrategia terapéutica más idónea para cada enfermo.

En el momento actual no se conoce el valor pronóstico del número de SCAs y NCAs, ni la cantidad de kilobases ganadas o pérdidas como resultado de las variaciones en el número de copias cromosómicas y, por tanto, no se utiliza en dicha estratificación terapéutica.

En el presente trabajo, se pretende:

1. Asociar el número de SCAs totales y SCAs típicas, en el grupo de tumores con perfil de SCAs, haciendo especial atención en los tumores *MYCN* amplificados y/o delecionados 11q al:
 - 1.1 Predominio de ganancias o pérdidas de material genómico generado.
 - 1.2 Estado combinatorio del tamaño del material genómico ganado y/o perdido.
2. Determinar en el grupo de tumores con perfil de NCAs:
 - 2.1 El número de ganancias y pérdidas cromosómicas completas.
 - 2.2 El cromosoma más implicado.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MUESTRAS ESTUDIO

Se seleccionaron 195 NBs primarios procedentes de pacientes españoles diagnosticados con enfermedad neuroblástica en el Departamento de Patología (Facultad de Medicina y Odontología, UV/Incliva) de los que se disponía del perfil de cambios en el número de copias cromosómicas.

Extracción de ADN: La extracción de ADN se realizó con diferentes métodos según el tejido. En el caso de tejido fresco o congelado se realizó la extracción con fenol-cloroformo y tratamiento con proteinasa K, siguiendo el método “salting-out”. En el caso de tejido incluido en parafina, el ADN se extrajo usando el método de extracción con fenol-cloroformo y tratamiento con proteinasa K, con el método de extracción con tampón con alta concentración de Fosfato. La pureza del ADN se determinó con espectrofotometría (NandoDrop ND-1000), con valores de absorbancia 260/280 y 260/230. La cantidad de ADN se determinó con métodos fluorométricos (Qubit y Picogreen).

3.2 TÉCNICA DE ARRAYS DE SNPs

Los perfiles genéticos de los tumores de pacientes diagnosticados con NB se obtuvieron mediante arrays de SNPs a partir de 40-150 ng de ADN.

Se utilizaron hasta 5 plataformas diferentes según la disponibilidad del laboratorio y el tipo de tejido de los tumores (parafina/congelado): GeneChip Human Mapping NSpl 250K, CytoScan HD y OncoScan de Affymetrix (Affymetrix Inc., CA); HumanCytoSNP-12 BeadChip y HumanCytoSNP FFPE-12 BeadChip de Illumina (Illumina, Inc., CA).

3.3 ANÁLISIS DE PATRONES GENÉTICOS

Para cada caso se disponía de la información de qué cromosoma se encontraba alterado, y el tipo de alteración. Para este estudio, se realizó la visualización de los perfiles de aSNP y se anotó la posición del punto de ruptura de los cromosomas alterados y su estado de ganancia, pérdida o amplificación, diferenciando SCA (>2 Mb) y FSCA (<2 Mb). Se usó la información recogida en USC Genome Browser en el caso de FSCA para descartar CNV no patológicos (<https://genome.ucsc.edu/>).

Para la evaluación de la cantidad de material genético ganado o perdido en cada cromosoma de forma segmentaria o completa se visualizaron tanto los perfiles cromosómicos individuales como la visión global de todos los cromosomas, es decir el perfil completo, anotando el número de kilobases (kb) existentes entre las posiciones de los puntos de ruptura, el estado de cada alteración, así como la cantidad de kb de los cromosomas completos ganados o perdidos.

Para llevar a cabo el análisis de los datos brutos generados (.CEL o .txt) con los arrays de SNPs se usaron los softwares proporcionados por las casas comerciales, ChAS



Material y métodos

(Affymetrix) KaryoStudio y GenomeStudio (Illumina) y el software libre CNAG Versión 3.0 (Affymetrix 250K) (Yamamoto *et al.*, 2007).

Estos softwares permiten tener información de la posición de las alteraciones en los cromosomas, el tamaño de las alteraciones (kb), una estimación del número de copias, el número de SNPs que contiene cada alteración y los genes que se encuentran en cada región. El número de copias, la información de alelo (BAF, B-allele frequency o Allele Difference), Smoothed LogR y log2ratio, nos permiten determinar el tipo de alteración en cada caso. Cuando estos valores se encontraban alterados se diagnosticaron ganancias, pérdidas/deleciones, amplificaciones y SCAs focales.

El BAF representa los desequilibrios alélicos, ya que muestra la proporción de los dos alelos investigados (A y B). Un valor de BAF de 0,5 indica un genotipo heterocigoto (AB), mientras que un valor de 0 y 1 es característico de un genotipo homocigoto, con AA y BB respectivamente. Cuando el cromosoma es disómico en el BAF se ven 3 bandas ("tracks") de puntos correspondientes a 0, 0,5 y 1, que representan los clusters de los haplotipos AA, AB y BB.

En los tumores analizados se discrimina el número de copias observando el patrón y los valores del BAF (o Allele Difference con ChAS) conjuntamente con el Smoothed LogR. Si el cromosoma que analizamos tiene dos copias (disómico) el valor del Smoothed LogR y es 0 y el del BAF 0%, 50% y 100%.

Las ganancias de material genético se observan con 4 bandas en el BAF, en lugar de 3, con los valores similares de BAF de 0% y 100%, y con el valor de 50% separado en dos bandas que se aproximan a 25% y 75%, y con una desviación del valor del log2ratio que aumenta respecto al valor de disomía. Las amplificaciones presentan un patrón genético similar al de las ganancias, pero el valor del log2ratio se ve más incrementado. En las pérdidas de material genético se observa un perfil genético con 4 bandas en el BAF y valores de BAF de 0% y 100% como en el estado disómico, y con el valor del 50% separado en dos que se aproximan a 25% y 75%, pero esta vez acompañada de una desviación del valor del log2ratio que disminuye respecto al valor de disomía.

A continuación, en la Figura 3 se muestran ejemplos de perfiles de cambio en el número de copias con los diversos softwares usados.

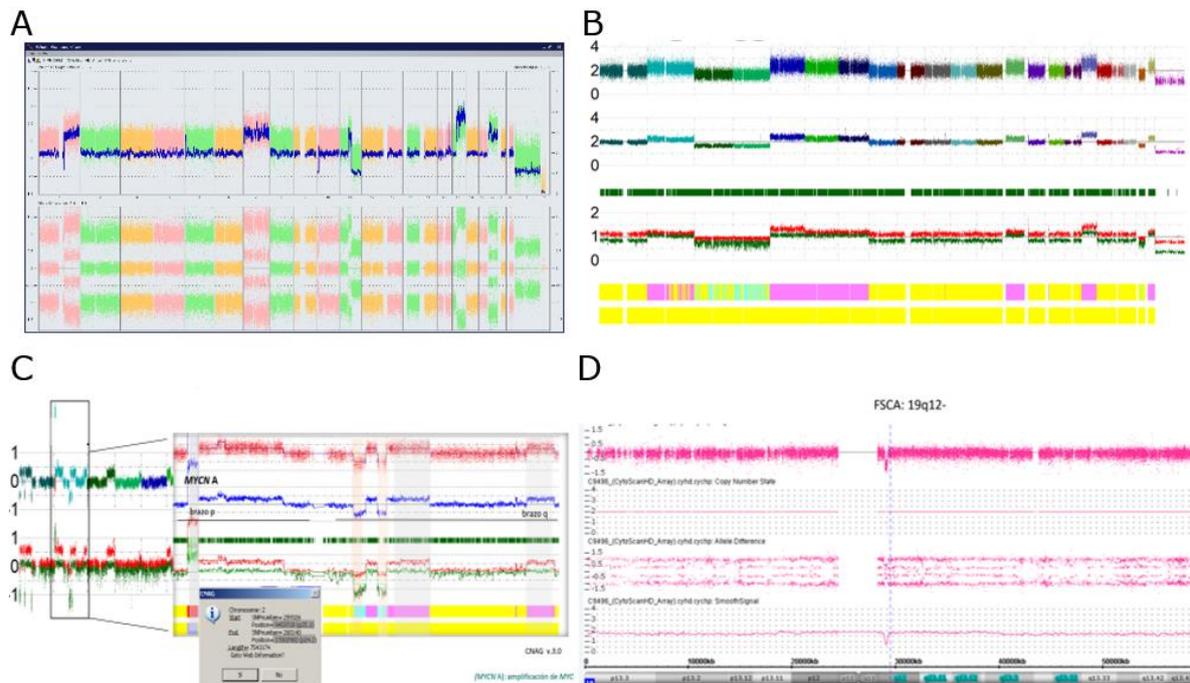


Figura 3. Ejemplos de visualización de perfiles de cambio en el número de copia. A) Vista del perfil completo con ChAS con SCAs y NCAs. B) Visualización de perfil NCA obtenido con el software CNAG y plataforma de array de SNP Affymetrix. C) Perfil SCA (pérdidas y ganancias) con detalle del cromosoma 2, con amplificación de *MYCN* (2p24.3) y con 2 pérdidas y 2 ganancias en 2q, con CNAG. D) Pérdida focal (FSCA) en 19q vista con ChAS.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PERFIL GLOBAL DE CAMBIOS EN EL NÚMERO DE COPIAS: SCAs Y NCAs

El perfil de cambios en el número de copias de los 195 NBs primarios se clasificó como SCA en 152 casos (77,9%) y NCA en 43 (22,1%). La distribución de los tumores estudiados no se ajustó a lo descrito en general en los estudios pangenómicos de NB, ya que los casos con perfil genético SCA representan alrededor del 30-40% de los NB, un 40-50% de los NB tienen un perfil de NCA y un 10% un perfil plano (P. F. Ambros *et al.*, 2009; Janoueix-Lerosey *et al.*, 2009; Vandesompele *et al.*, 2005). Esta desviación entre la distribución descrita de los perfiles de NB y la distribución obtenida en este estudio se debe a que los casos se seleccionaron por el interés de estudio de los casos con peor pronóstico, es decir los casos con SCAs.

Se calculó en cada caso la cantidad de material genético ganado y/o perdido (kb) para cada cromosoma y caso, tanto para muestras con perfil SCAs como con perfil de NCAs. En los casos con perfil SCA y NCA se realizó el recuento del número de SCAs y NCAs respectivamente.

4.2 ANÁLISIS DE LOS PERFILES GÉNICOS SCA SEGÚN EL NÚMERO DE KILOBASES

4.2.1 Grupos según el predominio de ganancia o pérdida del material genético generado

Se calculó el cómputo de la inestabilidad del material genético en cada uno de los tumores con perfil SCA, según la cantidad de material genético neto ganado o perdido como consecuencia de las SCAs. La cantidad de material genético neto se definió como un valor absoluto resultante de la diferencia entre el material genético ganado total (en kb) y el material genético perdido total (en kb) en cada tumor, sin considerar alteraciones de pequeño tamaño como las FSCA ni amplificaciones.

Como resultado se obtuvieron 3 grupos de inestabilidad genética del tumor:

- a) Equilibrado: idéntica cantidad de material genético perdido y ganado.
- b) Pérdida: la cantidad de material genético perdido es mayor que el ganado.
- c) Ganancia: la cantidad de material genético ganado es mayor que el perdido.

Se observó en torno a qué rangos se ajustaban los valores de los grupos b y c, y se subclasificaron los casos en base a la cantidad de material genético neto de la siguiente forma: subgrupo 1 de 1 a 50.000 kb, subgrupo 2 de 50.000 a 200.000 kb, subgrupo 3 de >200.000 kb. El tamaño medio de pérdida neta del subgrupo b1 fue de 20.774 kb, del subgrupo b2 de 96.836 kb y del subgrupo b3 de 315.312 kb. El tamaño medio de ganancia neta del subgrupo c1 fue de 28.110 kb, del subgrupo c2 de 94.390 kb y del subgrupo c3 de 320.313 kb.

Con esta agrupación en función del material genético neto resultante, ganado o perdido, en los 152 NB, se obtuvieron 7 posibilidades de perfiles tumorales cuyas características se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Grupos de inestabilidad y sus características genéticas. Cantidad neta de material genético alterado: 1, 1.000-50.000 kb; 2, 50.000-200.000 kb y 3, >200.000 kb. N, número de casos; SCA, alteraciones cromosómicas segmentarias; SCAs típicas, SCAs descritas frecuentemente en NB con significado pronóstico conocido (1p-, +1q, +2p, 3p-, 4p-, 11q- y +17q) (Ambros *et al.*, 2009); kb, kilobases. Algunos datos se destacan en negrita por su importancia que se comenta en el texto.

GRUPOS DE INESTABILIDAD	N (%)	% (subgrupo)	NÚMERO TOTAL SCAs		SCAs TÍPICAS		SCAs TÍPICAS (Kb)				NÚMERO SCAs ATÍPICAS
			MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	GANANCIAS		PÉRDIDAS		
							MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	
a) EQUILIBRADO	1 (0,7)	100	2	-	2	-	46.395	-	62.628	-	0
b) PÉRDIDA	1	34 (22,4)	5,7	1-16	2,5	0-6	53.113	0-134.834	73.103	0-174.077	5
	2	31 (20,4)	6,9	2-18	2,7	0-5	50.397	0-123.568	106.830	0-250.684	1
	3	1 (0,7)	1,5	8	-	6	-	100.104	-	169.716	0
c) GANANCIA	1	26 (17,1)	3,9	1-13	1,8	0-6	50.753	0-150.648	35.950	0-148.356	5
	2	37 (24,3)	7,2	1-17	2,6	0-6	72.853	0-217.880	55.124	0-295.700	1
	3	22 (14,5)	25,9	10,3	2-24	3,3	0-6	138.646	0-338.699	63.507	0-188.268

Tal y como se detalla en la Tabla 2 (color azul oscuro de cabecera) el número de casos con pérdida en base al material genético neto (grupo b) fue 66 mientras que fue 85 para los casos con ganancia neta (grupo c).

La mayor parte de los casos (n=37, 24,3%), se encuentra en el grupo de ganancia neta c2. El siguiente grupo en orden de frecuencia es el b1 de pérdida neta que posee el 22,4% de los casos (n=34), seguido del b2 con el 20,4% (n=31). Por tanto, los grupos de inestabilidad más frecuentes son el de material ganado medio (50.000-200.000 kb) y los de material perdido bajo (1.000-50.000 kb) y medio (50.000-200.000 kb).

Tan solo observamos dos casos aislados y se corresponden con un caso en el cual el valor neto de material genético resultante es 0, y un caso situado en el grupo b3, con mayor pérdida que ganancia, que representan un 0,7% cada uno del total de casos.

4.2.1.1 Asociación con el número de SCAs totales y SCAs típicas

De estos grupos, como se observa en la Tabla 2 (color azul claro de cabecera), se calculó en cada subgrupo la media y el rango del número de SCAs totales, la media y el rango de SCAs típicas, la media y el rango de la cantidad de material genético en kb ganado y/o perdido en las SCAs típicas y por otro lado, el número de SCAs atípicas.

La media del número de SCAs totales, fue mayor para aquellos casos que tenían mayor cantidad de material genético en ganancias que en pérdidas (subgrupos c2 y c3), no obstante, el rango del número de SCAs de los casos con ganancia neta respecto a los casos con pérdida neta, no presentaban grandes diferencias, y solo fue mayor en el subgrupo c3.

El número medio de SCAs totales en general fue medianamente elevado (>3) en todos los grupos excepto en el grupo a. Cabe destacar que el rango fue variable ya que en todos los grupos existen tumores con un número de SCAs mínimas (1 y 2).

Se observó que el número medio de SCAs típicas fue próximo a 3 y muy similar en la mayoría de los grupos, no obstante, la mayoría de los subgrupos presentaban algún caso sin presencia de SCAs típicas. Este valor medio fue mayor cuanto mayor número de SCAs tenían los tumores, siendo especialmente alto en el subgrupo b3 (pérdida neta alta) que únicamente presentaba un caso, en el cual se observaron 6 SCAs típicas y en el subgrupo c3 (ganancia neta alta) en el que había una media de 3,3 SCAs típicas. A más SCAs típicas hubo más ganancias y pérdidas de material genético neto. En general las SCA típicas están en cada grupo de pérdidas y ganancia (grupos b y c) contribuyendo considerablemente al material neto resultante.

El tamaño medio de ganancias de SCAs típicas en los tumores con inestabilidad neta en pérdidas (grupo b) fue de 53, 50 y 100 Mb, ligeramente menor al tamaño de las SCAs típicas en el grupo de ganancia (grupo c) con 50, 72 y 138 Mb.

El tamaño medio de pérdidas de SCAs típicas en los tumores del grupo con inestabilidad neta en pérdida (grupo b) con 73, 106 y 169 Mb fue mayor que en el grupo de ganancia (grupo c) con 35, 55 y 63 Mb.

En la mayoría de grupos existen casos sin presencia de SCAs típicas, sino que las SCAs son atípicas. De entre los 152 tumores únicamente 13 (8,55%) no presentan SCAs típicas. La mayoría de estos casos se encuentran en el grupo b1 (n=5, 3,3%) y c1 (n=5, 3,3%). La frecuencia de estos casos con perfil de SCAs pero sin SCAs típicas, perfil atípico, en NB es muy baja (Schleiermacher *et al.*, 2007). No obstante son casos en los que se han descrito características clínicas también atípicas y requieren una atención especial (Guimier *et al.*, 2014).

4.2.1.2 Asociación con las diversas SCAs típicas y MNA

La Tabla 3 recoge el número de casos totales con la presencia de cada SCA típica y la frecuencia del total de cada alteración respecto a los 152 tumores, el número de casos en cada subgrupo con cada una de las alteraciones típicas y la frecuencia (%) respecto al total de casos de cada SCA típica y la presencia de MNA y su frecuencia respecto al total en cada subgrupo.

Tabla 3. Detalle de SCAs típicas y MNA. Cantidad neta de material genético alterado: 1, 1.000-50.000 kb; 2, 50.000-200.000 kb y 3, >200.000 kb. N, número de casos; SCA, alteraciones cromosómicas segmentarias; SCAs típicas, SCAs descritas frecuentemente en NB con significado pronóstico conocido; MNA, amplificación del gen *MYCN*. Algunos datos se destacan en negrita por su importancia que se comenta en el texto.

GRUPOS DE INESTABILIDAD	N (%)	SCAs TÍPICAS							MNA (%)	
		N 1p- (%)	N +1q (%)	N +2p (%)	N 3p- (%)	N 4p- (%)	N 11q (%)	N +17q (%)		
TOTAL	152 (100)	64 (40,2)	30 (19,7)	56 (36,8)	38 (25)	18 (11,8)	68 (44,7)	118 (77,6)	56 (36,8)	
a) EQUILIBRADO	1 (0,7)	0	0	0	1 (2,6)	0	0	1 (0,8)	0	
b) PÉRDIDA	1	34 (22,4)	16 (25)	5 (16,7)	12 (21,4)	6 (15,8)	4 (22,2)	18 (26,4)	25 (21,2)	16 (28,6)
	2	31 (20,4)	19 (29,7)	0	10 (17,9)	13 (34,2)	3 (16,7)	17 (25)	23 (19,5)	15 (26,8)
	3	1 (0,7)	1 (1,6)	0	1 (1,8)	1 (2,6)	1 (5,6)	1 (1,5)	1 (0,8)	0
c) GANANCIA	1	26 (17,1)	11 (17,1)	3 (10)	5 (8,9)	3 (7,9)	3 (16,7)	3 (4,4)	18 (15,3)	10 (17,9)
	2	37 (24,3)	13 (20,3)	11 (36,7)	12 (21,4)	7 (18,4)	7 (38,9)	14 (20,6)	31 (26,3)	10 (17,9)
	3	22 (14,5)	4 (6,3)	11 (36,7)	16 (28,6)	7 (18,4)	0	15 (22,1)	19 (16,1)	5 (8,9)

Las SCAs típicas detectadas por orden de frecuencia fueron: +17q (118, 77,6%), 11q- (68, 44,7%), 1p- (64, 40,2%), +2p (56, 36,8%), 3p- (38, 25%), +1q (30, 19,7%) y 4p- (18, 11,8%), y MNA (56, 36,8%) (Tabla 3). Estos resultados son acordes a lo descrito en NB (Cohn *et al.*, 2009) donde frecuentemente se observa ganancia de +17q, y la frecuencia de MNA se encuentra en torno a 20%.

Excluyendo el caso con pérdida y ganancia equilibrada y el que presentó una pérdida neta de más de 200.000 k, se destaca respecto a las SCAs típicas que:

Delección 1p: se observa que la mayor parte de casos con esta alteración se encuentran en los subgrupos con pérdida neta de material genético (subgrupos b1 y b2) con 16 y 19 casos cada uno (26,2 y 29,7%).

Ganancia 1q: los subgrupos con más número de casos son el c2 y el c3, ambos con 11 casos cada uno (36,7% cada uno). La alteración +1q se presenta en casos con un número alto de SCAs, en los subgrupos c2 y c3, cuyo número medio de SCAs de 7,2 y 10,3 respectivamente. Es notable que en el subgrupo b2 no existe ningún tumor que presente esta alteración. La frecuencia de la alteración +1q observada en este estudio (19,7%) es similar a la descrita por otros autores (20%) (Michels *et al.*, 2007).

Ganancia 2p: la distribución fue relativamente homogénea en los subgrupos b1, b2, c2 y c3, presentándose ligeramente incrementada en el subgrupo c3 (28,6%).

Delección 3p: fue más frecuente en el subgrupo b2 (34,2%). Los subgrupos c2 y c3 juntos, presentaron un 36,8% de tumores con 3p-. Por tanto, 3p- no se asoció solo a casos con más material en delección sino también a casos con cantidad media-alta de material ganado.

Delección del 4p: en el subgrupo c3 con ganancia neta alta de material genético no se identificó ningún tumor con esta alteración y, sin embargo, en el subgrupo c2 siendo un grupo con ganancia neta media presentaba el mayor número de casos con dicha SCA (n=7, 38,9%).

La distribución de los casos con **11q-** fue similar a la de los casos con 3p-, pero la alteración 11q- es más frecuente que 3p- y esta alteración (11q-) se presenta en un número de casos similar en los subgrupos de pérdida neta media y alta (subgrupos b1 y b2), mientras que en la alteración 3p- en el subgrupo b2 se presenta en alrededor del doble de casos que en el subgrupo b1.

La alteración típica **+17q** fue la más frecuente en todos los subgrupos y se observó un mayor número de casos en el subgrupo c2.

Se consideró **MNA** tanto a casos con amplificación homogénea de *MYCN* (homMNA) como a casos con amplificación heterogénea de *MYCN* (hetMNA). La presencia de MNA fue más frecuente en los grupos con inestabilidad total en pérdidas (grupos b1 y b2, con un 28,6 y 26,8 % respectivamente) que, en ganancias (17,9%, 17,9% y 8,9% respectivamente). En el subgrupo de ganancia neta alta (subgrupo c3) únicamente se ha observado la presencia de MNA en 5 de los 22 tumores que contiene.

El 36,8% de los tumores que se han incluido en este estudio presentaban MNA, pero está descrito que esta alteración se encuentra presente en el 20-25% de los NBs (Berbegall *et al.*, 2016), por lo que en el estudio la frecuencia es mayor que la descrita, ya que como se ha mencionado anteriormente los tumores estudiados fueron seleccionados por su agresividad.

4.2.1.3 Asociación MNA y 11q-

Debido a que se conoce de antemano que MNA y 11q- son dos alteraciones excluyentes salvo excepciones (Caren *et al.*, 2010; Villamon *et al.*, 2013), se decidió estudiar de forma separada los tumores en función de la presencia/ausencia de estas



Resultados y discusión

alteraciones y se determinó su frecuencia (Tabla 4). Para ello, se contabilizaron los casos con homMNA y hetMNA por separado.

Tabla 4. Combinación MNA 11q- en función de grupos de inestabilidad. Cantidad neta de material genético alterado: 1, 1.000-50.000 kb; 2, 50.000-200.000 kb y 3, >200.000 kb. N, número de casos; MNA, amplificación del gen *MYCN*; homMNA, MNA homogénea; hetMNA, MNA heterogénea. Algunos datos se destacan en negrita por su importancia que se comenta en el texto.

GRUPOS DE INESTABILIDAD	N (%)	noMNA		homMNA		hetMNA		
		N no 11q- (%)	N 11q- (%)	N no 11q- (%)	N 11q- (%)	N no 11q- (%)	N 11q- (%)	
TOTAL	152	44 (28,9)	52 (34,2)	31 (20,4)	8 (5,3)	9 (5,9)	8 (5,3)	
a) EQUILIBRADO	1 (0,7)	1 (2,3)	0	0	0	0	0	
b) PÉRDIDA	1	34 (22,4)	6 (13,6)	12 (23,1)	8 (25,8)	1 (12,5)	2 (22,2)	5 (62,5)
	2	31 (20,4)	5 (11,4)	11 (21,2)	8 (25,8)	5 (62,5)	1 (11,1)	1 (12,5)
	3	1 (0,7)	0,0	1 (1,9)	0	0	0	0
c) GANANCIA	1	26 (17,1)	13 (29,5)	3 (5,8)	9 (29)	0	1 (11,1)	0,0
	2	37 (24,3)	15 (34,1)	12 (23,1)	3 (9,7)	1 (12,5)	5 (55,6)	1 (12,5)
	3	22 (14,5)	4 (9,1)	13 (25)	3 (9,7)	1 (12,5)	0	1 (12,5)

De los 152 tumores estudiados, las combinaciones de MNA 11q- más frecuentes fueron noMNA no11q- presente en 44 tumores, noMNA 11q- presente en 52 tumores y homMNA no11q- que se encontraba presente en 31 de los tumores.

Los subgrupos con ganancia neta (grupo c) incluyeron más casos sin el doble golpeo, MNA 11q-, que los grupos con pérdida neta, 72,7% (29,5 + 34,1 + 9,1) vs 25% (13,6 + 11,4). No obstante, el subgrupo c3 solo presentó 4 casos (9,1%) sin el doble golpeo, frente a los subgrupos c1 y c2, con 13 casos (29,5%) y 15 casos (34,1%). La ausencia de MNA y presencia de 11q- se distribuía en los subgrupos de forma uniforme, excepto en el subgrupo c1 con solo 3 tumores (5,8%).

Los tumores con homMNA no11q- fueron más frecuentes en los subgrupos con pérdida neta (b1 y b2) con 8 casos cada uno (25,8%) y en el grupo c1 con 9 casos (29%). Se identificaron pocos casos (8), con el doble golpeo, homMNA 11q-, y la mayor parte de ellos se encontraban en el subgrupo b2 (62,50%), mientras que la combinación hetMNA 11q- se encontraba mayoritariamente en el subgrupo b1 (62,5%).

Finalmente, se observó que la combinación hetMNA no11q- que únicamente estaba presente en 9 tumores, se distribuía mayoritariamente en el subgrupo de ganancia neta c2 (55,6%).

Por lo tanto, se corroboró que el doble golpeo es muy poco frecuente (Caren *et al.*, 2010; Villamon *et al.*, 2013).

La incidencia de hetMNA en tumores primarios según la bibliografía consultada era de 1,1%, (Berbegall *et al.*, 2016) sin embargo en este estudio, se observó una incidencia del 11,2% (n=9+8). También está descrito (Berbegall *et al.*, 2016) que la mitad de los casos que presentan hetMNA están asociados a la alteración 1p-, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio. Además, la alteración típica 11q- suele presentarse más frecuentemente en casos con presencia de hetMNA que con MNA (Berbegall *et al.*, 2016), lo que podría explicar por qué de los 39 casos con homMNA únicamente 8 presentan la alteración 11q-, mientras que de los 17 casos con hetMNA, se han identificado 8 con 11q- (20,5% vs 47%).

Se realizó un análisis más exhaustivo de los subgrupos mayoritarios, subgrupos b1, b2, c1, c2 y c3. En las Tablas 5, 6, 7, 8 y 9, situadas en el anexo, se agruparon los tumores según el estado del oncogén *MYCN* y la región 11q.

Se observó que aquellos casos con la delección de 11q, con o sin MNA, tendían a presentar un tamaño medio de ganancias y pérdidas mayor, así como un número mayor de SCAs totales y de SCAs típicas. El número de casos con presencia del doble golpeo (homMNA 11q-) aunque fue muy bajo en todos los subgrupos, presentaban un gran número de SCAs totales y SCAs típicas.

Los subgrupos con presencia de MNA, tanto homMNA como hetMNA, y ausencia de 11q- presentaron un mayor número de casos con 1p- en comparación con los otros subgrupos. Se observó pues, una relación de MNA con 1p-, tal y como se referencia en neuroblastoma (P. F. Ambros *et al.*, 2009; Michels *et al.*, 2007).

La combinación mayoritaria en los subgrupos b1, b2 y c3 fue noMNA 11q- con 12, 11 y 13 casos respectivamente. Mientras que en los subgrupos c1 y c2, la combinación más frecuente fue noMNA no11q- con 13 y 15 casos respectivamente.

En la Figura 4 a modo de resumen se representa el material genético alterado de los subgrupos b1, b2, c1, c2 y c3, y se destaca en **negrita** la combinación noMNA no11q- y en **rojo** la combinación noMNA 11q- para facilitar su visualización.

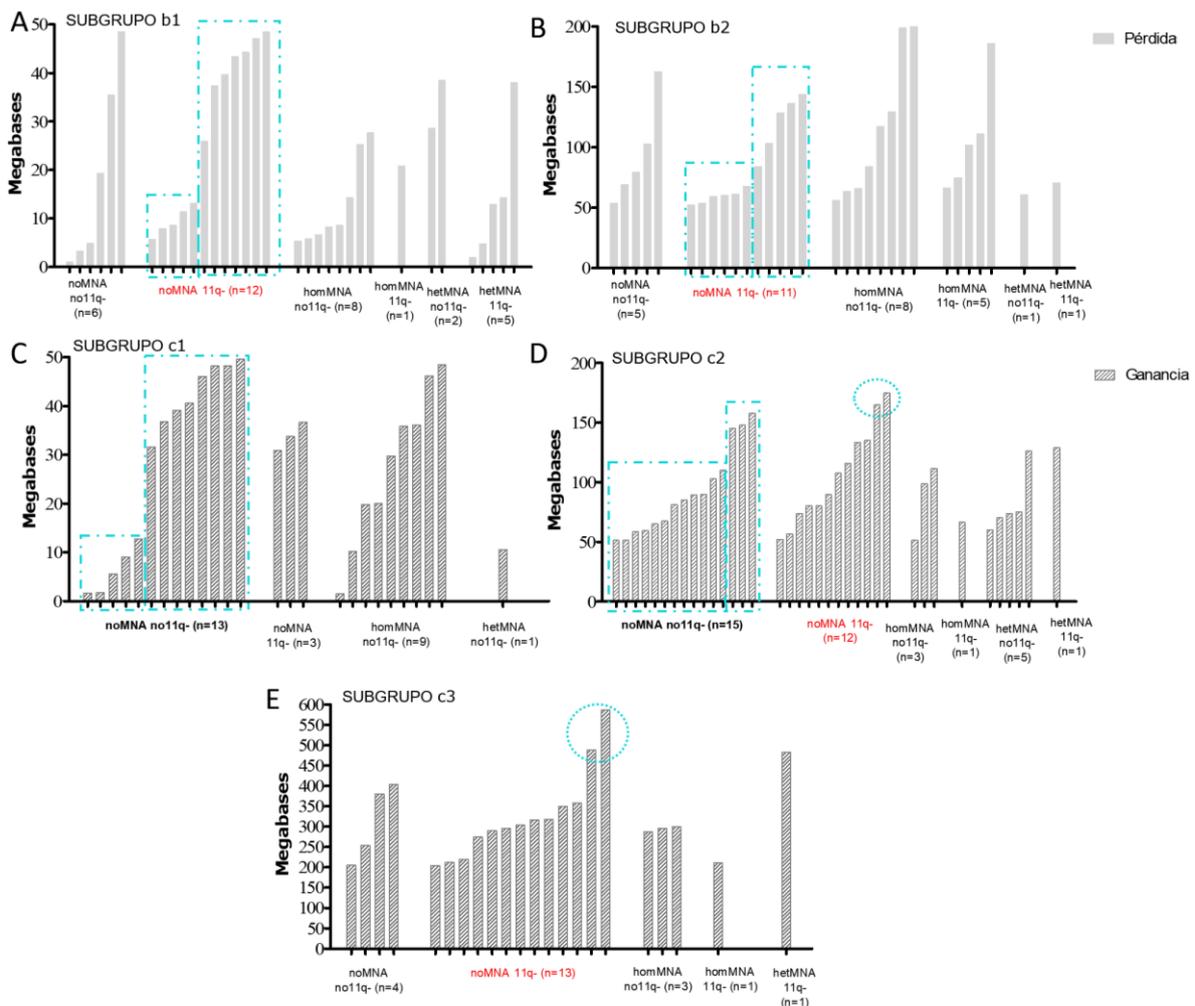


Figura 4. Representación de la cantidad (Mb) de material neto alterado según el estado de MYCN y 11q en los tumores. A) subgrupo b1, n= 34; B) subgrupo b2, n=31; C) subgrupo c1, n= 26; D) subgrupo c2, n=37; E) subgrupo c3, n=22.



Resultados y discusión

En los subgrupos b1 y b2 (Figura 4A y 4B) la cantidad de material genético perdido presentó una variabilidad alta en todas las agrupaciones en relación con el estado de MNA y 11q. Aun así, cabe mencionar que la combinación más frecuente, **noMNA 11q-**, se puede dividir en dos subtipos de tumores con baja (subgrupo b1: 5-13 Mb, n=5; subgrupo b2: 52-67 Mb, n=6) y alta cantidad neta perdida (subgrupo b1: 25-48 Mb, n=5; subgrupo b2: 83-143 Mb, n=5) (indicado en la Figura 4A y 4B con cajas con líneas discontinuas).

En los subgrupos de ganancia de kb neta baja y media (subgrupos c1 y c2) la combinación **noMNA no11q-** fue la más frecuente y también se puede dividir en dos subtipos con una ganancia baja (subgrupo c1: 1-12 Mb, n=5; subgrupo c2: 51-110 Mb, n=12) y alta cantidad neta perdida (subgrupo c1: 31-49 Mb, n=8; subgrupo c2: 145-157 Mb, n=3) (indicado en la Figura 4C y 4D con cajas con líneas discontinuas).

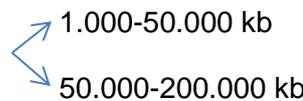
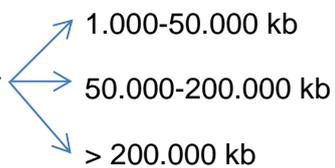
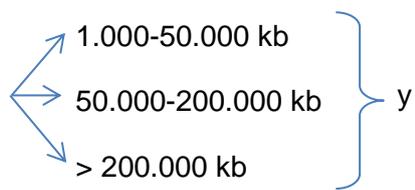
En los subgrupos con ganancia neta media y alta (subgrupos c2 y c3) los tumores **noMNA 11q-** también se pueden dividir en dos subtipos con una ganancia baja (subgrupo c2: 52-135 Mb, n=10; subgrupo c3: 204-358 Mb, n=11) y alta en la que ambos subgrupos contienen 2 tumores con valores de ganancia neta mucho más extremos que el resto de los tumores (subgrupo c2: 164 y 174 Mb; subgrupo c3: 489 y 587 Mb; indicado con círculos con líneas discontinuas).

Se concluyó que el subgrupo con **noMNA 11q-** presenta una variabilidad alta en tamaño neto perdido y esto no fue tan evidente para el tamaño neto ganado.

Tras conocer que mayor número de casos de la cohorte estudiada presentaban ganancia de material genético (85 de los 152 casos) pero que el número de casos con ganancia de ≤ 200.000 kb era similar al número de casos con pérdidas de ≤ 200.000 kb (65 vs 63), se quiso saber qué relaciones y combinaciones existían entre ganancias y pérdidas y entre SCAs totales y SCAs típicas (con especial detalle con MNA y 11q-).

4.2.2 Grupos de estado combinatorio del tamaño del material genético ganado y/o perdido

Se clasificaron los tumores en 14 subgrupos, cuyas características se detalladas se encuentran en las tablas siguientes y se describen más adelante, en función de:

- Si no había ganancia pero sí pérdida, con diferencia entre perder 
 - 1.000-50.000 kb
 - 50.000-200.000 kb
- Si había ganancia pero no pérdida, con diferencia entre ganar 
 - 1.000-50.000 kb
 - 50.000-200.000 kb
 - > 200.000 kb
- Si había ganancia y pérdida, con diferencia entre ganar 
 - 1.000-50.000 kb
 - 50.000-200.000 kb
 - > 200.000 kb } y



4.2.2.1 Asociación con el número de SCAs totales y SCAs típicas

En la Tabla 10 se recoge la media y el rango del número de SCAs y de las SCAs típicas.

Tabla 10. Clasificación del número de SCAs y SCAs típicas en función de las ganancias y/o pérdidas de material genético. Cantidad de material genético alterado de los subgrupos de ganancia y/o pérdida: 0, 0 alteraciones; 1, 1.000-50.000 kb; 2, 50.000-200.000 kb y 3, >200.000 kb. N, número de casos; SCA, alteraciones cromosómicas segmentarias; SCAs típicas, SCAs descritas frecuentemente en NB con significado pronóstico conocido. Algunos datos se destacan en negrita por su importancia que se comenta en el texto.

SUBGRUPO GANANCIA	SUBGRUPO PÉRDIDA	N (%)	% (subgrupo)	NÚMERO TOTAL SCAs		SCAs TÍPICAS	
				MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO
0	1	2 (1,3)	50	1	1	0,5	0-1
	2	2 (1,3)	50	2	2	0,5	0-2
1	0	9 (5,9)	45	1	1	0,6	0-1
2		10 (6,6)	50	1,8	1-4	1,3	0-2
3		1 (0,7)	5	4	-	2	-
1	1	8 (5,3)	38,1	2,1	1-4	0,5	0-2
	2	12 (7,9)	57,1	3,8	2-7	2	1-3
	3	1 (0,7)	4,8	6	-	3	-
2	1	4 (2,6)	6,3	4	3-6	1,5	1-2
	2	51 (33,6)	79,7	6	2-16	2,7	1-5
	3	9 (5,9)	14,1	11,8	5-18	4,3	2-6
3	1	3 (2)	7	5,7	2-9	0,7	0-1
	2	22 (14,5)	51,2	11,5	6-24	3,6	2-6
	3	18 (11,8)	41,9	11,5	5-20	4,4	3-6

La mayoría de los casos presentaron una ganancia y pérdida de material genético media (subgrupos 2-2, 51 casos, 33,6%). Le siguieron los casos con ganancia alta y pérdida media y alta (subgrupos 3-2 y 3-3, con 14,5 y 11,8% respectivamente).

La media del número de SCAs y SCAs típicas aumentó al aumentar el tamaño del material genético ganado y perdido llegando alrededor de 11 SCAs en los subgrupos 2-3, 3-2 y 3-3.

Destacar que, la media de SCAs típicas fue siempre inferior a 7 que es el número total de SCAs descritas como típicas. Los tumores no presentaban todas las alteraciones típicas,



Resultados y discusión

ya que su número medio de SCAs se encontraba alrededor de 4, y por tanto presentaban otras alteraciones segmentarias.

4.2.2.2 Asociación con las diversas SCAs típicas y MNA

En la Tabla 11, se detalla el tamaño medio de SCAs típicas en ganancia y en pérdida, y sus rangos en cada subgrupo.

Destacar que el subgrupo mayoritario (subgrupo 2-2) presentaba una media mayor de material genético perdido que ganado (77.049 vs 59.145 kb). Sin embargo, el subgrupo 3-2 (segundo subgrupo con mayor frecuencia de casos) presentaba una media de material genético perdido mucho menor que la media de material genético ganado (71.450 vs 130.713 kb). El subgrupo 3-3 (tercer subgrupo con mayor frecuencia de casos) presentaba una media de material genético perdido mayor que la media de material genético ganado (146.574 vs 118.866 kb).

En general, el tamaño medio de material genético ganado y perdido en SCAs típicas aumentó al aumentar el tamaño de material genético alterado ganado y/o perdido. Dentro del mismo subgrupo de ganancia al aumentar el material genético ganado, aumentó la ganancia de material genético de SCAs típicas en la mayor parte de los casos, a excepción del subgrupo 3-3 cuyo valor medio de ganancias típicas (118.866 Kb) fue algo inferior al del subgrupo 3-2 (130.713 Kb). Esto ocurrió de la misma manera dentro de los subgrupos de pérdida total, cuyos tamaños medios de pérdidas de material genético en SCAs típicas aumentó al aumentar la ganancia total, excepto en el subgrupo 3-2 con pérdida media de SCAs típicas menor (71.450 Kb) que el subgrupo 2-2 (77.049 Kb).

Resultó llamativo que en los subgrupos 3-1 y 3-3, con una ganancia alta, existiera un tumor (en cada subgrupo) sin material genético ganado de SCAs típicas. Lo cual implica que la mayor inestabilidad genética de esos tumores no requiere de alteraciones típicas en ganancia.

Tabla 11. Clasificación del material genético alterado de SCAs típicas en función de las ganancias y/o pérdidas de material genético. Cantidad de material genético alterado en ganancia o en pérdida: 0, 0 alteraciones; 1, 1.000-50.000 kb; 2, 50.000-200.000 kb y 3, >200.000 kb. N, número de casos; Kb, kilobases; SCA, alteraciones cromosómicas segmentarias; SCAs típicas, SCAs descritas frecuentemente en NB con significado pronóstico conocido. Algunos datos se destacan en negrita por su importancia que se comenta en el texto.

SUBGRUPO GANANCIA	SUBGRUPO PÉRDIDA	N (%)	SCAs TÍPICAS (Kb)			
			GANANCIAS		PÉRDIDAS	
			MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO
0	1	2 (1,3)	0	-	24.247	0-48.494
	2	2 (1,3)	0	-	23.302	0-46.603
1	0	9 (5,9)	24.513	0-48.821	0	-
2		10 (6,6)	68.779	0-148.025	0	-
3		1 (0,7)	173.856	-	0	-
1	1	8 (5,3)	15.167	0-45.699	1.415	0-11.316
	2	12 (7,9)	38.294	0-72.507	60.889	0-129.996
	3	1 (0,7)	41.376	-	92.792	-
2	1	4 (2,6)	16.628	0-42.534	29.585	0-44.684
	2	51 (33,6)	59.145	0-125.263	77.049	0-185.836
	3	9 (5,9)	72.515	40.084-100.104	134.785	31.527-189.229
3	1	3 (2)	41.548	0-99.285	0	-
	2	22 (14,5)	130.713	34.856-292.407	71.450	0-153.106
	3	18 (11,8)	118.866	0-338.699	146.574	57.524-295.700

En la Tabla 12 se recoge la presencia de las distintas SCAs típicas y MNA en cada subgrupo, y sus frecuencias en relación con la presencia total de dichas alteraciones.

Se observó que la mayoría de casos con **delección de 1p** (50%) se encontraban en el subgrupo 2-2. En los subgrupos 3-2 y 3-3 la delección 1p- no aumentó de forma destacable su frecuencia frente al grupo 1 y el resto de subgrupos 2, la cual es notable, indicando que 1p- está menos asociado a predominio de ganancia de material genético derivado de SCAs típicas que otras alteraciones típicas, como describiremos a continuación. Sin embargo, la **ganancia de 2p** si se encuentra con una frecuencia alta y similar en los subgrupos mencionados, aunque es más alta otra vez en el subgrupo 2-3 (39,3%).

Contrariamente, para la **ganancia de 1q**, se observaron 30 casos (19,7%) y la mayoría se encontraban en los subgrupos 2-3 (33,3%) y 3-3 (30%).

Los subgrupos con mayor número de **3p-** fueron nuevamente los que más casos contenían (subgrupos 2-2, 3-2 y 3-3, con 26,3%, 18,4% y 34,2% respectivamente) además del subgrupo 2-3 (18,4%).

La **delección de 4p** fue la SCA típica menos frecuente (18 casos, 11,8%) destacando su frecuencia en el subgrupo 2-2 (38,9%).

La **delección de 11q** se encontró en el subgrupo 2-2 con una frecuencia de 29,4% y no así, en el subgrupo 2-3 con frecuencia de 10,3%.

La **ganancia de 17q** fue muy frecuente, estando presente en 118 de los 152 casos analizados y se distribuía mayoritariamente en los grupos 2-2 y 3-2 (34,7% y 17,8%).

La mayor parte de los subgrupos, exceptuando el 0-1, contenían algún caso con **MNA**, si bien fue destacable que en el grupo 2-2 se encontraba el 51,8% de los casos.



Resultados y discusión

El subgrupo 2-2 (subgrupo que presentaba mayor tamaño medio de pérdidas que de ganancias) presentó la frecuencia más alta de las alteraciones típicas 1p-, +2p, 4p-, 11q- y +17q, mientras que en los subgrupos 3-2 y 3-3 se observaron las frecuencias mayores de +1q y 3p- respectivamente.

El subgrupo que presentaba mayor número de casos con MNA fue el 2-2.

Tabla 12. Clasificación de SCAs típicas en función de las ganancias y/o pérdidas de material genético. Cantidad de material genético alterado en ganancia o en pérdida: 0, 0 alteraciones; 1, 1.000-50.000 kb; 2, 50.000-200.000 kb y 3, >200.000 kb. N, número de casos; SCA, alteraciones cromosómicas segmentarias. Algunos datos se destacan en negrita por su importancia que se comenta en el texto.

SUBGRUPO GANANCIA	SUBGRUPO PÉRDIDA	N (%)	SCAs TÍPICAS						MNA (%)	
			N 1p- (%)	N +1q (%)	N +2p (%)	N 3p- (%)	N 4p- (%)	N 11q- (%)		N +17q (%)
TOTAL		152	64 (42,1)	30 (19,7)	56 (36,8)	38 (25)	18 (11,8)	68 (44,7)	118 (77,6)	56 (36,8)
0	1	2 (1,3)	0	0	0	0	1 (5,6)	0	0	0
	2	2 (1,3)	1 (1,6)	0	0	0	0	0	0	1 (1,8)
1	0	9 (5,9)	0	1 (3,3)	0	0	0	0	4 (3,4)	1 (1,8)
2		10 (6,6)	0	4 (13,3)	1 (1,8)	0	0	0	8 (6,8)	2 (3,6)
3		1 (0,7)	0	1 (3,3)	1 (1,8)	0	0	0	0	1 (1,8)
1	1	8 (5,3)	0	0	0	0	1 (5,6)	0	3 (2,5)	2 (3,6)
	2	12 (7,9)	6 (9,4)	0	1 (1,8)	1 (2,6)	0	5 (7,3)	11 (9,3)	6 (10,7)
	3	1 (0,7)	1 (1,6)	0	0	0	0	1 (1,5)	1 (0,8)	1 (1,8)
2	1	4 (2,6)	3 (4,7)	1 (3,3)	0	0	0	0	2 (1,7)	2 (3,6)
	2	51 (33,6)	32 (50)	3 (10)	22 (39,3)	10 (26,3)	7 (38,9)	20 (29,4)	41 (34,7)	29 (51,8)
	3	9 (5,9)	8 (12,5)	0	6 (10,7)	7 (18,4)	2 (11,1)	7 (10,3)	9 (7,6)	3 (5,4)
3	1	3 (2)	0	1 (3,3)	0	0	0	0	1 (0,8)	1 (1,8)
	2	22 (14,5)	4 (6,3)	10 (33,3)	16 (28,6)	7 (18,4)	2 (11,1)	18 (26,5)	21 (17,8)	4 (7,1)
	3	18 (11,8)	9 (14,1)	9 (30)	9 (16,1)	13 (34,2)	5 (27,8)	17 (25)	17 (14,4)	3 (5,4)

4.2.2.3 Asociación MNA y 11q-

En la Tabla 13 se muestran los resultados de los subgrupos de material genético ganado y/o perdido en función de la presencia/ausencia de MNA y 11q-. Para estudiar mejor su distribución se distinguieron dentro de los tumores MNA los que eran homMNA y los que eran hetMNA.

Tabla 13. Combinación de MNA y 11q- en función de las ganancias y/o pérdidas de material genético. Cantidad de material genético alterado en ganancia o en pérdida: 0, 0 alteraciones; 1, 1.000-50.000 kb; 2, 50.000-200.000 kb y 3, >200.000 kb. N, número de casos; MNA, amplificación del gen *MYCN*; homMNA, MNA homogénea; hetMNA, MNA heterogénea. Algunos datos se destacan en negrita por su importancia que se comenta en el texto.

SUBGRUPO GANANCIA	SUBGRUPO PÉRDIDA	N (%)	noMNA		homMNA		hetMNA	
			N no11q- (%)	N 11q- (%)	N no11q- (%)	N 11q- (%)	N no11q- (%)	N 11q- (%)
TOTAL		152	44 (28,9)	52 (34,2)	31 (20,4)	8 (5,3)	9 (5,9)	8 (5,3)
0	1	2 (1,3)	2 (4,5)	0	0	0	0	0
	2	2 (1,3)	1 (2,3)	0	1 (3,2)	0	0	0
1	0	9 (5,9)	8 (18,2)	0	1 (3,2)	0	0	0
2		10 (6,6)	8 (18,2)	0	0	0	2 (22,5)	0
3		1 (0,7)	0	0	1 (3,2)	0	0	0
1	1	8 (5,3)	6 (13,6)	0	1 (3,2)	0	1 (11,1)	0
	2	12 (7,9)	2 (4,5)	4 (7,7)	4 (12,9)	0	1 (11,1)	1 (12,5)
	3	1 (0,7)	0	0	0	1 (12,5)	0	0
2	1	4 (2,6)	2 (4,5)	0	1 (3,2)	0	1 (11,1)	0
	2	51 (33,6)	9 (20,5)	13 (25)	18 (58,1)	4 (50)	4 (44,4)	3 (37,5)
	3	9 (5,9)	0	6 (11,5)	2 (6,5)	1 (12,5)	0	0
3	1	3 (2)	2 (4,5)	0	1 (3,2)	0	0	0
	2	22 (14,5)	3 (6,8)	15 (28,8)	1 (3,2)	1 (12,5)	0	2 (25)
	3	18 (11,8)	1 (2,3)	14 (26,9)	0	1 (12,5)	0	2 (25)

El subgrupo 2-2, fue el más representado de las combinaciones noMNA no11q- (20,5%), y de homMNA no11q- (58,1%), con 9 y 18 casos respectivamente. El subgrupo 3-2 presentó mayor número de casos noMNA 11q-.

Únicamente se observaron 8 casos con el doble golpeo, homMNA 11q-, y se distribuía mayoritariamente en el subgrupo 2-2 (50%). Los casos con hetMNA 11q- y hetMNA no11q- también se situaban principalmente en el subgrupo 2-2 (4 casos, 44,4 % y 3 casos, 37,5% respectivamente).

La combinación mayoritaria en el subgrupo 2-2 fue homMNA no11q- con 18 casos de los 51 incluidos en este grupo y en segundo lugar el subgrupo noMNA 11q- con 13 casos. Mientras que en el subgrupo 3-2 y el 3-3, la combinación mayoritaria fue noMNA 11q- con 15/22 y 14/18 casos respectivamente.

Se realizó un análisis más exhaustivo de los subgrupos mayoritarios, subgrupos 2-2, 3-2, y 3-3, que se recogieron en las Tablas 14, 15 y 16 situadas en el anexo en las que se agruparon los tumores según el estado del gen *MYCN* y la región 11q.

En cuanto a la relación de 1p- con las distintas combinaciones de presencia de MNA y 11q-, se observó que en el grupo 2-2 había muchos casos con 1p- y que se encontraban la mayoría en el grupo homMNA no11q- ya que la alteración 1p- se encontraba en todos los casos con esta combinación (18). Sin embargo, en los grupos 3-2 y 3-3 no existían muchos casos con 1p-.



4.3 ANÁLISIS DE LAS NCAs SEGÚN EL NÚMERO DE KILOBASES

Del total de 195 NBs primarios se identificaron 43 casos con alteraciones cromosómicas numéricas (NCAs). Como se ha explicado en la introducción, el perfil NCA se presenta muy frecuentemente en tumores de pacientes con unas características clínicas y pronósticas más favorables a las de pacientes con tumores SCA. El estudio de estos perfiles de arrays de SNP se hizo de forma separada a los perfiles SCA.

En estos tumores se anotaron los cromosomas afectados y el total de cromosomas con NCAs en cada caso. Posteriormente se analizaron las combinaciones de cromosomas con NCAs más frecuentes. Por último, se calculó el tamaño, kb, de las posibles combinaciones de NCAs (Tablas 17 y 18).

La desviación de los cromosomas alterados en pérdida o en ganancia no fue muy considerable, por lo que se deduce que estas alteraciones no se presentaron en clones mayoritarios, sino que eran subclonales. Además, cabe destacar que, con la plataforma de Affymetrix (GeneChip HumanMapping) se observó una mayor desviación de los cromosomas afectados de NCA con respecto a los cromosomas sin alteración NCA, con respecto al resto de plataformas de arrays de SNP utilizadas, lo cual facilitó la anotación de las NCAs. El rango del número de NCAs por tumor fue muy variable, desde 1 (en 4 tumores) hasta 15 NCAs (en 1 tumores).

A modo de resumen gráfico se representó el número de NCAs presente en cada caso y los cromosomas en los que se encuentran las alteraciones en la Figura 5. Se dividieron los tumores en grupos según el número de NCAs en cada grupo: Bajo: de 1 a 7; Medio: de 8 a 12; Alto: de 13 a 15. La gran mayoría de casos presentaron entre 4 y 12 NCAs (25, 58,1%) mientras que 11 casos presentaron de 1 a 3 NCAs (25,6%) y tan sólo 7 casos de 13 a 15 NCAs (16,3%). Como se observa en rojo en la Figura 6, únicamente se identificaron 13 NCAs en pérdida, siendo las ganancias la alteración más frecuente, en azul. Esto se explica debido a que está descrito que las monosomías son poco frecuentes en NB (I. M. Ambros *et al.*, 2014)

El cromosoma que en más casos se encontró alterado, fue cromosoma 2 ganado en 22 de los 43 casos (51,2%). Le siguieron en frecuencia, los cromosomas 6, 7, 13 y 18 alterados en 21 casos cada uno (48,8%), siempre en ganancia. Los cromosomas 1, 5, 17 y 20 se encontraron alterados en 20 casos (46,5%), 19 (44,2%); 17 (39,5%) y 20 casos (46,5%) respectivamente.

Por otra parte, los cromosomas que menos veces se han encontrado alterados en los casos analizados son los cromosomas 19 (únicamente alterado en 6 casos) y el 10 (alterado en 7 casos), como se puede ver en la Figura 6.

Las combinaciones de cromosomas con NCAs más frecuentes fueron las de los cromosomas 1-2 y los cromosomas 2-18, cada una en 16 de los 43 (37,2%) casos estudiados. La combinación de cromosomas 2-7 también se detectó en muchos de los casos (15, 34,9%). Por último, las combinaciones de cromosomas 1-18 y los cromosomas 2-5 se detectaron cada una en 14 casos (32,6%).

En cuanto a la información el tamaño en kb de material alterado en NCA, se observó una gran diversidad en el tamaño de las combinaciones que se han anotado en las Tablas 17 y 18 (incluidas en el apartado de Anexos), debida a las diferencias de tamaños entre los cromosomas. La combinación con mayor tamaño observada entre los casos analizados en este estudio es la de los cromosomas 1-2-5-6 (9 casos), en la que se produce una ganancia de 844.490 kb. La segunda combinación más grande es la de los cromosomas 2-5-7-12 (9 casos) con una ganancia de 717.110 kb y luego la combinación de cromosomas 2-7-12-17 posee un tamaño de 617.390 kb. Las combinaciones de cromosomas 2-5-7 (11 casos) y 2-7-12 (9 casos) dan lugar a ganancias numéricas de 583.260 y 536.190 respectivamente.

El cromosoma 7 se encuentra en trisomía en muchos NBs, por lo que es lógico que sea uno de los cromosomas que en más casos se encuentra alterado (21) y por tanto, se

encuentre entre las combinaciones más frecuentes (Berbegall *et al.*, 2014). El hecho de que el cromosoma 17 se encuentre alterado en 17 de los 43 casos (39,5%) concuerda con lo ya descrito por otros autores (Bown, 2001; Pezzolo *et al.*, 2009).

Fue notable que el cromosoma 2 se encontrará frecuentemente alterado entre estos casos con perfil genético NCAs (22 casos, 51,2%). Además, en casi todas las combinaciones destacadas por su frecuencia o por el tamaño, el cromosoma 2 estaba involucrado. Es bastante lógico que aquellas combinaciones que contengan los cromosomas de mayor tamaño (1 y 2), sean las de mayor tamaño ganado en kb.

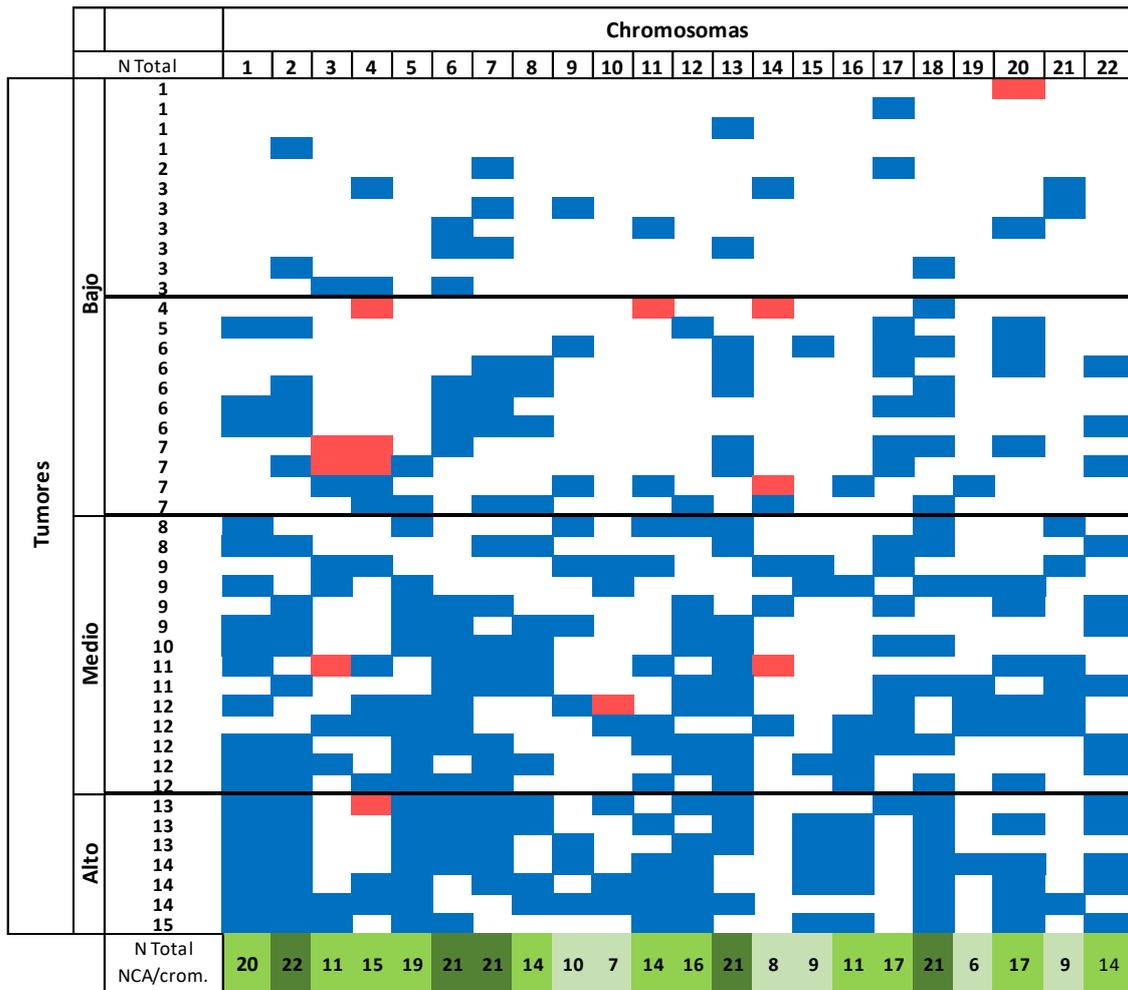


Figura 5. Representación esquemática de los perfiles de NCA en los 43 NBs analizados. En vertical los tumores aparecen ordenados según el número total de NCA, de más a menos en tres grupos (Bajo, Medio y Alto). En horizontal los cromosomas, del 1 al 22. En azul se representan las ganancias, en rojo las pérdidas y en gradación creciente de color verde el número total de casos en el que se ha hallado una alteración en cada cromosoma. N total, suma total de tumores con alteraciones para cada cromosoma; NCA, alteración cromosómica numérica; crom., cromosoma.



5. CONCLUSIONES

Tras el estudio de la cantidad de kilobases ganadas y/o perdidas como resultado de las variaciones del número de copias cromosómicas en los tumores neuroblásticos detectadas por arrays de SNPs para poder utilizarlo como nuevo biomarcador genético, aunque es necesario ampliar el presente estudio en una cohorte mayor de tumores neuroblásticos, asociando los factores pronósticos conocidos (Cohn *et al.*, 2009) y validarlo con cohortes de otros grupos de investigación, destacamos que:

1. En base al cómputo de material genético neto encontramos una mayor representación de los casos con ganancia que con pérdida. La situación más frecuente es la ganancia neta de 50.000 a 200.000 kb. Los tumores con mayor ganancia neta también son los que presentan mayor número de SCAs totales, aunque con pequeña diferencia respecto al número de SCAs típicas presentes.
2. La mayoría de casos con MNA aunque, se encuentran mayoritariamente por la clasificación inicial utilizada en el grupo de pérdida neta, presentan ganancia y pérdida de material genético similar (50.000-200.000 kb), situándose en el subgrupo 2-2 el 51,8% de los tumores.
3. Respecto a la asociación de MNA y 11q- los subgrupos con ganancia neta baja y media (1.000-200.000 kb) mayoritariamente presentan la combinación noMNA no11q-. Los casos con ganancia neta alta (>200.000 kb) y pérdida baja y media (1.000-200.000 kb) presentan mayoritariamente noMNA 11q-. Destacar que los tumores con el doble golpeo homMNA 11q- se presentan mayoritariamente en casos con pérdida neta mayor, mientras que la mayoría de casos con hetMNA se encuentran en casos con material genético neto ganado mayor.
4. Con la clasificación de perfil SCA según ganancias y pérdidas también se observa que, dentro de un mismo grupo de ganancia, al aumentar el tamaño de las pérdidas aumentaba la ganancia de SCAs típicas y viceversa.
5. De las SCAs típicas destaca que la alteración 1p- se presenta en mayor frecuencia en casos con ganancia y pérdida medias (50.000-200.000 kb), es decir, en el subgrupo 2-2 y que la frecuencia de los casos con 4p- es más baja que las de las otras SCAs típicas, encontrándose la mayoría de los casos con un número similar de pérdidas y ganancias.
6. La mayoría de casos presentan un número bajo o medio de NCAs y mayoritariamente son ganancias. Confirmamos que el cromosoma 17 se gana frecuentemente, tanto en alteraciones segmentarias como en numéricas.
7. De los tumores con perfil NCA, el cromosoma que más veces está alterado es el 2, que se encuentra ganado y, por tanto, es el que más se combina con otros cromosomas dando lugar a ganancias mayores totales de material genético, debido a su gran tamaño.

6. REFERENCIAS

- AMBROS, I. M.; BRUNNER, B.; AIGNER, G.; BEDWELL, C.; BEISKE, K.; BENARD, J.; BOWN, N.; COMBARET, V.; COUTURIER, J.; DEFFERRARI, R.; GROSS, N.; JEISON, M.; LUNEC, J.; MARQUES, B.; MARTINSSON, T.; MAZZOCCO, K.; NOGUERA, R.; SCHLEIERMACHER, G.; SPELEMAN, F.; STALLINGS, R.; TONINI, G. P.; TWEDDLE, D. A.; VALENT, A.; VICHA, A.; ROY, N. V.; VILLAMON, E.; ZIEGLER, A.; PREUNER, S.; DROBICS, M.; LADENSTEIN, R.; AMANN, G.; SCHUIT, R. J.; POTSCGER, U. & AMBROS, P. F. (2011). A multilocus technique for risk evaluation of patients with neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 17(4), 792-804.
- AMBROS, I. M.; BRUNNER, C.; ABBASI, R.; FRECH, C. & AMBROS, P. F. (2014). Ultra-High Density SNParray in Neuroblastoma Molecular Diagnostics. *Front Oncol*, 4, 202.
- AMBROS, P. F.; AMBROS, I. M.; BRODEUR, G. M.; HABER, M.; KHAN, J.; NAKAGAWARA, A.; SCHLEIERMACHER, G.; SPELEMAN, F.; SPITZ, R.; LONDON, W. B.; COHN, S. L.; PEARSON, A. D. & MARIS, J. M. (2009). International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer*, 100(9), 1471-1482.
- ATTIYEH, E. F.; LONDON, W. B.; MOSSE, Y. P.; WANG, Q.; WINTER, C.; KHAZI, D.; MCGRADY, P. W.; SEEGER, R. C.; LOOK, A. T.; SHIMADA, H.; BRODEUR, G. M.; COHN, S. L.; MATTHAY, K. K.; MARIS, J. M. & CHILDREN'S ONCOLOGY, G. (2005). Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med*, 353(21), 2243-2253.
- BECKERS, A.; VAN PEER, G.; CARTER, D. R.; METS, E.; ALTHOFF, K.; CHEUNG, B. B.; SCHULTE, J. H.; MESTDAGH, P.; VANDESOMPELE, J.; MARSHALL, G. M.; DE PRETER, K. & SPELEMAN, F. (2015). MYCN-targeting miRNAs are predominantly downregulated during MYCN-driven neuroblastoma tumor formation. *Oncotarget*, 6(7), 5204-5216.
- BERBEGALL, A. P.; BOGEN, D.; POTSCGER, U.; BEISKE, K.; BOWN, N.; COMBARET, V.; DEFFERRARI, R.; JEISON, M.; MAZZOCCO, K.; VAREGIO, L.; VICHA, A.; ASH, S.; CASTEL, V.; COZE, C.; LADENSTEIN, R.; OWENS, C.; PAPADAKIS, V.; RUUD, E.; AMANN, G.; SEMENTA, A. R.; NAVARRO, S.; AMBROS, P. F.; NOGUERA, R. & AMBROS, I. M. (2018). Heterogeneous MYCN amplification in neuroblastoma: a SIOP Europe Neuroblastoma Study. *Br J Cancer*.
- BERBEGALL, A. P.; VILLAMON, E.; PIQUERAS, M.; TADEO, I.; DJOS, A.; AMBROS, P. F.; MARTINSSON, T.; AMBROS, I. M.; CANETE, A.; CASTEL, V.; NAVARRO, S. & NOGUERA, R. (2016). Comparative genetic study of intratumoral heterogenous MYCN amplified neuroblastoma versus aggressive genetic profile neuroblastic tumors. *Oncogene*, 35(11), 1423-1432.
- BERBEGALL, A. P.; VILLAMON, E.; TADEO, I.; MARTINSSON, T.; CANETE, A.; CASTEL, V.; NAVARRO, S. & NOGUERA, R. (2014). Neuroblastoma after childhood: prognostic relevance of segmental chromosome aberrations, ATRX protein status, and immune cell infiltration. *Neoplasia*, 16(6), 471-480.
- BOWN, N. (2001). Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol*, 54(12), 897-910.
- BRODEUR, G. M. (2003). Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*, 3(3), 203-216.
- BRODEUR, G. M.; SEEGER, R. C.; BARRETT, A.; BERTHOLD, F.; CASTLEBERRY, R. P.; D'ANGIO, G.; DE BERNARDI, B.; EVANS, A. E.; FAVROT, M.; FREEMAN, A. I. & ET AL. (1988). International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 6(12), 1874-1881.
- CAREN, H.; KRYH, H.; NETHANDER, M.; SJOBERG, R. M.; TRAGER, C.; NILSSON, S.; ABRAHAMSSON, J.; KOGNER, P. & MARTINSSON, T. (2010). High-risk neuroblastoma



Referencias

- tumors with 11q-deletion display a poor prognostic, chromosome instability phenotype with later onset. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(9), 4323-4328.
- COHN, S. L.; PEARSON, A. D.; LONDON, W. B.; MONCLAIR, T.; AMBROS, P. F.; BRODEUR, G. M.; FALDUM, A.; HERO, B.; IEHARA, T.; MACHIN, D.; MOSSERI, V.; SIMON, T.; GARAVENTA, A.; CASTEL, V.; MATTHAY, K. K. & FORCE, I. T. (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*, 27(2), 289-297.
- CHEUNG, N. K. & DYER, M. A. (2013). Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 13(6), 397-411.
- CHEUNG, N. K.; ZHANG, J.; LU, C.; PARKER, M.; BAHRAMI, A.; TICKOO, S. K.; HEGUY, A.; PAPPO, A. S.; FEDERICO, S.; DALTON, J.; CHEUNG, I. Y.; DING, L.; FULTON, R.; WANG, J.; CHEN, X.; BECKSFORT, J.; WU, J.; BILLUPS, C. A.; ELLISON, D.; MARDIS, E. R.; WILSON, R. K.; DOWNING, J. R.; DYER, M. A. & ST JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL-WASHINGTON UNIVERSITY PEDIATRIC CANCER GENOME, P. (2012). Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *JAMA*, 307(10), 1062-1071.
- FRANSSON, S.; HANSSON, M.; RUUTH, K.; DJOS, A.; BERBEGALL, A.; JAVANMARDI, N.; ABRAHAMSSON, J.; PALMER, R. H.; NOGUERA, R.; HALLBERG, B.; KOGNER, P. & MARTINSSON, T. (2015). Intragenic anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearrangements: translocations as a novel mechanism of ALK activation in neuroblastoma tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 54(2), 99-109.
- GUIMIER, A.; FERRAND, S.; PIERRON, G.; COUTURIER, J.; JANOUEIX-LEROSEY, I.; COMBARET, V.; MOSSERI, V.; THEBAUD, E.; GAMBART, M.; PLANTAZ, D.; MARABELLE, A.; COZE, C.; RIALLAND, X.; FASOLA, S.; LAPOUBLE, E.; FRENEAUX, P.; PEUCHMAUR, M.; MICHON, J.; DELATTRE, O. & SCHLEIERMACHER, G. (2014). Clinical characteristics and outcome of patients with neuroblastoma presenting genomic amplification of loci other than MYCN. *PLoS One*, 9(7), e101990.
- JANOUEIX-LEROSEY, I.; SCHLEIERMACHER, G.; MICHELS, E.; MOSSERI, V.; RIBEIRO, A.; LEQUIN, D.; VERMEULEN, J.; COUTURIER, J.; PEUCHMAUR, M.; VALENT, A.; PLANTAZ, D.; RUBIE, H.; VALTEAU-COUANET, D.; THOMAS, C.; COMBARET, V.; ROUSSEAU, R.; EGGERT, A.; MICHON, J.; SPELEMAN, F. & DELATTRE, O. (2009). Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 27(7), 1026-1033.
- KENNEDY, G. C.; MATSUZAKI, H.; DONG, S.; LIU, W. M.; HUANG, J.; LIU, G.; SU, X.; CAO, M.; CHEN, W.; ZHANG, J.; LIU, W.; YANG, G.; DI, X.; RYDER, T.; HE, Z.; SURTI, U.; PHILLIPS, M. S.; BOYCE-JACINO, M. T.; FODOR, S. P. & JONES, K. W. (2003). Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol*, 21(10), 1233-1237.
- LAFRAMBOISE, T. (2009). Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res*, 37(13), 4181-4193.
- MARIS, J. M. (2010). Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med*, 362(23), 2202-2211.
- MICHELS, E.; VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; HOEBEECK, J.; VERMEULEN, J.; SCHRAMM, A.; MOLENAAR, J. J.; MENTEN, B.; MARQUES, B.; STALLINGS, R. L.; COMBARET, V.; DEVALCK, C.; DE PAEPE, A.; VERSTEEG, R.; EGGERT, A.; LAUREYS, G.; VAN ROY, N. & SPELEMAN, F. (2007). ArrayCGH-based classification of neuroblastoma into genomic subgroups. *Genes Chromosomes Cancer*, 46(12), 1098-1108.
- MOSSE, Y. P.; DISKIN, S. J.; WASSERMAN, N.; RINALDI, K.; ATTIYEH, E. F.; COLE, K.; JAGANNATHAN, J.; BHAMBHANI, K.; WINTER, C. & MARIS, J. M. (2007). Neuroblastomas have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional gene expression. *Genes Chromosomes Cancer*, 46(10), 936-949.
- MOSSE, Y. P.; LAUDENSLAGER, M.; LONGO, L.; COLE, K. A.; WOOD, A.; ATTIYEH, E. F.; LAQUAGLIA, M. J.; SENNETT, R.; LYNCH, J. E.; PERRI, P.; LAUREYS, G.; SPELEMAN, F.; KIM, C.; HOU, C.; HAKONARSON, H.; TORKAMANI, A.; SCHORK, N. J.; BRODEUR, G. M.; TONINI, G. P.; RAPPAPORT, E.; DEVOTO, M. & MARIS, J. M. (2008). Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*, 455(7215), 930-935.

- OWENS, C. & IRWIN, M. (2012). Neuroblastoma: the impact of biology and cooperation leading to personalized treatments. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 49(3), 85-115.
- PARK, J. R.; EGGERT, A. & CARON, H. (2008). Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Pediatr Clin North Am*, 55(1), 97-120, x.
- PEZZOLO, A.; ROSSI, E.; GIMELLI, S.; PARODI, F.; NEGRI, F.; CONTE, M.; PISTORIO, A.; SEMENTA, A.; PISTOIA, V.; ZUFFARDI, O. & GAMBINI, C. (2009). Presence of 1q gain and absence of 7p gain are new predictors of local or metastatic relapse in localized resectable neuroblastoma. *Neuro Oncol*, 11(2), 192-200.
- SCHLEIERMACHER, G.; JANOUÉIX-LEROSEY, I.; RIBEIRO, A.; KLIJANIENKO, J.; COUTURIER, J.; PIERRON, G.; MOSSERI, V.; VALENT, A.; AUGER, N.; PLANTAZ, D.; RUBIE, H.; VALTEAU-COUANET, D.; BOURDEAUT, F.; COMBARET, V.; BERGERON, C.; MICHON, J. & DELATTRE, O. (2010). Accumulation of segmental alterations determines progression in neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 28(19), 3122-3130.
- SCHLEIERMACHER, G.; MICHON, J.; HUON, I.; D'ENGLISH, C. D.; KLIJANIENKO, J.; BRISSE, H.; RIBEIRO, A.; MOSSERI, V.; RUBIE, H.; MUNZER, C.; THOMAS, C.; VALTEAU-COUANET, D.; AUVRIGNON, A.; PLANTAZ, D.; DELATTRE, O.; COUTURIER, J. & SOCIÉTÉ FRANÇAISE DES CANCERS DE, L. E. (2007). Chromosomal CGH identifies patients with a higher risk of relapse in neuroblastoma without MYCN amplification. *Br J Cancer*, 97(2), 238-246.
- SCHLEIERMACHER, G.; MOSSERI, V.; LONDON, W. B.; MARIS, J. M.; BRODEUR, G. M.; ATTIYEH, E.; HABER, M.; KHAN, J.; NAKAGAWARA, A.; SPELEMAN, F.; NOGUERA, R.; TONINI, G. P.; FISCHER, M.; AMBROS, I.; MONCLAIR, T.; MATTHAY, K. K.; AMBROS, P.; COHN, S. L. & PEARSON, A. D. (2012). Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project. *Br J Cancer*, 107(8), 1418-1422.
- SPEICHER, M. R. & CARTER, N. P. (2005). The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet*, 6(10), 782-792.
- 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.; BRICHARD, B.; VAN DEN BROECKE, C.; DE BIE, S.; DE PAEPE, A.; LAUREYS, G. & SPELEMAN, F. (2005). Unequivocal delineation of clinicogenetic subgroups and development of a new model for improved outcome prediction in neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 23(10), 2280-2299.
- VILLAMON, E.; BERBEGALL, A. P.; PIQUERAS, M.; TADEO, I.; CASTEL, V.; DJOS, A.; MARTINSSON, T.; NAVARRO, S. & NOGUERA, R. (2013). Genetic instability and intratumoral heterogeneity in neuroblastoma with MYCN amplification plus 11q deletion. *PLoS One*, 8(1), e53740.
- WEINSTEIN, J. L.; KATZENSTEIN, H. M. & COHN, S. L. (2003). Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Oncologist*, 8(3), 278-292.
- YAMAMOTO, G.; NANNYA, Y.; KATO, M.; SANADA, M.; LEVINE, R. L.; KAWAMATA, N.; HANGAISHI, A.; KUROKAWA, M.; CHIBA, S.; GILLILAND, D. G.; KOEFFLER, H. P. & OGAWA, S. (2007). Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *Am J Hum Genet*, 81(1), 114-126.
- ZHAO, X.; LI, C.; PAEZ, J. G.; CHIN, K.; JANNE, P. A.; CHEN, T. H.; GIRARD, L.; MINNA, J.; CHRISTIANI, D.; LEO, C.; GRAY, J. W.; SELLERS, W. R. & MEYERSON, M. (2004). An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res*, 64(9), 3060-3071.

7. ANEXOS

GRUPOS DE INESTABILIDAD	COMBINACIÓN	N (%)	N +1q	N 1p-	INESTABILIDAD TOTAL (Kb)				GANANCIAS SCAs (Kb)		PÉRDIDAS SCAs (Kb)		GANANCIAS SCAs TÍPICAS (Kb)		PÉRDIDAS SCAs TÍPICAS (Kb)		NÚMERO SCAs			NÚMERO SCAs TÍPICAS	
					MEDIA GANANCIA	RANGO GANANCIA	MEDIA PÉRDIDA	RANGO PÉRDIDA	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	MEDIANA	RANGO	MEDIA	RANGO
b1	noMNA no11q-	6 (17,6)	0	1	-	-	18.724	1.048-48.494	18.413	0-90.067	37.137	11.137-91.115	15.011	0-90.067	18.403	0-61.922	2,2	2	1-5	0,7	0-3
	noMNA 11q-	12 (35,3)	5	3	-	-	27.713	5.672-48.434	142.216	44.261-294.072	169.928	57.524-299.744	82.192	39.737-134.310	94.548	44.464-151.913	7,5	8	2-12	3,7	2-6
	homMNA no11q-	8 (23,5)	0	8	-	-	12.713	5.319-27.652	82.032	42.424-141.955	94.746	50.983-141.955	47.860	0-79.416	75.898	41.081-133.894	4,5	4,5	2-7	2,4	1-3
	homMNA 11q-	1 (2,9)	0	1	-	-	20.822	-	99.482	-	120.304	-	56.055	-	114.259	-	5	-	-	3	-
	hetMNA no11q-	2 (5,9)	0	1	-	-	33.521	28.551-38.491	12.971	1.367-24.576	46.492	29.918-63.067	36.254	0-72.507	31.523	0-63.045	5,5	5,5	4-7	1,5	0-3
	hetMNA 11q-	5 (14,7)	0	2	-	-	14.370	1.974-37.983	144.428	26.789-316.476	158.798	64.772-329.363	43.606	0-134.834	91.202	51.456-174.077	7,6	4	3-16	2,6	3-16

Tabla 5. Subclasificación subgrupo b1 de inestabilidad. MNA, amplificación del gen *MYCN*; homMNA, MNA homogénea; hetMNA, MNA heterogénea; N, número de casos; Kb, kilobases; SCA, alteraciones cromosómicas segmentarias; SCAs típicas, SCAs descritas frecuentemente en NB con significado pronóstico conocido.

GRUPO DE INESTABILIDAD	COMBINACIÓN	N (%)	N +1q	N 1p-	INESTABILIDAD TOTAL (Kb)				GANANCIAS SCAs (Kb)		PÉRDIDAS SCAs (Kb)		GANANCIAS SCAs TÍPICAS (Kb)		PÉRDIDAS SCAs TÍPICAS (Kb)		NÚMERO SCAs			NÚMERO SCAs TÍPICAS	
					MEDIA GANANCIA	RANGO GANANCIA	MEDIA PÉRDIDA	RANGO PÉRDIDA	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	MEDIANA	RANGO	MEDIA	RANGO
b2	noMNA no11q-	5 (16,1)	0	4	-	-	93.440	53.731-162.618	33.215	0-63.209	126.655	77.760-162.618	31.456	0-63.209	27.012	0-87.800	2,8	2	2-5	1	0-2
	noMNA 11q-	11 (35,5)	0	2	-	-	86.323	52.055-143.883	133.795	36.395-253.217	220.119	129.996-323.731	47.586	0-88.350	142.377	63.383-250.684	10,1	11	4-18	3,6	2-5
	homMNA no11q-	8 (25,8)	0	3	-	-	114.287	56.067-199.786	64.141	0-138.572	178.428	84.031-337.314	53.783	0-123-568	85.290	31.527-185.836	4,3	4	2-8	2,3	1-3
	homMNA 11q-	5 (16,1)	0	0	-	-	107.986	66.396-185.943	104.784	49.640-210.278	212.770	153.180-276.674	55.808	0-95.433	149.967	92.792-225.877	9,4	9	4-17	3,6	3-5
	hetMNA no11q-	1 (3,2)	0	3	-	-	60.446	-	97.560	-	158.006	-	97.560	-	98.749	-	4	-	-	3	-
	hetMNA 11q-	1 (3,2)	0	1	-	-	70.488	-	74.701	-	145.189	-	74.701	-	79.625	-	4	-	-	2	-

Tabla 6. Subclasificación subgrupo b2 de inestabilidad. MNA, amplificación del gen *MYCN*; homMNA, MNA homogénea; hetMNA, MNA heterogénea; N, número de casos; Kb, kilobases; SCA, alteraciones cromosómicas segmentarias; SCAs típicas, SCAs descritas frecuentemente en NB con significado pronóstico conocido.

GRUPOS DE INESTABILIDAD	COMBINACIÓN	N (%)	N +1q	N 1p-	INESTABILIDAD TOTAL (Kb)				GANANCIAS SCAs (Kb)		PÉRDIDAS SCAs (Kb)		GANANCIAS SCAs TÍPICAS (Kb)		PÉRDIDAS SCAs TÍPICAS (Kb)		NÚMERO SCAs			NÚMERO SCAs TÍPICAS	
					MEDIA GANANCIA	RANGO GANANCIA	MEDIA PÉRDIDA	RANGO PÉRDIDA	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	MEDIANA	RANGO	MEDIA	RANGO
c1	noMNA no11q-	13 (50)	1	1	28.547	1.658-49.584	-	-	44.303	1.658-136.092	15.756	0-123.340	24.266	0-48.821	9.131	0-74.023	2	1	1-10	0,8	0-3
	noMNA 11q-	3 (11,5)	2	4	33.793	30.892-36.707	-	-	221.327	150.964-238.023	187.534	114.257-244.102	110.555	44.265-150.648	104.753	57.524-148.356	11	12	8-13	4	3-6
	homMNA no11q-	9 (34,6)	0	8	27.534	1.512-48.435	-	-	95.272	31.165-161.477	67.738	0-151.277	64.777	0-127.877	48.380	0-98.733	4	4	1-8	2,3	1-4
	homMNA 11q-	0	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	hetMNA no11q-	1 (3,8)	0	1	10.573	-	-	-	89.464	-	78.891	-	89.464	-	66.322	-	6	-	-	3	-
	hetMNA 11q-	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 7. Subclasificación subgrupo c1 de inestabilidad. MNA, amplificación del gen *MYCN*; homMNA, MNA homogénea; hetMNA, MNA heterogénea; N, número de casos; Kb, kilobases; SCA, alteraciones cromosómicas segmentarias; SCAs típicas, SCAs descritas frecuentemente en NB con significado pronóstico conocido.

GRUPO DE INESTABILIDAD	COMBINACIÓN	N (%)	N +1q	N 1p-	INESTABILIDAD TOTAL (Kb)				GANANCIAS SCAs (Kb)		PÉRDIDAS SCAs (Kb)		GANANCIAS SCAs TÍPICAS (Kb)		PÉRDIDAS SCAs TÍPICAS (Kb)		NÚMERO SCAs			NÚMERO SCAs TÍPICAS	
					MEDIA GANANCIA	RANGO GANANCIA	MEDIA PÉRDIDA	RANGO PÉRDIDA	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	MEDIANA	RANGO	MEDIA	RANGO
c2	noMNA no11q-	15 (40,5)	5	2	90.920	51.326-157.864	-	-	135.462	51.326-381.212	44.541	0-223.348	75.193	0-213.865	27.044	0-119.482	3,9	3	1-13	2	0-6
	noMNA 11q-	12 (32,4)	4	1	105.446	52.208-174.816	-	-	284.887	119.615-488.238	179.441	65.000-380.700	97.884	34.856-217.254	98.729	11.871-295.700	10,9	12	4-17	3,5	2-5
	homMNA no11q-	3 (8,1)	0	7	87.282	51.607-11.492	-	-	146.742	91.414-178.630	59.460	39.807-71.436	35.418	0-82.353	51.016	39.807-70.347	5,0	6	3-6	2,3	1-4
	homMNA 11q-	1 (2,7)	0	0	66.428	-	-	-	170.385	-	103.957	-	18.531	-	51.121	-	14	-	-	2	-
	hetMNA no11q-	5 (13,5)	2	1	81.195	60.229-126.420	-	-	119.656	60.229-168.041	38.461	0-94.156	42.259	39.877-77.000	18.382	0-38.958	6,0	6	1-11	1,8	1-3
	hetMNA 11q-	1 (2,7)	0	0	129.021	-	-	-	299.593	-	170.572	-	56.964	-	153.106	-	17	-	-	5	-

Tabla 8. Subclasificación subgrupo c2 de inestabilidad. MNA, amplificación del gen *MYCN*; homMNA, MNA homogénea; hetMNA, MNA heterogénea; N, número de casos; Kb, kilobases; SCA, alteraciones cromosómicas segmentarias; SCAs típicas, SCAs descritas frecuentemente en NB con significado pronóstico conocido.

GRUPO DE INESTABILIDAD	COMBINACIÓN	N (%)	N +1q	N 1p-	INESTABILIDAD TOTAL (Kb)				GANANCIAS SCAs (Kb)		PÉRDIDAS SCAs (Kb)		GANANCIAS SCAs TÍPICAS (Kb)		PÉRDIDAS SCAs TÍPICAS (Kb)		NÚMERO SCAs			NÚMERO SCAs TÍPICAS	
					MEDIA GANANCIA	RANGO GANANCIA	MEDIA PÉRDIDA	RANGO PÉRDIDA	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	MEDIANA	RANGO	MEDIA	RANGO
c3	noMNA no11q-	4 (18,2)	1	1	311.013	205.186-404.441	-	-	369.991	206.681-542.878	58.977	1.495-138.437	94.089	0-216.483	7.845	0-31.378	10,3	7,5	2-24	1,8	0-3
	noMNA 11q-	13 (59,1)	6	2	324.892	204.397-587.429	-	-	479.323	309.776-787.785	154.432	65.766-304.647	152.018	46.993-338.699	90.832	46.541-188.268	10	7	5-20	3,8	3-6
	homMNA no11q-	3 (13,6)	3	1	294.484	287.516-300.022	-	-	314.819	287.516-355.069	20.335	0-59.155	137.720	99.285-173.856	9.626	0-28.877	6,3	6	4-9	2,7	1-5
	homMNA 11q-	1 (4,5)	0	0	211.144	-	-	-	386.807	-	175.663	-	92.951	-	42.213	-	22	-	-	3	-
	hetMNA no11q-	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	hetMNA 11q-	1 (4,5)	1	0	482.451	-	-	-	668.187	-	185.736	-	191.502	-	113.869	-	15	-	-	5	-

Tabla 9. Subclasificación subgrupo c2 de inestabilidad. MNA, amplificación del gen *MYCN*; homMNA, MNA homogénea; hetMNA, MNA heterogénea; N, número de casos; Kb, kilobases; SCA, alteraciones cromosómicas segmentarias; SCAs típicas, SCAs descritas frecuentemente en NB con significado pronóstico conocido.

SUBGRUPO GANANCIA-PÉRDIDA	COMBINACIÓN	N (%)	N +1q	N 1p-	GANANCIAS SCAs (Kb)		PÉRDIDAS SCAs (Kb)		GANANCIAS SCAs TÍPICAS (Kb)		PÉRDIDAS SCAs TÍPICAS (Kb)		NÚMERO SCAs			NÚMERO SCAs TÍPICAS	
					MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	MEDIANA	RANGO	MEDIA	RANGO
2-2	noMNA no11q-	9 (17,6)	1	5	111.303	54.118-184.868	92.981	57.881-133.596	57.883	0-100.159	58.447	0-119.482	4,7	4	2-10	2,3	1-4
	noMNA 11q-	13 (25,5)	2	2	125.033	57.691-190.742	133.994	65.000-197.074	59.773	0-125.263	87.142	11.871-156.627	7,9	8	3-16	3,1	2-5
	homMNA no11q-	18 (35,3)	0	18	105.579	52.359-178.630	102.031	50.847-185.836	61.316	0-127.877	77.026	26.857-185.836	4,8	4	2-8	2,6	1-4
	homMNA 11q-	4 (7,8)	0	3	105.987	51.466-170.385	138.748	103.957-177.551	54.205	18.531-90.766	114.231	51.121-159.511	8	7	4-14	3	2-4
	hetMNA no11q-	4 (7,8)	0	4	123.651	89.464-168.041	98.839	64.301-158.006	72.846	39.877-97.560	55.784	19.107-98.749	7,8	8	4-11	2,8	2-3
	hetMNA 11q-	3 (5,9)	0	0	69.202	64.608-74.701	99.034	73.050-145.189	35.503	0-74.701	68.044	51.456-79.625	4	4	4	1,7	1-2

Tabla 14. Subclasificación de ganancias y pérdidas subgrupo 2-2. MNA, amplificación del gen *MYCN*; homMNA, MNA homogénea; hetMNA, MNA heterogénea; N, número de casos; Kb, kilobases; SCA, alteraciones cromosómicas segmentarias; SCAs típicas, SCAs descritas frecuentemente en NB con significado pronóstico conocido.



SUBGRUPO GANANCIA-PÉRDIDA	COMBINACIÓN	N (%)	N +1q	N 1p-	GANANCIAS SCAs (Kb)		PÉRDIDAS SCAs (Kb)		GANANCIAS SCAs TÍPICAS (Kb)		PÉRDIDAS SCAs TÍPICAS (Kb)		NÚMERO SCAs			NÚMERO SCAs TÍPICAS	
					MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	MEDIANA	RANGO	MEDIA	RANGO
3-2	noMNA no11q-	3 (13,6)	1	1	363.911	203.870-542.878	114.617	91.130-138.437	138.370	64.114-216.483	28.783	0-55.240	12,7	8	6-24	2,7	2-3
	noMNA 11q-	15 (68,2)	1	1	367.587	242.041-555.145	133.795	65.766-192.770	131.943	34.856-217.880	76.482	46.541-131.942	10,1	11	5-17	3,5	2-6
	homMNA no11q-	1 (4,5)	1	1	355.069	-	59.155	-	140.020	-	28.877	-	9	-	-	5	-
	homMNA 11q-	1 (4,5)	0	0	386.807	-	175.663	-	92.951	-	42.213	-	22	-	-	3	-
	hetMNA no11q-	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	hetMNA 11q-	2 (9,1)	1	1	483.890	668.187-299.593	178.154	170.572-185.736	124.233	56.964-191.502	133.488	113.869-153.106	16	16	15-17	5	5

Tabla 15. Subclasificación de ganancias y pérdidas subgrupo 3-2. MNA, amplificación del gen *MYCN*; homMNA, MNA homogénea; hetMNA, MNA heterogénea; N, número de casos; Kb, kilobases; SCA, alteraciones cromosómicas segmentarias; SCAs típicas, SCAs descritas frecuentemente en NB con significado pronóstico conocido.

SUBGRUPO GANANCIA-PÉRDIDA	COMBINACIÓN	N (%)	N +1q	N 1p-	GANANCIAS SCAs (Kb)		PÉRDIDAS SCAs (Kb)		GANANCIAS SCAs TÍPICAS (Kb)		PÉRDIDAS SCAs TÍPICAS (Kb)		NÚMERO SCAs			NÚMERO SCAs TÍPICAS	
					MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	RANGO	MEDIA	MEDIANA	RANGO	MEDIA	RANGO
3-3	noMNA no11q-	1 (5,6)	1	1	381.212	-	223.348	-	213.865	-	110.778	-	13	-	-	6	-
	noMNA 11q-	14 (77,8)	8	5	384.374	206.195-787.785	268.517	200.356-380.700	124.436	37.245-338.699	145.353	57.524-250.684	11,1	11	5-20	4,3	3-6
	homMNA no11q-	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	homMNA 11q-	1 (5,6)	0	1	210.278	-	276.674	-	0	-	225.877	-	11	-	-	3	-
	hetMNA no11q-	0	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	hetMNA 11q-	2 (11,1)	0	1	281.222	245.968-316.476	288.652	247.942-329.363	91.811	48.134.834	133.367	92.657-174.077	13,5	13,5	11-16	4	3-5

Tabla 16. Subclasificación de ganancias y pérdidas subgrupo 3-3. MNA, amplificación del gen *MYCN*; homMNA, MNA homogénea; hetMNA, MNA heterogénea; N, número de casos; Kb, kilobases; SCA, alteraciones cromosómicas segmentarias; SCAs típicas, SCAs descritas frecuentemente en NB con significado pronóstico conocido.

Total Num NCA	N	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 1,2	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 1,2,5,6	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 1,17	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 1,18	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 2,5	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 2,7	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 2,5,7	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 2,5,7,12	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 2,8	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 2,11	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 2,17
1	4											
2	1											
3	6											
4	1											
5	1	1		1								1
6	5	2		1	1		3			1		1
7	4					1						1
8	2	1		1	2		1			1		1
9	4	1	1		1	2	1	1	1	1		1
10	1	1	1		1	1	1	1	1	1		1
11	2			1			1			1		1
12	5	3	2	2	2	3	3	3	2	1	2	1
13	3	3	3	1	3	3	3	3	2	2	1	1
14	3	3	1		3	3	2	2	2	2	3	
15	1	1	1		1	1		1	1		1	
TOTAL	43	16	9	7	14	14	15	11	9	10	7	9
TAMAÑO COMBINACIONES		492.450	844.490	330.450	327.330	424.120	402.340	583.260	717.110	389.560	379.210	324.400

Tabla 17. Combinaciones de cromosomas en tumores con perfil NCA. Total Num NCA, número de NCAs totales; N, número de casos; Cr, cromosoma.



Total Num NCA	N	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 2,18	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 3,4	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 6,17	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 7,17	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 9,21	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 11,12	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 16,18	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 17,18	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 17,20	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 2,7,12	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 2,7,17	N COMBINACIÓN GANANCIA Cr 2,7,12,17	N COMBINACIÓN PÉRDIDA Cr 3,4
1	4													
2	1				1									
3	6	1				1								
4	1													
5	1									1				
6	5	2		1	2				2	2		1		
7	4		1	1					1	1				2
8	2	1			1	1	2					1		
9	4		1	2	1	1		1		1	1	1	1	
10	1	1		1	1				1		1	1	1	
11	2	1		1	1				1		1	1	1	
12	5	3	1	3	1	1	1	2	1	2	2	1	1	
13	3	3		1	1			2	1		2	1	1	
14	3	3	1			1	2	2			2			
15	1	1					1	1						
TOTAL	43	16	4	10	9	5	6	8	7	7	9	7	5	2
TAMAÑO COMBINACIONES		321.280	389.170	252.320	240.340	189.340	269.860	168.430	159.280	144.230	536.190	483.540	617.390	389.170

Tabla 18. Combinaciones de cromosomas en tumores con perfil NCA. Total Num NCA, número de NCAs totales; N, número de casos; Cr, cromosoma.