

Papel de la genética molecular en el cáncer infantil

R. López Almaraz, A. Montesdeoca Melián y J. Rodríguez Luis

Servicio de Pediatría. Unidad de Oncohematología Pediátrica. Hospital Universitario de Canarias. La Laguna. Tenerife. España.

Los estudios de genética molecular en el cáncer infantil han ido adquiriendo en los últimos años una importancia trascendental. Los avances en estas técnicas han permitido aumentar el conocimiento de distintos genes implicados en el desarrollo tumoral. Estas diferentes alteraciones génicas ocurren en tres grandes grupos de genes: oncogenes, genes supresores y genes reparadores de ADN. Los estudios citogenéticos (cariotipo) se complementan con diferentes técnicas moleculares como la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), la transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) o el cariotipo espectral (SKY), como más fiables, mejorando su sensibilidad.

En este artículo se repasan los genes más representativos y mejor estudiados implicados en la etiología molecular del cáncer pediátrico, tanto de neoplasias hematológicas (leucemias y linfomas) como de tumores sólidos (tumores cerebrales, neuroblastoma, tumor de Wilms, hepatoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Ewing y retinoblastoma), y cómo su estudio, además de permitir alcanzar un diagnóstico más preciso, ha desarrollado nuevos factores pronóstico y tratamientos más efectivos. Estas técnicas también pueden utilizarse en busca de la enfermedad mínima residual, durante y tras finalizar el tratamiento en leucemias, neuroblastomas y sarcomas, con el fin de prevenir su reaparición.

Palabras clave:

Citogenética. Genética molecular. RT-PCR. FISH. Alteraciones cromosómicas. Neoplasias hematológicas. Tumores sólidos. Enfermedad mínima residual.

THE ROLE OF MOLECULAR GENETICS IN CHILDHOOD CANCER

In the last few years molecular genetic studies of childhood cancer have acquired great importance. Advances in these techniques have increased knowledge of the various genes involved in tumoral development. Genetic al-

terations can occur in three large groups of genes: oncogenes, tumor suppressor genes, and DNA repair genes. Cytogenetic analyses (karyotyping) are complemented by various molecular techniques, such as fluorescence *in situ* hybridization (FISH), reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and spectral karyotyping (SKY). These are the most reliable techniques and improve the sensitivity of karyotyping.

The present article reviews the most representative and best characterized genes involved in the molecular etiology of childhood cancer, both hematologic malignancies (leukemia and lymphoma) and solid tumors (brain tumors, neuroblastoma, Wilms' tumor, hepatoblastoma, rhabdomyosarcoma, Ewing's sarcoma and retinoblastoma). Molecular techniques have enabled more precise diagnosis as well as identification of new prognostic factors and the development of more effective treatments. These techniques can also be useful in identifying minimal residual disease during and after treatment for leukemias, neuroblastomas and sarcomas, with the aim of predicting recurrence.

Key words:

Cytogenetics. Molecular genetics. RT-PCR. FISH. Chromosomal abnormalities. Hematologic malignancies. Solid tumors. Minimal residual disease.

INTRODUCCIÓN

Las neoplasias infantiles han ido adquiriendo a lo largo de las últimas décadas una importancia progresiva en el ámbito de la pediatría. La incidencia del cáncer en la infancia es de 120 nuevos casos anuales por cada millón de niños menores de 15 años. Actualmente, a partir del primer año de vida, el cáncer es la segunda causa de mortalidad infantil tras los accidentes¹. La leucemia es la neoplasia más frecuente, seguida en orden decreciente por los tumores cerebrales, linfomas, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, tumor de Wilms, tumores óseos (osteos-

Correspondencia: Dr. R. López Almaraz.
P.º Eugenio López, 4, 2.º B. 38280 Tegueste. Tenerife. España.
Correo electrónico: ritxil@comtf.es

Recibido en diciembre de 2002.

Aceptado para su publicación en mayo de 2003.

sarcoma y sarcoma de Ewing) y retinoblastoma². La supervivencia global observada en los últimos 5 años, a nivel nacional (Registro Nacional de Tumores Infantiles), se sitúa en el 71%.

Desde que se identificaron los primeros oncogenes mutados en el cáncer hasta nuestros días, ha habido un crecimiento exponencial en el conocimiento de los genes implicados en el desarrollo tumoral. Hoy sabemos que existen múltiples formas de alteraciones genéticas, y que estas ocurren en tres grandes grupos de genes: oncogenes, genes supresores y genes reparadores de ADN, lo que nos ha llevado a considerar el cáncer fundamentalmente como una enfermedad genética³. El análisis citogenético de las células malignas de los niños con cáncer ha identificado numerosas alteraciones cromosómicas recurrentes, adquiridas, correlacionadas específicamente con los distintos subtipos de neoplasias hematológicas y tumores sólidos, cuyo estudio proporciona una valiosa información con aplicaciones clínicas muy significativas. El estudio de diferentes genes implicados en la etiología molecular del cáncer infantil ha logrado alcanzar un diagnóstico más preciso, predecir factores pronóstico, desarrollar tratamientos más efectivos y menos tóxicos con mejoría de las tasas de supervivencia, valorar la respuesta al mismo, y detectar y cuantificar la enfermedad mínima residual⁴.

PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA

El análisis citogenético convencional (cariotipo) ha sido el método estándar para identificar alteraciones cromosómicas en las metafases de las células neoplásicas obtenidas tras cultivo *in vitro* de células de médula ósea, sangre periférica o tumores. Es un estudio morfológico de los cromosomas, teñidos habitualmente con bandas G, y su fiabilidad depende de una adecuada muestra. Otras propuestas alternativas, derivadas de la clonación de diferentes genes tumorales, han conseguido disponer de sondas de ADN que pueden usarse en varias pruebas de diagnóstico molecular. Estas técnicas son atractivas porque pueden ser realizadas en muestras insuficientes para análisis citogenético y son más precisas, más rápidas, más sensibles y más específicas que el cariotipo. Las más utilizadas hoy en día son:

1. *Southern blot (SB)*. Técnica molecular que analiza el ADN cromosómico aislado en las células; puede detectar una célula anormal de 100 normales⁵.

2. *FISH (hibridación in situ con fluorescencia)*. Una sonda marcada con fluorescencia es hibridada a una preparación cromosómica, con el fin de detectar, por microscopía de fluorescencia la presencia (o ausencia) de un determinado fragmento cromosómico, así como su localización cromosómica. Esta técnica es particularmente útil para la detección de aneuploidías (número anormal de cromosomas), deleciones y duplicaciones

de material genético, así como reordenamientos cromosómicos complejos^{5,6}.

3. *RT-PCR (transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa)*. Técnica molecular que analiza el ácido ribonucleico de transcripción (ARN_t) expresado en células tumorales; puede detectar una célula maligna entre 10⁵ a 10⁶ células normales⁵.

4. *Multiplex RT-PCR*. detecta simultáneamente varios ARN_t⁵.

La incorporación habitual de estas técnicas moleculares al tratamiento clínico de pacientes pediátricos con leucemias, linfomas y tumores sólidos tienen la ventaja de identificar translocaciones (t) crípticas y reordenamientos cromosómicos complejos, y definir la procedencia de segmentos cromosómicos involucrados en gran número de reordenamientos, así como para el análisis de la actividad de genes supresores de tumores y oncogenes en núcleos interfásicos de tejidos tumorales, proporcionando grandes ventajas diagnósticas y terapéuticas⁴. A continuación se expone una descripción de las más relevantes alteraciones genéticas propias de las principales neoplasias malignas infantiles y sus implicaciones en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

El ejemplo más conocido de un cambio cromosómico adquirido asociado a una neoplasia hematológica es la asociación del cromosoma Philadelphia (Ph) o t(9;22)(q32;q11) con la leucemia mieloide crónica (LMC). Fue la primera anomalía cromosómica específica descrita en la leucemia (1960) y es actualmente un indicador diagnóstico, detectado en el 95% de los casos de LMC⁷.

Leucemia linfoblástica aguda

En la leucemia linfoblástica aguda (LLA), el Ph está presente en el 2 al 4% de los casos pediátricos, y se conoce como un factor pronóstico desfavorable. Es un gen de fusión producido por translocación recíproca que une secuencias 3' del protooncogén *ABL* tirosincinasa del cromosoma 9 con secuencias 5' del gen *BCR* del cromosoma 22. Las proteínas de fusión *BCR-ABL* poseen actividad tirosincinasa y confieren una notable resistencia a la quimioterapia^{7,8}. La supervivencia libre de enfermedad (SLE) a los 5 años de los pacientes tratados con quimioterapia ha sido de sólo el 15-20% durante años. En recientes series de los grupos cooperativos más importantes la t(9;22) se mantiene como factor pronóstico independiente. La intensificación de la quimioterapia y el trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) han contribuido a mejorar los resultados alcanzándose en algunos grupos una SLE en torno al 40%⁹.

En los actuales protocolos de estudio y tratamiento de la LLA en la edad pediátrica, y en concreto en el LAL/SHOP-99, utilizado por la mayor parte de los cen-

TABLA 1. Alteraciones cromosómicas en niños con leucemia linfoblástica aguda

Translocación	Genes implicados	Frecuencia (%)*	Pronóstico/SLE
<i>Estirpe B</i>			
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL</i>	4	Peor/25-35%
t(1;19)(q23;p13.3)	<i>E2A-PBX1</i>	6	Peor/70-80%
t(17;19)(q22;p13.3)	<i>E2A-HLF</i>	< 1	Peor
t(5;14)(q31;q32)	<i>IL3 (IGH)</i>	< 1	Peor
t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL-AF4</i>	2	Peor/10-30%
t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL-AML1</i>	25	Mejor/85-90%
<i>Células B/Linfoma de Burkitt</i>			
t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC (IGH)</i>	5	No implicación/70-80%
t(2;8)(q12;q24)	<i>MYC (IGK)</i>	< 1	No implicación/70-80%
t(8;22)(q24;q11)	<i>MYC (IGA)</i>	< 1	No implicación/70-80%
<i>Estirpe T</i>			
t(10;14)(q24;q11)	<i>HOX11 (TCRδ)</i>	< 1	No implicación
t(11;14)(p15;q11)	<i>TTG1 (TCRδ)</i>	1	No implicación/60%
t(1;14)(p32;q11)	<i>TAL1 (TCRδ)</i>	1	No implicación/60%

*Porcentaje del total de casos de niños con leucemia linfoblástica o mieloblástica. SLE: supervivencia libre de enfermedad.

TABLA 2. Alteraciones citogenéticas y moleculares en LLA infantil e inclusión en grupo pronóstico o de riesgo (protocolo de estudio y tratamiento de la LLA en Pediatría LAL/SHOP-99)

Pronóstico/riesgo	Alteración
Favorable o no desfavorable/ riesgo estándar	Hiperdiploidía alta o índice ADN > 1,16 t(12;21) o <i>TEL-AML1</i> + Cariotipo normal
Muy desfavorable/ muy alto riesgo	Casi haploidía o índice ADN < 0,6 t(9;22) o <i>BCR-ABL</i> + t(4;11) o <i>MLL</i> +
Desfavorable/ alto riesgo	Hiperdiploidía baja o índice ADN: 1-1,16 Hipodiploidía o índice ADN: 0,6-0,99 Casi tetraploidía Resto de alteraciones estructurales, excepto las indicadas en los grupos previos

LLA: leucemia linfoblástica aguda.

tros españoles, al iniciarse se realiza estudio citogenético y molecular a nivel de la médula ósea y/o en sangre periférica. Estos estudios incluyen:

1. *Índice de ADN*. Mediante citometría de flujo. Los tumores se clasifican de acuerdo con los siguientes grupos: < 0,6; 0,66-0,99; 1; 1-1,16 y > 1,16.

2. *Cariotipo convencional*. Mediante el cultivo 24, 48 o 72 h y estudio de bandas G. Se pueden detectar alteraciones numéricas como casi haploidía (24-29 cromosomas), hipodiploidía (30-45 cromosomas), diploidía (46 cromosomas sin alteraciones estructurales), pseudodiploidía (46 cromosomas con alteraciones estructurales), hiperdiploidía baja (47-50 cromosomas, se detecta en el 8-15% de los niños con LLA), hiperdiploidía alta (51-81 cromosomas, se detecta en el 25-30%), casi tetraploidía (82-94 cromosomas) y estructurales como t(9;22), t(4;11), otras del 11q23, t(1;19), t(8;14), otras del 8q24 y t(12;21)^{3-5,10}.

3. *Estudio molecular* (tabla 1). Las alteraciones con mayor implicación pronóstica son el gen *TEL-AML1* que identifica a la t(12;21), el reordenamiento *MLL* que identifica a la t(4;11), el gen *BCR-ABL* que identifica a la t(9;22) y el *E2A-PBX1* que identifica a la t(1;19)¹⁰.

Con el estudio citogenético y molecular (tabla 2), edad, inmunofenotipo, número de leucocitos, ausencia o presencia de afectación extramedular al manifestarse y el porcentaje de blastos en médula ósea en el día +14 del tratamiento de inducción pueden definirse diferentes grupos de riesgo (estándar, alto riesgo y muy alto riesgo) y así optimizar el tratamiento posterior según el grupo, con el fin de mejorar la supervivencia a largo plazo.

Para evaluar la remisión completa (< 5% de blastos en médula ósea) se realizan controles de médula ósea a los 14 días de tratamiento, al final de la inducción (día +34) y tras finalizar el mismo. Mediante el empleo de las actuales técnicas de citometría de flujo y citogenética; así como mediante distintas técnicas moleculares como la FISH de interfase y, sobre todo, la RT-PCR (con una sensibilidad 100 veces superior), es posible detectar la enfermedad mínima residual (EMR) en numerosos pacientes en remisión^{7,11,12}. La EMR consiste en la persistencia del clon anormal, aun en niveles bajos, durante y después de terminar el tratamiento, y tiene una significación pronóstica. Sería deseable realizar el estudio al final de la inducción, al final de la consolidación y tras finalizar el tratamiento. La introducción de estas técnicas ha conducido a una nueva definición de remisión en las LLA según la cual podría considerarse remisión hematológica cuando no se detecta EMR¹³ a nivel de 1×10^{-4} . Diversos trabajos ponen de manifiesto que los pacientes con EMR $\geq 1 \times 10^{-2}$ al finalizar la inducción tienen un riesgo de recidiva superior al 60% en el curso de los 3 años siguientes frente a menos del 15% en los que no se detec-

ta EMR^{11,14}. Con niveles $\geq 1 \times 10^{-3}$ después del tratamiento de consolidación se tiene un riesgo de recidiva de aproximadamente el 70%¹². En todos los grupos la persistencia de EMR por más de 6 meses tras la terapia de inducción, o la reaparición de EMR está invariablemente asociada con recidiva. Por lo tanto, la detección de la EMR aporta una valiosa información sobre la predicción del curso clínico de la enfermedad y puede permitir en consecuencia adoptar actitudes terapéuticas.

Leucemia mieloblástica aguda

La leucemia mieloblástica aguda (LMA) tiene una baja incidencia en niños (entre el 15-20% de todas las leucemias en niños menores de 15 años). Ciertos síndromes constitucionales y hereditarios predisponen a la aparición de LMA, como el síndrome de Down, la anemia de Fanconi, el síndrome de Bloom, el síndrome de Kostmann y la anemia de Blackfan-Diamond³. El análisis citogenético detecta alteraciones en el 85% de los niños con LMA. Hay reordenamientos cromosómicos específicos que originan genes de fusión. Éstos incluyen la t(8;21)(q22;q22) asociada a la LMA-M₂, la t(15;17)(q21;q21) diagnóstica de la leucemia promielocítica aguda (M₃) y la inversión del cromosoma 16 asociada con la leucemia mielomonocítica aguda con eosinófilos anormales (M₄Eo). Estos tres reordenamientos se relacionan con un pronóstico favorable, por lo que su identificación precisa es crítica. La t(9;11)(p21;q23), casi exclusivamente asociada a la leucemia monocítica aguda (M₅), parece asociar un pronóstico no tan adverso. La trisomía 8 es un hallazgo común en todos los tipos de trastornos mieloides. La pérdida de los cromosomas 5 y 7, o las deleciones de sus brazos largos, son hallazgos frecuentes en la LMA que condicionan un pronóstico desfavorable^{7,10,15,16}. Las asociaciones más representativas se detallan en la tabla 3.

Los genes de la t(15;17), *PML* en 15q22 y *RAR α* en 17q12 (gen que codifica el receptor del ácido retinoico), y el producto de fusión *PML-RAR α* , son especialmente útiles para la monitorización terapéutica de la enfermedad¹⁷. La respuesta terapéutica de la LMA-M₃ al ácido retinoico representa el primer ejemplo de tratamiento selectivo orientado a una alteración génica específica¹⁸.

En la LMA, la detección de EMR depende principalmente del hallazgo de inmunofenotipos aberrantes mediante citometría de flujo, debido a que en ella está limi-

TABLA 3. Alteraciones cromosómicas en niños con LMA

Translocación	Genes implicados	Frecuencia (%) [*]	Pronóstico /SLE
t(8;21)(q22;q22)	<i>AML1-ETO</i>	10-12	Mejor
t(15;17)(q21;q21)	<i>PML-RARα</i>	7-10	Mejor
inv(16)(p13;q22)	<i>CBFB-MYH11</i>	10-12	Mejor
t(9;11)(p21;q23)	<i>MLL-AF9</i>	8-10	Mejor

*Porcentaje del total de casos de niños con leucemia linfoblástica o mieloblástica. LMA: leucemia mieloblástica aguda; SLE: supervivencia libre de enfermedad.

tado el análisis mediante PCR. La aplicación de la FISH permite observar reordenamientos y translocaciones "ocultas" no detectados en el cariotipo⁷, mejorando así de forma sustancial el seguimiento de nuestros pacientes.

Linfomas

Los linfomas de Burkitt presentan alteraciones citogenéticas y moleculares idénticas a la LLA de células B (L₂), como la t(8;14) y sus variantes. Los linfomas linfoblásticos de estirpe T comparten un gran número de reordenamientos génicos presentes en las LLA de estirpe T^{4,19} (tabla 4).

En los linfomas anaplásicos de células grandes (Ki-1 o CD30+) la identificación de la t(2;5)(p23;q35), o a nivel molecular del reordenamiento de los genes *NMP* en 2p23 y *ALK* en 5q35, usando RT-PCR, permite el reconocimiento de la enfermedad y la clasificación en un subgrupo de pacientes que requieren terapia específica²⁰.

La expresión del gen *BCL2* en los linfomas foliculares, raros en la edad pediátrica, identifica un subgrupo de pacientes que a menudo se manifiestan como enfermedad diseminada y son más refractarios a la quimioterapia²¹.

TUMORES SÓLIDOS

En la mayoría de las ocasiones el diagnóstico definitivo de un tumor sólido se realiza mediante estudios histológicos. Sin embargo, el diagnóstico morfológico de algunos tipos de tumores es difícil, dada su apariencia ambigua o escasa diferenciación. Un ejemplo son los tumores de células pequeñas redondas como el rabdomiosarcoma, sarcoma de Ewing /tumor neuroectodérmico primitivo (PNET), neuroblastoma y linfoma, que pueden

TABLA 4. Alteraciones citogenéticas recurrentes en linfomas infantiles

Fenotipo tumoral	Translocación	Genes implicados	Pronóstico
Linfoma de Burkitt	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC (IGH)</i>	No implicación
Linfoma no hodgkiniano-T	t(11;14)(p13;q11) t(7;11)(q35;p13) t(7;14)(p15;q11)	<i>TCR α, β, δ, γ</i>	No implicación
Linfoma anaplásico de células grandes	t(2;5)(p23;q35)	<i>NPM-ALK</i>	Sólo diagnóstico

presentarse como masas en tejidos blandos⁵. La utilización en estos casos de la inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos, así como la citogenética molecular mediante la identificación de translocaciones cromosómicas (t) recurrentes asociadas con tipos de tumores específicos es fundamental, ya que el tratamiento y el pronóstico de cada tumor son diferentes^{22,23}.

El análisis citogenético ha progresado más lentamente en los tumores sólidos que en las leucemias. Parte de este retraso se ha debido a la dificultad de estas células para dividirse *in vitro* y a la mala calidad de las metafases cromosómicas. Esta situación está cambiando en los últimos años debido al empleo de sondas moleculares y de mejores métodos de cultivo celular⁴. En la tabla 5 aparecen las alteraciones citogenéticas más características en tumores sólidos infantiles.

Tumores del sistema nervioso central

Ciertos procesos como las neurofibromatosis tipo 1 y 2, la esclerosis tuberosa y el síndrome de Li-Fraumeni, entre otros, predisponen al desarrollo de tumores cerebrales, aunque menos del 10% de los niños con un tumor

del sistema nervioso central (SNC) están afectados de un síndrome. Todos estos síndromes asociados tienen un patrón de herencia autosómico dominante y presentan mutaciones somáticas de genes específicos que se exponen en la tabla 6^{24,25}.

El gen *p53*, localizado en el brazo corto del cromosoma 17, es un gen supresor tumoral de especial importancia en la oncogénesis e implicado en la patogenia del astrocitoma. Las mutaciones somáticas del *TP53* son las alteraciones genéticas más frecuentes de los tumores humanos. Además, las mutaciones del *TP53* en línea germinal se relacionan con una predisposición hereditaria al desarrollo tumoral, sobre todo en individuos con síndrome de Li-Fraumeni, en los que estas mutaciones se encuentran entre el 60 y el 80% de los casos. La proteína *p53* ejerce su influencia en muchas funciones celulares que facilitan la progresión del ciclo celular, reparan el daño del ADN, mantienen la estabilidad genómica y favorecen la apoptosis celular tras el tratamiento. Su estabilidad sirve de mediador para la respuesta del tumor a la radiación y la sensibilidad celular a los agentes antineoplásicos^{24,26}. Estudiando la expresión y las mutaciones del *TP53* en

TABLA 5. Alteraciones citogenéticas recurrentes en tumores sólidos infantiles

Fenotipo tumoral	Alteración cromosómica	Genes implicados	Pronóstico
Neuroblastoma	del 1p	<i>N-MYC</i>	Peor
Tumor de Wilms	del 11p13 del 11p15	<i>WT1</i> <i>WT2</i>	Sólo diagnóstico Sólo diagnóstico
Rabdomiosarcoma alveolar	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14)	<i>PAX3-FKHR</i> <i>PAX7-FKHR</i>	Peor Peor
Sarcoma de Ewing	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(7;22)(p22;q12)	<i>EWS-FLI1</i> <i>EWS-ERG</i> <i>EWS-ETV1</i>	Sólo diagnóstico Sólo diagnóstico Sólo diagnóstico
Tumor desmoplásico	t(11;22)(p13;q12)	<i>EWS-WT1</i>	Sólo diagnóstico
Sarcoma sinovial	t(X;18)(p11,2;q11,2)	<i>SYT-SSX</i>	Sólo diagnóstico
Retinoblastoma	del 13q14 del 11p13	<i>RBI</i>	Sólo diagnóstico

TABLA 6. Síndromes asociados con tumores cerebrales

Síndrome	Genes implicados	Alteración cromosómica	Tipos tumorales
Li-Fraumeni	<i>TP53</i>	17p13	Astrocitoma, meduloblastoma
Neurofibromatosis tipo 1	<i>NF-1</i>	17q11	Neurofibroma, glioma del nervio óptico, astrocitoma
Neurofibromatosis tipo 2	<i>NF-2</i>	22q12	Schwannoma del nervio acústico bilateral, meningioma, ependimoma espinal
Esclerosis tuberosa	<i>TSC1</i> <i>TSC2</i>	9q34 16p13	Astrocitoma subependimario gigantocelular
Gorlin (carcinoma basocelular nevoide)	<i>PTCH</i>	9q31	Meduloblastoma
Turcot	<i>APC</i> <i>bMLH1</i> <i>bPMS2</i>	5q21 3p21 7p22	Meduloblastoma, astrocitoma
Von Hippel-Lindau	<i>VHL</i>	3p25	Hemangioblastoma

los gliomas infantiles, se encuentran que los tumores con mayor expresión de *p53* se asocian con peor pronóstico con independencia de la edad, el sexo, la histología, el grado de resección y la localización²⁶.

En el meduloblastoma, la alteración que se encuentra en el 50% de los casos es el isocromosoma 17q (i17q) que resulta de la monosomía del brazo corto del cromosoma 17 (17p). También son frecuentes alteraciones variables del cromosoma 1. La pérdida de heterocigosidad del cromosoma 17 (LOH 17p) puede ser un indicador de una pobre respuesta al tratamiento y menor supervivencia, sobre todo si se asocia la amplificación del gen *MYC*, por resistencia al tratamiento²⁷. Mediante el uso de *microarrays* o *microchips* de ADN en pacientes con tumores embrionarios del SNC, se demuestra que los meduloblastomas son molecularmente distintos que los PNET²⁸.

En general, las alteraciones cromosómicas en los tumores cerebrales pediátricos son más frecuentes en los tumores de alto grado, y más en las localizaciones supratentoriales que en las infratentoriales. No existen todavía pruebas suficientes de la correlación existente entre la morfología del tumor y los estudios citogenéticos y moleculares, que deben combinarse para identificar las alteraciones genómicas en los diferentes tipos histológicos, con el fin de establecer criterios de riesgo²⁵.

Neuroblastoma

El neuroblastoma es un tumor derivado de las células de la cresta neural. Se caracteriza por ser muy variable y, en ocasiones, presentar un comportamiento clínico impredecible, desde un tumor benigno localizado a un tumor maligno agresivo con un pronóstico pobre^{29,30}. Se han descrito múltiples alteraciones genéticas recurrentes, y la correlación de estas anomalías con el pronóstico de la enfermedad es muy elevada:

1. La amplificación del oncogén *N-MYC*, determinada por SB y/o FISH, está asociada con tumores agresivos y pobre respuesta al tratamiento, independiente de la edad y del estadio de la enfermedad, lo que ha llevado a usar protocolos terapéuticos más intensivos en este grupo de pacientes^{5,29,30}.

2. La hiperdiploidía se relaciona con una respuesta favorable al tratamiento estándar, mientras que los niños con tumores diploides son susceptibles de tratamientos más agresivos^{5,29}. La medición del contenido de ADN se realiza por citometría de flujo.

3. La delección del 1p con pérdida de heterocigosidad está también asociada a un curso desfavorable³¹. Se ha delimitado por FISH y PCR o por SB, una región constantemente delecionada en 1p36.2-36.3 que alberga a uno o quizá dos hipotéticos genes supresores tumorales del neuroblastoma³².

4. Se han descrito recientemente dos nuevas líneas celulares en neuroblastoma metastásico, sin amplificación

del *N-MYC* que incluyen translocación con desequilibrio entre 11q y 17q, pérdida del 3p, 4p y 11q y ganancia del 17q³³.

Todas estas determinaciones se realizan en nuestro país en diferentes centros de referencia: en el tumor primario (Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de Valencia) y en médula ósea/sangre periférica (Servicio de Genética del Hospital Universitario La Fe, Valencia).

El *cariotipo espectral* (SKY), basado en el pintado fluorescente cromosómico multicolor, se está utilizando cada vez con más frecuencia para detectar las alteraciones cromosómicas del neuroblastoma, ya que tiene la capacidad de detectar anomalías cromosómicas estructurales (translocaciones, deleciones, ganancias, etc.) crípticas para otras técnicas, aunque con la limitación de precisar el análisis de metafases³⁴.

El análisis citogenético y molecular es imprescindible para el tratamiento correcto del neuroblastoma. En los últimos tiempos se está utilizando la RT-PCR del ARN mensajero (ARNm) para los genes tirosina-hidroxilasa (*TH*) y *MAGE* e inmunocitología con anticuerpos anti-GD2 para la detección de la EMR en médula ósea, sangre periférica y productos de aféresis (el autotrasplante de progenitores hematopoyéticos de sangre periférica está indicado como rescate de la terapia mieloablativa en aquellos casos de alto riesgo que han alcanzado la remisión completa o muy buenas remisiones parciales)³⁵⁻³⁷.

Tumor de Wilms

El tumor de Wilms es el tumor renal maligno más frecuente en la infancia. Tras la cirugía, y debido a su alta quimiosensibilidad y radiosensibilidad, con los protocolos terapéuticos actuales pueden curarse más del 85% de los niños. El tumor de Wilms puede encontrarse aislado o bien asociado a ciertas malformaciones congénitas como³⁸:

1. La aniridia (asociación en un 50%).
2. El síndrome de WARG (aniridia, anomalías genitourinarias y retraso mental) (30-50%).
3. El síndrome de Denys-Drash (seudohermofroditismo masculino y esclerosis mesangial).
4. El síndrome de Beckwith-Wiedemann (macroglia, visceromegalia e hiperinsulinismo) (10%).

Las posibles alteraciones cromosómicas pueden estudiarse en el tejido tumoral por RT-PCR e inmunohistoquímica³⁹. Los pacientes con síndrome de WARG presentan una delección en el *locus* 11p13, en el que se ha clonado un gen supresor tumoral llamado *WT1*⁴⁰. En el síndrome de Denys-Drash se han demostrado también mutaciones del gen *WT1*⁴¹. Este gen codifica cuatro diferentes transcripciones del ARNm, que se expresan de manera preferente en las células renales. No se conoce con

exactitud la función de este gen, pero se piensa que tendría algún control de la entrada de la célula en la fase S del ciclo celular. Es posible que una mutación en *WT1* en sí misma no sea necesaria para el desarrollo de un tumor de Wilms³⁸. Contiguo al gen *WT1* se localiza el gen *PAX6* cuya pérdida alélica es responsable de la aniridia. Un segundo gen del tumor de Wilms, llamado *WT2*, se ha identificado en 11p15, en pacientes con síndrome de Beckwith-Wiedemann⁴².

Se han señalado otros defectos genéticos en el tumor de Wilms (deleciones, mutaciones, etc.), algunos de ellos como pérdidas alélicas del 16q asociadas a tumores de características anaplásicas y con mal pronóstico⁴³.

Hepatoblastoma

Es una neoplasia de origen embrionario y el tumor hepático primario más frecuente en la edad pediátrica. En los casos relacionados con ciertos procesos hereditarios como la hemihipertrofia y el síndrome de Beckwith-Wiedemann, se ha detectado pérdida de heterocigosidad (LOH) para el *locus* 11p15 en las células tumorales, que también se ha asociado con el tumor de Wilms y el rhabdomyosarcoma. Durante los últimos años se han identificado alteraciones génicas en hepatoblastomas esporádicos como la LOH de la región cromosómica 11p15.5, LOH en los brazos cromosómicos 1p y 1q, mutaciones activadas en el exón 3 del gen de la betacatenina (*BCM*), así como la sobreexpresión del oncogén *C-MET*. Estas alteraciones pueden estudiarse en tejido tumoral en comparación con tejido hepático normal y/o en leucocitos de sangre periférica. La LOH 11p15.5 y la LOH 1p aparecen de forma significativa en hepatoblastomas embrionarios, mientras que no se encuentran otras alteraciones genéticas específicas en otros tipos histológicos^{44,45}.

Sarcomas de partes blandas

Los rhabdomyosarcomas son un grupo heterogéneo de tumores de partes blandas de alto grado de malignidad, caracterizados histológicamente por varios grados de diferenciación celular, derivados del mismo mesénquima embrionario que da origen al músculo esquelético estriado⁴⁶.

En el rhabdomyosarcoma existen alteraciones cromosómicas de tipo numérico y estructural:

1. El contenido celular de ADN (ploidía) es analizado por citometría de flujo o de imagen. En el tipo embrionario suele presentarse hiperdiploidía y en el alveolar tetraploidía⁴⁷.

2. Respecto a las anomalías estructurales, aproximadamente en el 90% de los rhabdomyosarcomas alveolares presentan una translocación recíproca de los cromosomas 2 y 13, la t(2;13)(q35;q14), detectada con RT-PCR y FISH, en la que el gen *PAX3* se fusiona dentro de la banda 2q35 con el gen *FKHR* en la banda 13q14. Algunos

casos presentan una variante, t(1;13)(p36;q14), caracterizada por el reordenamiento del gen *PAX7* del cromosoma 1, el cual se une con el gen *FKHR* del cromosoma 13. También se han encontrado mutaciones del gen *p53* en el 50% de los casos, tanto en tumores alveolares como embrionarios. Aunque en el subtipo embrionario no se ha descrito una alteración específica, las mutaciones puntuales de los protooncogenes *N-RAS* y *K-RAS* son más frecuentes que en el subtipo alveolar. En este último se observa amplificación del gen *N-MYC* en un 10% de los casos^{46,48}.

Estos marcadores biológicos tienen el valor de que, además de ser buenos indicadores diagnósticos, se ha comprobado que también tienen importancia pronóstica. En cuanto al contenido de ADN, los tumores tetraploides y los diploides suelen evolucionar peor (SLE a los 5 años del 25 y 33%, respectivamente), y los hiperdiploides suelen ser más sensibles a la quimioterapia y radioterapia, con una SLE a los 5 años del 73%⁴⁷. La expresión del *PAX-FKHR* se ha comprobado ser indicador pronóstico en el rhabdomyosarcoma alveolar. La expresión del *PAX3-FKHR* identifica a un subgrupo de muy alto riesgo y el *PAX7-FKHR* a otro subgrupo de evolución favorable en el rhabdomyosarcoma alveolar metastásico⁴⁹.

Sarcoma de Ewing/tumor neuroectodérmico primitivo

La familia de tumores de Ewing/PNET es el segundo tumor óseo maligno más común, después del osteosarcoma, en niños y adolescentes. Hoy día se sabe que estos tumores derivan de una célula neuroectodérmica primitiva con diferenciación variable. El sarcoma de Ewing se presenta habitualmente en el hueso y con menor frecuencia a nivel extraóseo. Las características morfológicas y biológicas de los que se desarrollan en los tejidos blandos no parecen distinguirse de las que se desarrollan en el hueso, y son también muy similares a los PNET, lo cual confirma un origen común de estas entidades. Actualmente, el tratamiento es el mismo para todos estos tumores⁵⁰⁻⁵².

Más del 90% de los tumores de Ewing se caracterizan por una translocación t(11;22)(q24;q12). La t(11;22) resulta de la fusión de dos genes, *FLII* en 11q24 y *EWS* en 22q12, formando el oncogén *EWS-FLI* que puede detectarse por RT-PCR y FISH^{52,53}. Algunos estudios recientes sugieren que la estructura de la transcripción de la fusión *EWS-FLI* tiene importancia pronóstica en pacientes con enfermedad localizada⁵⁴. También puede encontrarse alguna de las variantes de la t(11;22) como la t(21;22)(q22;q12) que expresa el gen *EWS-ERG*, la t(7;22)(p22;q12) que desarrolla el *EWS-ETVI* y la t(17;22)(q12;q12) formando el *EWS-ELAF*⁵³. La sobreexpresión de la proteína *p53* constituye un factor pronóstico altamente desfavorable⁵⁵. El estudio molecular puede llevarse a

cabo en porciones relativamente pequeñas de tejido que se obtienen mediante biopsias invasivas mínimas, y permite obtener resultados más rápidos que el análisis citogenético⁵³.

En esta familia de tumores puede estudiarse la EMR al finalizar el tratamiento, y de este modo predecir y prevenir su reaparición. Se analizan por RT-PCR los oncogenes específicos de fusión del sarcoma de Ewing en muestras de tumor al diagnóstico y en médula ósea (detección de enfermedad micrometastásica) y sangre periférica (detección de enfermedad microcirculante) al diagnóstico, durante el tratamiento y tras finalizar el mismo⁵⁰. Estos estudios pueden realizarse en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC-UAM) de Madrid como centro de referencia nacional.

Retinoblastoma

El retinoblastoma es un tumor maligno de la retina de origen embrionario, que se observa en niños pequeños, con una incidencia de 1/20.000 nacidos vivos⁵⁶.

Los estudios de Knudson en la década de 1970 llevaron a la conclusión de que el tumor se inicia sólo con dos eventos genéticos que se corresponderían con mutaciones en ambos alelos del gen *RB1*⁵⁷.

El estudio del cariotipo de los niños con retinoblastoma suele ser normal; sin embargo, el 16% se asocian a una deleción o translocación del cromosoma 13 región q14 (*locus RB1+*). Es el paradigma de las neoplasias originadas como consecuencia de la mutación de un gen supresor tumoral y una disregulación del ciclo celular. El gen *RB1* funciona como un regulador negativo del ciclo celular y como gen supresor tumoral. Su función se anula cuando mutan o se pierden ambos alelos, permitiendo de esta forma que se activen o sobreexpresen otros genes llamados oncogenes. Se ha comprobado un mecanismo similar al del retinoblastoma para otras neoplasias hereditarias de origen embrionario como el tumor de Wilms y el neuroblastoma^{58,59}.

El retinoblastoma es un tumor que puede desarrollarse mediante transmisión hereditaria o bien de forma esporádica:

1. Los casos de retinoblastoma hereditario (40%), con frecuencia bilateral, se producen debido a que el niño presenta un alelo *RB1* mutante en la línea germinal. De esta manera, una sola mutación somática en cualquiera de las células de su retina inactivaría el alelo normal mutante. En estos casos, la enfermedad se hereda según un patrón de herencia autosómica dominante de alta penetrancia. Los individuos portadores de mutaciones germinales en el gen *RB1* poseen un riesgo muy superior al de la población general a desarrollar retinoblastoma, así como otros tumores como el osteosarcoma^{56,60}.

2. El retinoblastoma esporádico (60%), en que el tumor es normalmente unilateral, se origina porque am-

bos alelos del gen *RB1* se han inactivado mediante mutación somática en una sola célula de la retina del niño afectado^{56,61}.

El estudio genético de una muestra de sangre periférica para detectar el estado de portador con tendencia a desarrollar un retinoblastoma, pudiera estar indicado como método para el consejo genético en familiares de afectados por el tumor. La disponibilidad de estos métodos de estudio permite descartar en la actualidad dicha posibilidad en las familias de niños afectados, con el consiguiente ahorro de exploraciones innecesarias y la tranquilidad de saberse libre de la amenaza de desarrollar el tumor^{56,58,61}. En formas unilaterales sin historia familiar previa, el riesgo de transmisión es del 6% para el primer hijo y del 3% para el segundo si el anterior no presenta la enfermedad. Con padres no afectados y en un primer hijo con retinoblastoma unilateral, el riesgo para un segundo hijo es del 1 y si la afectación es bilateral del 6%⁵⁶.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Los *microarrays* o *micro-chips* de ADN son una nueva y revolucionaria herramienta utilizada en biología molecular para el estudio de expresión génica, identificación de marcadores genéticos y análisis de mutaciones en el cáncer humano. Los *microarrays* son capaces de estudiar más de 48.000 genes simultáneamente en un único análisis. La ampliación del conocimiento y el análisis de los diferentes genes relacionados con el cáncer infantil, utilizando los *microarrays*, son y serán extraordinariamente importantes para mejorar su diagnóstico, tratamiento y pronóstico^{28,62-64}.

La terapia génica es una modalidad de tratamiento en la cual se emplea un gen para modificar o añadir nuevas propiedades bioquímicas a las células diana del paciente con propósitos terapéuticos. En la actualidad, este tipo de terapia está siendo enfocada y desarrollada intensamente para el tratamiento del cáncer, esperando que alcance un nivel más alto de actividad antitumoral, una mayor selectividad tisular y menos efectos adversos que las terapias convencionales. Tras una década de ensayos preclínicos y clínicos (los más avanzados en fase III; pero la gran mayoría en fase I), aún existen diversos obstáculos que limitan la eficiencia antitumoral de esta terapia. Los avances en el campo de la biología molecular y áreas relacionadas prometen refinar, ampliar y hacer más poderoso el arsenal antineoplásico para la terapia génica⁶⁵⁻⁶⁷.

En conclusión, pueden destacarse los siguientes puntos:

1. Diferentes neoplasias hematológicas y tumores sólidos infantiles pueden correlacionarse con alteraciones cromosómicas específicas.

2. La citogenética convencional, junto a las nuevas técnicas de estudio molecular, se han convertido en un elemento imprescindible para establecer un correcto diag-

nóstico, nuevos factores pronóstico y como consecuencia de todo ello, una mejora en el tratamiento de las leucemias, linfomas y un gran número de los tumores sólidos pediátricos.

3. La incorporación de nuevas técnicas moleculares como la FISH, la RT-PCR y el SKY han permitido mejoras significativas en el diagnóstico en oncología pediátrica, al ser más precisas, rápidas, sensibles y específicas que el cariotipo, y con la ventaja añadida de precisar una escasa muestra para realizar estos estudios.

4. En la LLA infantil se incluyen datos clínicos, biológicos y citogenéticos, para la clasificación en diferentes grupos de riesgo, lo cual permite individualizar el tratamiento con el propósito de mejorar las tasas de supervivencia a largo plazo.

5. El análisis citogenético en un tipo de tumores sólidos como los de células pequeñas redondas, de morfología histopatológica similar (neuroblastoma, sarcoma de Ewing/PNET, rhabdomyosarcoma, meduloblastoma, linfoma) ha permitido diferenciarlos y precisar su diagnóstico.

6. Muchas de las alteraciones genéticas que se han descrito en tumores sólidos infantiles se pueden correlacionar con el pronóstico de la enfermedad.

7. La citogenética y la genética molecular pueden ser utilizadas en el estudio de la EMR en distintos períodos del tratamiento y tras finalizar el mismo en leucemias, neuroblastomas y sarcomas. La persistencia o la reaparición de EMR se relaciona con la recurrencia tumoral.

8. Los avances en biología molecular aplicada a la práctica clínica, incluidos los centrados en terapia génica, permitirán en el futuro aumentar la curación de nuestros pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

- Muñoz A. Introducción a la oncología pediátrica. En: Madero López L, Muñoz Villa A, editors. Hematología y oncología pediátricas. 1ª ed. Madrid: Ergón, 1997; p. 197-206.
- Young JL, Ries LG, Silverberg E, Horm JW, Miller RW. Cancer incidence, survival and mortality for children younger than age 15 years. *Cancer* 1986;58(Suppl 2):598-602.
- Look AT, Kirsch IR. Molecular basis of childhood cancer. En: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and practice of pediatric oncology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002; p. 45-87.
- Martínez JA, Castel V, García-Conde J. Citogenética molecular del cáncer infantil: aplicaciones clínicas. *Med Clin (Barc)* 1998; 111:389-97.
- Rubnitz JE, Crist WM. Molecular genetics of childhood cancer: Implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Pediatrics* 1997;100:101-8.
- Castaño L, Bilbao JR, Calvo B. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (3): Enzimas de restricción. Reacción en cadena de la polimerasa. Forma de estudio de mutaciones. *An Esp Pediatr* 1997;46:87-92.
- Harrison CJ. The management of patients with leukemia: The role of cytogenetics in this molecular area. *Br J Haematol* 2000;108:19-30.
- Crist WM, Carroll AJ, Shuster J, Jackson J, Head D, Borowitz M, et al. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukaemia: Clinical and cytogenetic characteristics and treatment outcome. A Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 1990;76:489-94.
- Forestier E, Johansson B, Gustafsson G, Borgstrom G, Kernstrup G, Johansson J, et al. Prognostic impact of karyotypic findings in childhood acute lymphoblastic leukemia: For the Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology (NOPHO) Leukemia Cytogenetic Study Group. *Br J Haematol* 2000;110:147-53.
- Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 2000;96:24-33.
- Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute leukemia. *Blood* 2000;96:2691-6.
- Bolufer P, Barragan E, Verdeguer A, Cervera J, Fernández JM, Moreno I, et al. Rapid quantitative detection of *TEL-AML1* fusion transcripts in pediatric acute lymphoblastic leukaemia by real-time reverse transcription polymerase chain reaction using fluorescently labelled probes. *Haematologica* 2002;87:23-32.
- Pui CH, Campana D. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 2000;14:783-5.
- Eckert C, Biondi A, Seeger K, Cazzaniga G, Hartmann R, Beyersmann B, et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2001;358:1239-41.
- Martínez-Climent JA, Lane N, Rubin CM, Morgan E, Johnstone HS, Mick R, et al. Clinical and prognostic significance of chromosomal abnormalities in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1995;9:95-101.
- Xiao Z, Greaves MF, Buffler P, Smith MT, Segal MR, Dicks BM, et al. Molecular characterization of genomic *AML1-ETO* fusions in childhood leukaemia. *Leukemia* 2001;15:1906-13.
- Diverio D, Rossi V, Avvisati G, De Santis S, Pistilli A, Pane F, et al. Early detection of relapse by prospective RT-PCR analysis of the *PML-RAR α* fusion gene in patients with acute promyelocytic leukaemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter "AIDA" trial. *Blood* 1998;92:784-9.
- Fernaux P, Chastang C, Cheveret S, Sanz M, Dombret H, Archimbaud E, et al. A randomized comparison of all transretinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. The European APL Group. *Blood* 1999;94:1192-200.
- Sandlund JT, Downing JR, Crist WM. Non-Hodgkin's lymphoma in childhood. *N Engl J Med* 1996;334:1238-48.
- Sherman CG, Zielenska M, Lorenzana AN, Pulford KA, Mason DY, Hutchinson RE, et al. Morphological and phenotypic features in pediatric large cell lymphoma and their correlation with *ALK* expression and the t(2;5)(p23;q35) translocation. *Pediatr Dev Pathol* 2001;4:129-37.
- Lorsbach RB, Shay-Seymore D, Moore J, Banks PM, Hasserjian RP, Sandlund JT, et al. Clinicopathologic analysis of follicular lymphoma occurring in children. *Blood* 2002;99:1959-64.
- Kushner BH, LaQuaglia MP, Cheung NK, Kramer K, Hamelin AC, Gerald WL, et al. Clinically critical impact of molecular genetic studies in pediatric solid tumors. *Med Pediatr Oncol* 1999;33:530-5.
- Davidoff AM, Hill DA. Molecular genetic aspects of solid tumors in childhood. *Semin Pediatr Surg* 2001;10:106-18.

24. Strother DR, Pollack IF, Fisher PG, Hunter JV, Woo SY, Pomeroy SL, et al. Tumors of the central nervous system. En: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and practice of Pediatric Oncology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002; p. 751-824.
25. Weiss WA. Genetics of brain tumors. *Curr Opin Pediatr* 2000;12: 543-8.
26. Pollack IA, Finkelstein SD, Woods J, Burnham J, Holmes EJ, Hamilton RL, et al. Expression of p53 and prognosis in children with malignant gliomas. *N Engl J Med* 2002;346:420-7.
27. Michiels EM, Weiss MM, Hoovers JM, Baak JP, Voute PA, Bass F, et al. Genetic alterations in childhood medulloblastoma analysed by comparative genomic hybridization. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:205-10.
28. Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturla LM, Angelo M, McLaughlin ME, et al. Prediction of nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 2002;415: 436-42.
29. López Andreu JA, Ferrís Tortajada J, Verdeguer Miralles A, Font de Mora Lleó C, Esquembre Menor C, Castel Sánchez V. Factores pronósticos del neuroblastoma. *An Esp Pediatr* 1994;41:309-14.
30. Tajiri T, Shono K, Tanaka S, Suita S. Evaluation of genetic heterogeneity in neuroblastoma. *Surgery* 2002;131(1 Suppl):283-7.
31. Caron H, Van Sluis P, De Kraker J, Bokkerink J, Egeler M, Laurey SG, et al. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 1996;334:225-30.
32. White PS, Thompson PM, Seifried BA, Sulman EP, Jensen SJ, Guo C, et al. Detailed molecular analysis of 1p36 in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:37-41.
33. McConville CM, Dyer S, Rees SA, Luttikhuis ME, McMullan DJ, Vickers SJ, et al. Molecular cytogenetic characterization of two non-*MYCN* amplified neuroblastoma cell lines with complex t(11;17). *Cancer Genet Cytogenet* 2001;130:133-40.
34. Stark B, Jeison M, Bar-Am I, Glaser-Gabay L, Mardoukh J, Luria D, et al. Distinct cytogenetic pathways of advanced-stage neuroblastoma tumors, detected by spectral karyotyping. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:313-24.
35. Cheung IY, Cheung NK. Detection of microscopic disease: Comparing histology, immunocytology, and RT-PCR of tyrosine hydroxylase, GAGE, and MAGE. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:210-2.
36. Burchill SA, Kinsey SE, Picton S, Roberts P, Pinkerton CR, Selby P, et al. Minimal residual disease at the time of peripheral blood stem cell harvest in patients with advanced neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:213-9.
37. Pagani A, Macri L, Faulkner LB, Tintori V, Paoli A, Garaventa A, et al. Detection procedures for neuroblastoma cells metastatic to blood and bone marrow: Blinded comparison of chromagranin A heminested reverse transcription polymerase chain reaction to tyrosine hydroxylase nested reverse transcription polymerase chain reaction and to anti-GD2 immunocytology. *Diagn Mol Pathol* 2002;11:98-106.
38. Sharpe CR, Franco EL. Etiology of Wilm's tumor. *Epidemiol Rev* 1995;17:415-32.
39. Barnoud R, Delattre O, Peoc'h M, Pasquier D, Plantaz D, Leroux D, et al. Desmoplastic small round cell tumor: RT-PCR análisis and immunohistochemical detection of the Wilm's tumor gene *WT1*. *Pathol Res Pract* 1998;194:693-700.
40. Gessler M, König A, Moore J, Qualman S, Arden K, Kavenee W, et al. Homozygous inactivation of *WT1* in Wilm's tumor associated with the WAGR syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 1993;7:131-6.
41. Vicanek C, Ferretti E, Goodyer C, Torban E, Moffett P, Pelletier J, et al. Regulation of renal EGF receptor expression in normal in Denys-Drash syndrome. *Kidney Int* 1997;52:614-9.
42. Coppes MJ, Haber DA, Grundy PE. Genetic events in the development of Wilm's tumor. *N Engl J Med* 1994;331:586-90.
43. Malik K, Yan P, Huang THM, Brown KW. Wilm's tumor: A paradigm for the new genetics. *Oncol Res* 2001;12:441-9.
44. Von Schweinitz D, Kraus JA, Albrecht S, Kock A, Fuchs J, Pietsch. Prognostic impact of molecular genetic alterations in hepatoblastoma. *Med Pediatr Oncol* 2002;38:104-8.
45. Udatsu y, Kusafuca T, Kuroda S, Miao J, Okada A. High frequency of beta-catenin mutations in hepatoblastoma. *Pediatr Surg Int* 2001;17:508-12.
46. Xia SJ, Pressey JG, Barr FG. Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Biol Ther* 2002;1:97-104.
47. De Zen L, Sommaggio A, d'Amore ES, Masiero L, di Montezemolo LC, Linari A, et al. Clinical relevance of DNA ploidy and proliferative activity in childhood rhabdomyosarcoma: A retrospective análisis of patines enrolled into the Italian Cooperative Rhabdomyosarcoma Study RMS88. *J Clin Oncol* 1997; 15:1198-205.
48. Gordon T, McManus A, Anderson J, Min T, Swasbury J, Pritchard-Jones K, et al. Cytogenetic abnormalities in 42 rhabdomyosarcoma: A United Kingdom cancer Cytogenetics Group Study. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:259-67.
49. Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, et al. *PAX3-FKHR* and *PAX7-FKHR* gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: A report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 2002;20: 2672-9.
50. De Álava E, Pardo J. Ewing tumor: Tumor biology and clinical applications. *Int J Surg Pathol* 2001;9:7-17.
51. Gururangan S, Marina NM, Luo X, Partham DM, Tzen CY, Greenwald CA, et al. Treatment of children with peripheral primitive neuroectodermal or extrasosseous Ewing's tumor with Ewing's-directed therapy. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998;20: 55-61.
52. Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJ, Prichard DJ, et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med* 2003;348:694-701.
53. Dagher R, Pham TA, Sorbara L, Kumar S, Long L, Bernstein D, et al. Molecular confirmation of Ewing sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001;23:221-4.
54. De Alava E, Kawai A, Healey JH, Fligman I, Meyers PA, Huvos AG, et al. *EWS-FLI1* fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 1998;16:1248-55.
55. Amir G, Issakov J, Meller I, Sucher E, Peysner A, Cohen IJ, et al. Expression of *p53* gene product and cell proliferation marker ki-67 in Ewing's sarcoma: Correlation with clinical outcome. *Hum Pathol* 2002;33:170-4.
56. Sierrasesúmaga L, Patiño A. Retinoblastoma. En: Madero López L, Muñoz Villa A, editores. Hematología y Oncología pediátricas. 1.ª ed. Madrid: Ergón, 1997;573-82.
57. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:820-3.
58. Stahl A, Levy N, Wadzynska T, Sussan JM, Jourdan-Fonta D, Saracco JB. The genetics of retinoblastoma. *Ann Genet* 1994;37: 172-8.
59. Zheng L, Lee WH. The retinoblastoma gene: A prototypic and multifunctional tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001;264:2-18.

60. Alonso J, García-Miguel P, Abelairas J, Mendiola M, Pestana A. A microsatellite fluorescent meted for linkage análisis in familial retinoblastoma and deletion detection at the *RB1* locus in retinoblastoma and osteosarcoma. *Diagn Mol Pathol* 2001;10:9-14.
61. Alonso J, García-Miguel P, Abelairas J, Mendiola M, Sarret E, Vendrell MT, et al. Spectrum of germline *RB1* gene mutations in spanish retinoblastoma patients: Phenotypic and molecular epidemiological implications. *Hum Mutat* 2001;17:412-22.
62. Triche TJ, Schofield D, Buckley J. DNA microarrays in pediatric cancer. *Cancer J* 2001;7:2-15.
63. Ramaswamy S, Golub TR. DNA microarrays in clinical oncology. *J Clin Oncol* 2002;20:1932-41.
64. Yeatman TJ. The future of clinical cancer management: One tumor, one chip. *Am Surg* 2003;69:41-4.
65. Rojas-Martínez A, Martínez-Dávila IA, Hernández-García A, Aguilar-Córdova E, Barrera-Saldaña HA. Terapia génica del cáncer. *Rev Invest Clin* 2002;54:57-67.
66. Chung RY, Chiocca EA. Gene therapy for tumors of the central nervous system. *Surg Oncol Clin North Am* 1998;7: 589-602.
67. Reiss U, Bolotin E. New approaches to hematopoietic cell transplantation in oncology. *Pediatr Clin North Am* 2002;49: 1437-66.