

**IVY ZORTÉA DA SILVA PARISE**

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS,  
HISTOPATOLÓGICOS E AMPLIFICAÇÃO DO  
ONCOGENE *MYCN* PARA O PROGNÓSTICO  
DE CRIANÇAS COM NEUROBLASTOMA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do **GRAU DE MESTRE**, do **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**, Departamento de Pediatria, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador:

**Prof. Dr. Bonald  
Cavalcante de Figueiredo**

Co-orientadora:

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Mara Albonei  
Dudeque Pianovski**

Co-orientadora:

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Luciane Regina  
Cavalli**

CURITIBA  
2005

Aos meus pais, Jailson e Marilu,  
pelo exemplo de vida,  
incentivo e amor.

Ao meu irmão Alan,  
pelo incentivo,  
amizade e carinho.

Ao meu marido Guilherme,  
pela paciência, compreensão,  
incentivo e amor.

**“Somente se compreende a vida como uma luta constante, onde a esperança do amanhã e a vontade de participar e realizar estejam presentes em cada gesto e atitude. Porque é o desafio que nos difere das demais espécies: a capacidade de pensar, realizar, guiar nosso futuro pelas nossas mãos”.**  
**(Autor desconhecido).**

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo pela orientação, amizade, paciência, atenção, compreensão e estímulo à pesquisa científica.

À professora Dra. Mara Albonei Dudeque Pianovski pela orientação, ensinamentos, incentivo, apoio, amizade e exemplo de dedicação.

À professora Dra. Luciane Regina Cavalli, pela orientação, paciência, dedicação, amizade e ensinamentos incluindo a receptividade, o carinho e a parte experimental deste trabalho na *Georgetown University, Washington, D.C.*

Aos meus queridos pais Jailson e Marilu, e meu irmão Alan, por todo apoio, carinho, compreensão, paciência, amor e incentivo.

Ao meu marido Guilherme, um agradecimento muito especial pelo incentivo, paciência, companheirismo, compreensão, carinho e amor.

Ao Dr. Ewerton Marques Maggio pela paciência, atenção, disponibilidade e revisão da análise histopatológica dos pacientes deste estudo.

Ao professor Dr. Bassem Haddad pelos ensinamentos, paciência e pela receptividade durante a parte experimental deste estudo no laboratório do *Institute for Molecular and Human Genetics da Georgetown University, Washington, D.C.*

À Janice Rone pela estadia em Washington, D.C., amizade, paciência e ensinamentos da técnica de FISH.

Ao professor Dr. Sérgio Ioshii pelo auxílio na análise histopatológica dos pacientes.

Ao professor Luis Gonzaga Caleffe, pela compreensão, paciência e análises estatísticas.

À secretária Clara Lara de Freitas por sua dedicação, paciência e disposição em nos ajudar sempre.

## **AGRADECIMENTOS**

À equipe de médicos do Serviço de Hematologia e Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFPR: Dras. Mara A. D. Pianovski, Carmem Mendonça Fiori, Marcela C. Barros, Érika Yamauchi e Dr. Lisandro L. Ribeiro pela colaboração e apoio, e as secretárias Luzia Garus e Luzia Santos pelo auxílio com os prontuários dos pacientes estudados.

À equipe médica de Hematologia e Oncologia do Hospital Pequeno Príncipe: Dras. Flora M. Watanabe, Ana Paula K. Pedro Bom, Edna K. Carboni e Dr. Guilherme A. Parise pela colaboração e apoio, em especial à secretária Maria Alice Kichel pelo auxílio com os prontuários das crianças estudadas.

Aos colegas da Oncologia Pediátrica do Hospital Erasto Gaertner: Dr. Dionísio Abrão, Dras. Mara A. D. Pianovski, Suely Z. Voss e Leniza C. Lima, pelo apoio e compreensão, em especial nos momentos em que necessitei estar ausente e a secretária Mara Regina da Silva pelo auxílio com os prontuários.

À toda equipe dos serviços de Anatomia Patológica dos Hospitais de Clínicas da UFPR, Erasto Gaertner e Pequeno Príncipe.

Aos meus colegas do CEGEMPAC, pelo ambiente sempre amigo e pelo estímulo e apoio de todos. Um agradecimento especial a Patrícia Zancanella pela colaboração na montagem de minha dissertação e ao José Renato S. Barbosa também pelo apoio, atenção e disponibilidade na parte experimental deste trabalho.

Aos colegas do Hospital Infantil Branca de Neve pela compreensão, amizade e apoio, em especial aos Drs. Carlos Morteau, Jaci Mara Marques, Eliane A. Rocha, Gilda Carvalho, Luciane Moraes, Karla Nakagawa, Margareth Gerber, Albino Biacchi Jr., Rita Pereira, Vilma Açuña e Eduardo Born, pela cobertura nos momentos em que precisei estar ausente.

Aos professores Dinarte José Giraldi e Leide Parolin Marinoni pelos ensinamentos e por nos transmitir suas experiências tão valiosas na arte de ensinar.

A Dra. Adelina E. Lehmkuhl e a bióloga Loraine B. A. Veiga pela colaboração na montagem da minha dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Um agradecimento muito especial aos meus avós (in memorian) Clemente e Valdomira Zortéa que sempre me apoiaram e incentivaram minha formação profissional.

Aos pacientes com neuroblastoma, que pelo sofrimento, esperança e coragem, despertaram em mim estímulos para o estudo de novas técnicas que possam trazer benefícios aos futuros pacientes.

**“Que nossos esforços  
desafiem as  
impossibilidades. Lembrai-  
vos  
de que as grandes proezas  
da História foram  
conquistadas do que parecia  
impossível.”**

**Charles Chaplin.**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 OBJETIVOS .....	3
1.1.2 Objetivo Geral .....	3
1.1.3 Objetivos Específicos .....	3
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
2.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA .....	4
2.2 ASPECTOS CLÍNICOS DO NEUROBLASTOMA .....	5
2.2.1 Estadiamento .....	7
2.3 PATOLOGIA .....	10
2.4 ETIOLOGIA .....	14
2.5 ASPECTOS GENÉTICOS DO NEUROBLASTOMA .....	15
2.5.1O Oncogene <i>MYCN</i> .....	17
2.5.2 Outras Alterações Genéticas .....	21
2.6 RECEPTORES NEUROTRÓFICOS .....	24
2.7 MARCADORES SÉRICOS .....	25
2.8 MARCADORES NEUROPEPTIDÉRGICOS .....	26
2.9 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-GENÉTICAS ASSOCIADAS AO PROGNÓSTICO .....	27
2.9.1 Tratamento .....	30
2.10 HIBRIDIZAÇÃO IN SITU POR FLUORESCÊNCIA (FISH) .....	38
2.10.1 Histórico e Princípios do Método .....	38
2.10.2 Aplicação do FISH na Detecção da Amplificação do Oncogene <i>MYCN</i> em Neuroblastomas .....	40
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
3.1 CASUÍSTICA .....	41
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO .....	43

3.2.1 Critérios de Inclusão dos Pacientes .....	43
3.2.2 Critérios de Exclusão dos Pacientes .....	43
3.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	43
3.3.1 Critério para Avaliação quanto a Classificação Patológica Internacional do Neuroblastoma .....	44
3.4 TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO IN SITU POR FLUORESCÊNCIA PARA O <i>MYCN</i> .....	44
3.4.1 Preparo das Amostras para o FISH .....	45
3.4.2 Preparo das Sondas e Hibridização .....	45
3.4.3 Análise e Interpretação dos Resultados de FISH .....	48
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	50
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
4.1 AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO ONCOGENE <i>MYCN</i> .....	51
4.2 COMPARAÇÃO ENTRE IDADE E SOBREVIDA DOS PACIENTES .....	52
4.3 COMPARAÇÃO ENTRE SOBREVIDA DOS PACIENTES E ESTADIAMENTO TUMORAL .....	53
4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE O ONCOGENE <i>MYCN</i> , PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS .....	54
4.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO TUMORAL NA ADRENAL, IDADE E ÓBITO .....	55
4.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO TUMORAL NA ADRENAL, IDADE, SEXO MASCULINO E ÓBITO .....	58
4.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE A INPC E ÓBITO .....	58
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>79</b>



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ESTADIAMENTO DO NEUROBLASTOMA.....	9
TABELA 2 - DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DO NEUROBLASTOMA PELA ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	12
TABELA 3 - GRUPOS DE PROGNÓSTICO CONFORME A CLASSIFICAÇÃO DE SHIMADA.....	13
TABELA 4 - CLASSIFICAÇÃO PATOLÓGICA INTERNACIONAL DO NEUROBLASTOMA (INPC).....	14
TABELA 5 - SUBDIVISÃO CLÍNICA DOS NEUROBLASTOMAS .....	30
TABELA 6 - DEFINIÇÕES PROPOSTAS DA RESPOSTA AO TRATAMENTO .....	31
TABELA 7 - PROPOSTA DOS GRUPOS DE RISCO DO NEUROBLASTOMA BASEADOS EM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS DO TUMOR.....	33
TABELA 8 - PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA.....	56

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MODELO HIPOTÉTICO DA ORIGEM GENÉTICA DO NEUROBLASTOMA .....	29
FIGURA 1 - MAPEAMENTO DO ONCOGENE <i>MYCN</i> NO CROMOSSOMO 2.....	48
FIGURA 2 - A - AUSÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO DO ONCOGENE <i>MYCN</i> B - AMPLIFICAÇÃO DO ONCOGENE <i>MYCN</i> .....	52
FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DE FAIXA ETÁRIA (CINZA) E SOBREVIVA (AZUL) .....	53
FIGURA 4 - SOBREVIVA DOS PACIENTES DE ACORDO COM OS ESTÁDIOS 3 E 4. ....	54

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABMT	- Transplante Autólogo de Medula Óssea
BNDF	- Fator Neurotrófico Derivado do Tecido Nervoso
CASP8	- Gene da Caspase 8
CCG	- <i>Children's Cancer Group</i>
COG	- <i>Children's Oncology Group</i>
dmin	- <i>Double Minutes</i>
CEPR	- Sondas Alfa Satélites ou Centroméricas
D	- Histologia Desfavorável
F	- Histologia Favorável
FISH	- Hibridização <i>In Situ</i> por Fluorescência
FITC	- Fluorocromo Isoticianato
INDC	- Sistema Internacional de Diagnóstico
INPC	- Classificação Patológica Internacional do Neuroblastoma
INSS	- Sistema Internacional de Estadiamento
HSR	- Região Homogeneamente Corada
LDH	- Desidrogenase Láctica
LN	- Linfonodo
LNH	- Linfoma não Hodgkin
MIBG	- Metaiodobenzilguanidina Radiomarcada
MKI	- Índice de Cariorréxis Mitótico
MO	- Medula Óssea
Mx	- Metástase
NA	- Não Aplicável
NB	- Neuroblastoma
NGF	- Receptores de Fatores Neurotróficos
NSE	- Enolase Neuro-específica
NT-3	- Neurotrofina-3
NT-4/5	- Neurotrofina 4/5
PCR	- Reação em Cadeia de Polimerase
PNET	- Tumor Primitivo de Células Neuroectodérmicas
RB	- Proteína do Retinoblastoma
POG	- <i>Pediatric Oncology Group</i>
QT	- Quimioterapia
RMS	- Rabdomiossarcoma
RT	- Radioterapia
SS	- Somatostatina
TRK-A	- Tirosina Quinase A
TRK-B	- Tirosina Quinase B
TRK-C	- Tirosina Quinase C
VIP	- Peptídeo Vasointestinal
VMA	- Ácido Homovanílico
HVA	- Ácido Vanilmandélico
WCPR	- Sondas de Pintura Cromossômica
n	- Número de Pacientes Incluídos em Cada Estudo

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	- Por cento
µg/ml	- Microgramas por mililitro
g	- Grama
mg/m <sup>2</sup>	- Miligramas por metro cuadrado
ml	- Mililitro
µl	- Microlitros
nm	- Nanômetro
ng/dL	- Nanogramas por decilitro
mg	- Miligramas
°C	- Graus Celsius

## RESUMO

O neuroblastoma é o segundo tumor sólido extracraniano mais comum em crianças abaixo de cinco anos de idade. Alguns tumores podem sofrer regressão espontânea, sem qualquer tratamento, especialmente em crianças menores de um ano de idade. Entretanto, a maioria das crianças apresenta estádios avançados, rápida progressão tumoral e diminuição da sobrevida. A amplificação do oncogene *MYCN* e a perda de ambos alelos de 1p36 (provável gene supressor tumoral) são os mais importantes marcadores moleculares relacionados com o pior prognóstico em crianças com neuroblastoma. O objetivo deste estudo foi identificar a amplificação do oncogene *MYCN* e outras características em 45 crianças (25 meninos e 20 meninas, variando de 1 mês a 13 anos de idade) com neuroblastoma atendidas em três hospitais de Curitiba, entre 1990 e 2000. A amplificação do oncogene *MYCN* foi verificada através da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). A maioria dos pacientes encontrava-se nos estádios 3 e 4 (36/45, 80%) e acima de 1 ano de idade (36/45, 80%) no momento do diagnóstico. A sobrevida observada nos estádios 1, 2, 3, 4, e 4S foi de 100% (2/2), 50% (3/6), 50% (8/16), 10% (2/20) e 0% (n=1), respectivamente. Comparações foram feitas para saber se tumor com amplificação do *MYCN* associado com outras características estaria relacionado com menor sobrevida. As características avaliadas foram sexo, idade, estadiamento, histopatologia, segundo os critérios da Classificação Internacional de Patologia do Neuroblastoma (INPC), grau de diferenciação neuroblástica (indiferenciado, pouco diferenciado e bem diferenciado), localização do neuroblastoma e resposta ao tratamento. Dezesesseis (43%) de 34 tumores com resultados de FISH apresentaram amplificação de *MYCN*, enquanto as demais 11 amostras de cortes de parafina não puderam ser avaliadas. A sobrevida foi inferior em meninos com *MYCN* amplificado (8%) do que em meninas com *MYCN* amplificado (60%) de acordo com o Teste para Diferença entre Proporções ( $p < 0,05$ ), mas não pelo Teste Exato de Fisher ( $p = 0,06$ ), provavelmente devido ao pequeno número de casos estudados. Entretanto, não se observou associação estatisticamente significativa entre *MYCN* amplificado com outras características em relação ao prognóstico. Devido à progressão da doença, foram a óbito mais crianças que tiveram tumor com histologia desfavorável baseado no INPC (80%) do que favorável (33%,  $p = 0,03$ , Teste Exato de Fisher). Pode-se concluir que a classificação histológica através do INPC é o parâmetro mais confiável para se prever o prognóstico. Ao contrário da maioria dos relatos, o diagnóstico numa parte do sul do Brasil é tardio (conforme se nota por meio dos estádios avançados e idade acima de 1 ano), provavelmente devido à baixa escolaridade da população e pelo atraso no encaminhamento para Oncologia Pediátrica. Sugerem-se outros estudos com uma maior casuística para confirmar estas conclusões.

Palavras-chave: neuroblastoma, *MYCN*, prognóstico

## ABSTRACT

Neuroblastoma is the second most common extracranial solid tumor in children below five years old. Some tumors undergo spontaneous regression without treatment specially in children younger than 1 year old. However, the majority of the patients present with advanced stage, rapid tumor progression and poor survival. *MYCN* amplification and loss of 1p36 alleles (probable tumor suppressor gene) are considered the most important molecular markers related to poor prognosis of neuroblastomas. The present study was designed to investigate amplification of the *MYCN* oncogene in neuroblastoma and other characteristics in 45 children (25 boys and 20 girls ranging from 1 month to 13 years old) admitted to 3 hospitals in Curitiba between 1990 and 2000. *MYCN* oncogene amplification was investigated through fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Most patients were diagnosed at stages 3 and 4 (36/45, 80%) and above 1 year old (36/45, 80%). Survival in stages 1, 2, 3, 4, and 4S were 100% (2/2), 50% (3/6), 50% (8/16), 10% (2/20) and 0% (n=1), respectively. Comparisons were made to find whether amplified *MYCN* associated with other characteristics would lead to reduced survival. The investigated features included gender, age, staging, histological criteria according to the International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC), grades of neuroblastic differentiation (undifferentiated, poorly differentiated and well differentiated), localization of neuroblastoma and treatment response. Sixteen (43%) out of 34 examined tumors by FISH presented amplified *MYCN* oncogene, while the remaining 11 specimens from paraffin-embedded sections were not possible to be analyzed. Survival was lower in boys with *MYCN* amplification (8%), compared to the group with amplified *MYCN* in females (60%) according to the Test for the Difference between Proportions ( $p < 0,05$ ) but did not turn out to be statistically significant by Fisher's Exact Test ( $p = 0,06$ ), probably due to reduced number of subjects. Other associations were made with *MYCN* status but none of them were related to poor prognosis. Most children with unfavorable histology (according to INPC) died (80%), while only 33% with favorable histology died ( $p = 0,03$ , Fisher's Exact Test) due to progression of disease. It can be concluded that histology evaluation through INPC is the most reliable predictor of prognosis. In contrast to other large series, neuroblastoma diagnosis in southern Brazil is delayed (as revealed by age and advanced stage), probably due to low level of education of the population and delay in referral to pediatric oncologists. Further studies are necessary to confirm these conclusions.

Key words: neuroblastoma, *MYCN*, prognosis

## 1 INTRODUÇÃO

O neuroblastoma é a quarta neoplasia mais comum em crianças e a mais comum em lactentes (BLATT; WHARTON, 1992), atingindo 8-10% de todas as doenças pediátricas malignas. É um dos tumores mais interessantes e também mais frustrantes da infância, pois pode apresentar regressão espontânea, maturar transformando-se em ganglioneuroblastoma benigno ou apresentar rápida progressão tumoral e não responder a qualquer tipo de tratamento levando ao óbito (BRODEUR, 1995). Aproximadamente metade das crianças com idade igual ou acima de um ano, apresentam estádios avançados com doença disseminada. Entretanto, nos lactentes, a evolução pode ser favorável mesmo com tumores metastáticos (LOOK et al., 1991). Este comportamento clínico distinto, dependente da idade, motivou vários estudos genéticos e biológicos do neuroblastoma (BRODEUR, 1995). CASTLEBERRY et al. (1997), implantaram a estratificação dos grupos de riscos do neuroblastoma, devido à heterogeneidade clínica e biológica, com a finalidade de melhorar o tratamento, submetendo-os a protocolos quimioterápicos de menos ou mais intensidade. Vários rearranjos cromossômicos têm sido identificados, incluindo a deleção de 1p e a amplificação do oncogene *MYCN*. A deleção de 1p36, suposta localização de gene supressor tumoral, é encontrada em 30% dos casos e está associada à evolução desfavorável (GODFRIED; VEENSTRA, 2002). O oncogene *MYCN* está localizado no cromossomo 2p24, e codifica fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação e desenvolvimento neuroectodérmico. Foi o primeiro marcador genético relacionado ao prognóstico e quando se encontra amplificado, em 25% dos neuroblastomas, está associado à agressividade tumoral e prognóstico desfavorável (SEEGER et al., 1985). Mesmo os lactentes com estágio 4S, onde geralmente a evolução é favorável, quando apresentam *MYCN* amplificado, devem ser tratados como grupo de alto risco (BRODEUR; MARIS, 2002).

As características histopatológicas e comportamento do tumor foram classificados em histologia favorável e desfavorável de acordo com o grau de diferenciação do neuroblastoma, conteúdo de estroma, índice de cariorréxis mitótico, e idade ao diagnóstico, critérios estes estabelecidos por SHIMADA et al. (1984) e modificados pela Classificação Internacional de Patologia do Neuroblastoma (INPC) em 1999, tendo sua importância confirmada e relacionada ao prognóstico (SHIMADA et al., 1999). Esta classificação associada à amplificação do oncogene *MYCN* tem sido utilizada na estratificação de grupos de risco relacionados ao prognóstico e tratamento dos neuroblastomas. Os pacientes com amplificação do *MYCN*, tanto com histologia favorável quanto desfavorável, apresentaram sobrevida de 37,5% e 15%, respectivamente (GOTO et al., 2001).

Nos centros de oncologia pediátrica do Brasil, poucos estudos genéticos são feitos para detectar a presença da amplificação do oncogene *MYCN*, principal marcador molecular na estratificação de grupos de riscos (baixo, intermediário e alto) do neuroblastoma. Este estudo foi o primeiro a reunir uma casuística das três instituições de referência em oncologia pediátrica do Paraná, sul do Brasil, para avaliar a presença da amplificação do oncogene *MYCN* através do método de FISH (hibridização *in situ* por fluorescência), associada a parâmetros clínicos e histopatológicos relacionados ao prognóstico destas crianças com neuroblastoma.



## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Verificar se existe correlação entre a amplificação do oncogene *MYCN* e o prognóstico de crianças com neuroblastoma.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

1. Identificar se o percentual de pacientes portadores de neuroblastoma com amplificação do *MYCN* (definido neste estudo como acima de 10 cópias do gene/núcleo interfásico) é semelhante ao da maioria dos estudos descritos na literatura;
2. Verificar se há correlação entre a amplificação do *MYCN* e os diversos parâmetros clínicos e histopatológicos, tais como idade, sexo, estadiamento, localização tumoral, radioterapia, classificação do neuroblastoma, tratamento pré e pós-quimioterapia, histologia favorável ou desfavorável;
3. Verificar qual dos parâmetros clínicos, histopatológicos e presença ou ausência de amplificação do *MYCN* se correlaciona com sobrevida ou óbito;
4. Avaliar se dois ou mais parâmetros associados à amplificação de *MYCN* podem ser mais preditivos de pior prognóstico;
5. Verificar se o estágio e a idade de diagnóstico em Curitiba correspondem aos relatos de outros países.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

O câncer na infância é raro, porém em países desenvolvidos é a segunda causa de morte em crianças menores de 15 anos de idade (CAMARGO; LOPES, 2000 e DESANDES et al., 2004). O neuroblastoma é o segundo tumor sólido extracraniano mais comum em crianças. Os Estados Unidos têm uma incidência anual de 8,3 a 10,4 casos por milhão de crianças até 15 anos de idade, correspondendo de 8 a 10% de todas as doenças malignas da infância, e uma prevalência de um caso para cada 7.000 a 8.000 nascidos vivos (RIES et al., 1999 e BRODEUR; MARIS, 2002).

No Brasil, embora as estatísticas das neoplasias infantis sejam pouco conhecidas, estas representaram a quinta causa de morte em crianças de 1 a 14 anos representando 4% dos óbitos, no ano de 1998 (Ministério da Saúde, DATASUS, 2000). O neuroblastoma foi primeiramente descrito por VIRCHOW<sup>1</sup>, em 1864 e assim denominado por WRIGHT<sup>2</sup>, em 1910, citados por EVANS (2000). BECWITH e PERRIN<sup>3</sup> (1963), citados por BRODEUR e MARIS (2002) relataram que nódulos neuroblásticos microscópicos lembravam “neuroblastoma *in situ*”, que foram encontrados em lactentes menores de 3 meses de idade que, no entanto, foram a óbito por outras causas. Isto foi interpretado como indicativo de que os neuroblastomas desenvolvem-se muito mais freqüentemente do que são detectados, geralmente entre a 17ª e 20ª semana de gestação, e que regredem espontaneamente na maioria dos casos. No entanto, os nódulos neuroblásticos representam remanescentes fetais normais do desenvolvimento da adrenal. Apesar disto, estes restos de células neuroblásticas podem vir a desenvolver posteriormente o neuroblastoma na adrenal.

---

<sup>1</sup> VIRCHOW. *Virchow's Arch*, el xxx, p. 553, 1905.

<sup>2</sup> WRIGHT, J. H. Neurocytoma or neuroblastoma, a kind of tumor not generally recognized. *J Exp Med*, v. 12, p. 556-561, 1910.

<sup>3</sup> BECWITH, J.; PERRIN, E. In situ neuroblastomas: a contribution to the natural history of neural crest tumors. *Am J Pathol*, v. 43, p. 1089-1104, 1963.

A faixa etária mais comum de ocorrência dos neuroblastomas é em crianças com idade inferior a um ano, sendo raro após os 5 anos de idade (ROSS; DAVIES, 1999). Noventa por cento de todos os casos acomete crianças menores de 10 anos de idade (WEISS et al., 1997) e em crianças abaixo dos 5 anos de idade é o tumor sólido mais comum (van NOESEL; VERSTEEG, 2004). Alguns estudos têm mostrado uma distribuição bimodal na idade: um pico ocorrendo antes de um ano de idade e um segundo pico entre 2 e 4 anos de idade. Esta observação sugere que, assim como o retinoblastoma, o neuroblastoma também pode apresentar predisposição genética (BRODEUR; MARIS, 2002). Observa-se um discreto predomínio no sexo masculino (1,1:1) (BRODEUR; MARIS, 2002) e nas crianças brancas (1,8:1) (ROSS; DAVIES, 1999).

Em alguns países, como Japão, Alemanha, Áustria e Canadá, visando a detecção precoce do neuroblastoma, foi implantado o *screening* neonatal, que proporcionou um aumento do diagnóstico dos neuroblastomas em crianças menores de um ano de idade, o que, entretanto, não afetou o diagnóstico e prognóstico das formas avançadas da doença, em nenhuma faixa etária.

A detecção laboratorial do neuroblastoma neste teste de triagem neonatal é realizada através da análise da síntese e excreção urinária das catecolaminas (ácido vanilmandélico-VMA e ácido homovanílico-HVA). O prognóstico é melhor quando a relação de excreção VMA/HVA é maior que um, encontrada em crianças abaixo de um ano de idade (BRODEUR; MARIS, 2002). O valor desses exames permanece incerto, visto que as crianças com tumores detectados através deste método são, em sua maioria, assintomáticas e apresentam prognóstico satisfatório. O efeito da triagem sobre a evolução da doença em pacientes com prognóstico reservado ainda não foi comprovado (SCHILLING et al., 2002).

## 2.2 ASPECTOS CLÍNICOS DO NEUROBLASTOMA

A localização dos tumores primários ao diagnóstico é variada, devido ao neuroblastoma surgir ao longo do sistema nervoso simpático. Entretanto, a mais freqüente, ocorrendo em 65% dos casos é o abdome. A freqüência de tumores adrenais é maior em crianças com idade superior a um ano (40%) do que em lactentes (25%), que apresentam um maior número de tumores torácicos e cervicais. Em aproximadamente 1% dos pacientes o tumor primário pode não ser encontrado (BRODEUR; MARIS, 2002).

As metástases ocorrem por disseminação hematogênica e/ou linfática. As metástases regionais para linfonodos ocorrem em 35% dos pacientes com tumores aparentemente localizados. A disseminação para outros sítios linfonodais fora da cavidade de origem é considerada doença disseminada. Entretanto, esses pacientes evoluem melhor se não tiverem outros sítios metastáticos. A disseminação hematogênica mais freqüente é para a medula óssea, ossos, fígado e pele, afetando raramente os pulmões e parênquima cerebral (BRODEUR; MARIS, 2002).

Muitos pacientes com neuroblastoma apresentam sintomas diretamente relacionados à localização do tumor ou das metástases. Aproximadamente um terço apresenta doença localizada e os outros dois terços apresentam metástases ao diagnóstico (SIMPSOM; GAZE, 1998).

O tumor abdominal resulta em dor, desconforto, sensação de plenitude e raramente obstrução. O exame físico revela massa abdominal endurecida e fixa, e dependendo do tamanho do tumor ou da metástase abdominal pode resultar em compressão da drenagem venosa e linfática nos membros inferiores e edema escrotal. O envolvimento maciço do fígado ocorre particularmente em lactentes com estágio 4S e pode resultar em comprometimento respiratório. Hipertensão, sudorese e taquicardia são incomuns (SIMPSOM; GAZE, 1998).

Aproximadamente metade dos neuroblastomas origina-se da medula da adrenal, 30% ocorrem em gânglios paravertebrais abdominais e pélvicos e 20% em gânglios paravertebrais do tórax (BRODEUR; MARIS, 2002).

Os tumores torácicos freqüentemente são diagnosticados quando é realizada radiografia torácica por trauma ou infecção. As massas cervicais ou torácicas estão associadas à síndrome de Horner, que consiste em ptose unilateral, miose, enoftalmia e anidrose. Ocasionalmente, grandes massas torácicas estão associadas a mecanismos obstrutivos podendo resultar na síndrome da veia cava superior (ortopnéia, cefaléia, edema facial, tontura ou síncope, alterações no turgor da pele e principalmente palidez súbita). Massas cervicais primárias de neuroblastoma metastático podem ser confundidas com infecção local. Tumores paraespinhais em regiões torácicas, abdominais e pélvicas podem estender-se para o forame neural dos corpos vertebrais e resultar em sintomas relacionados à compressão medular, como dor radicular, paraplegia aguda ou subaguda, bem como disfunção vesical e intestinal (CASTLEBERRY, 1997 e BRODEUR; MARIS, 2002).

Alguns sinais e sintomas do neuroblastoma metastático são típicos, como a proptose e equimose peri-orbitária que surge quando o tumor infiltra os ossos retro-orbitários (“olhos de guaxinim”); ou a dor óssea, quando há infiltração de medula óssea ou ossos, que podem levar a dificuldade de deambulação e irritabilidade em crianças pequenas. Sintomas como anemia, sangramento e aumento do risco de infecção ocorrem também quando há infiltração de medula óssea. O envolvimento da pele é quase exclusivo em lactentes com estágio 4S e é caracterizado por nódulos subcutâneos endurecidos, numerosos e azulados. Os sintomas como fadiga e febre estão presentes quando há metástases ósseas disseminadas (CASTLEBERRY, 1997 e SIMPSOM; GAZE, 1998).

Outras síndromes paraneoplásicas têm sido associadas a neuroblastomas localizados e disseminados. O opsomioclônus (movimento ocular irregular e abalos mioclônicos) ou ataxia cerebelar tem sido observado em 4% dos pacientes. Muitas crianças com esta síndrome têm prognóstico favorável, embora deva ser correlacionada com presença ou ausência da amplificação do oncogene *MYCN* (ver adiante). O uso de imunossupressores pode ser benéfico, associado à quimioterapia e ainda, a terapia com hormônios adrenocorticotróficos ou esteroidais, bem como a remoção cirúrgica do tumor, tem melhorado as seqüelas neurológicas (CASTLEBERRY, 1997).

Diarréia secretora intratável associada a hipocalcemia e desidratação é uma manifestação tumoral decorrente da secreção do VIP (peptídeo vasointestinal) e está associado à maturação histológica e prognóstico favorável (BRODEUR; MARIS, 2002).

### 2.2.1 Estadiamento

Segundo os critérios do INSS (*International Neuroblastoma Staging System*, Sistema Internacional de Estadiamento), os exames mínimos necessários para o estadiamento clínico do neuroblastoma, no que se refere à investigação do tumor primário são a tomografia axial computadorizada e/ou ressonância nuclear magnética (Tabela 1).

Para investigação de massa tumoral primária em tórax ou metástase pulmonar (menos freqüente) a radiografia ântero-posterior e lateral é necessária. A tomografia ou ressonância magnética de tórax poderá ser realizada quando a radiografia apresentar um achado positivo ou se a massa abdominal ou os linfonodos estenderem-se para o interior do tórax. Por outro lado, a tomografia ou a ressonância magnética abdominal é importante para avaliar, além do tumor primário, a infiltração metastática de linfonodos retroperitoneais, fígado e outras estruturas abdominais.

Segundo a Conferência Internacional de Estadiamento do Neuroblastoma, em 1991, para a avaliação de presença de metástases por infiltração hematogênica é necessária a biópsia de medula óssea (no mínimo 1cm de medula) e um aspirado de medula óssea de cada uma das cristas ilíacas posteriores (BRODEUR; MARIS, 2002).

Para a verificação de infiltração óssea pelas células do neuroblastoma recomenda-se radiografias ósseas do esqueleto ou cintilografia óssea com tecnécio 99 ou com MIBG (metaiodobenzilguanidina radiomarcada). Este é um método específico e sensível para diagnosticar o tumor primário e doença metastática a distância, pois permite a captação de células catecolaminérgicas incluindo a maioria das células dos neuroblastomas (CASTLEBERRY, 1997).

O envolvimento do fígado, difusamente ou com lesões focais, deve ser investigado através de biópsia, assim como outros sítios com suspeita de infiltração.

Em 1991, foi padronizado e uniformizado o estadiamento clínico dos pacientes com neuroblastoma, de acordo com o INSS (BRODEUR; MARIS, 2002). Este sistema pode ser observado na Tabela 1.

O objetivo dessas definições de estadiamento utilizando o INSS foi determinar o prognóstico nos subgrupos de pacientes com neuroblastoma avaliados pelo POG (*Pediatric Oncology Group*) e CCG (*Children's Cancer Group*). A distribuição dos pacientes de acordo com diferentes estádios depende da idade ao diagnóstico. A maioria dos pacientes com idade inferior a um ano apresenta tumor ressecável e doença não metastática, entretanto em quase 80% dos pacientes com diagnóstico realizado com idade superior a um ano apresentam estádios 3 e 4 e prognóstico desfavorável (ROSS; DAVIES, 1999). Estes apresentam comprometimento de linfonodos regionais ou metástases à distância e resistência a múltiplos agentes quimioterápicos (CAMARGO; LOPES, 2000).

O estágio 4S equivale ao IVS, originalmente descrito por D'ANGIO E EVANS<sup>4</sup>, em 1971, citado por KATZENSTEIN et al. (1998), significando “*special*” (especial) onde se concentram regressões espontâneas, sem qualquer tratamento, demonstradas em neuroblastomas. Nas crianças com idade inferior a um ano, essas regressões podem ocorrer rápida ou lentamente. A maioria dos tumores 4S tem hiperdiploidia e menos de 10% têm amplificação do *MYCN*. Geralmente estão associadas a um bom prognóstico, mesmo com metástases ao diagnóstico. Em contraste, a maioria dos lactentes com estágio 4 da doença é diplóide e a amplificação do *MYCN* ocorre em aproximadamente um terço dos casos. A infiltração de medula óssea no estágio 4S tem menos de 10% de células malignas nucleadas. Pacientes com maior infiltração medular são classificados como estágio 4.

TABELA 1 - ESTADIAMENTO DO NEUROBLASTOMA

Sistema Internacional de Estadiamento	
Estádio 1	Tumor localizado, confinado na área de origem, completamente ressecado, com ou sem restos microscópios, linfonodos ipsilaterais e contralaterais histologicamente negativos.
Estádio 2A	Tumor unilateral com ressecção incompleta, linfonodos ipsilaterais e contralaterais histologicamente negativos.
Estádio 2B	Tumor unilateral com ressecção completa ou incompleta, com linfonodos ipsilaterais positivos, linfonodos contralaterais histologicamente negativos.
Estádio 3	Tumor ultrapassando a linha média com ou sem linfonodos regionais, ou tumor unilateral com linfonodos contralaterais positivos, ou ainda tumor de linha média com linfonodos bilaterais positivos.
Estádio 4	Disseminação do tumor a linfonodos distantes, osso, medula óssea, ou outros órgãos.
Estadio 4S	Tumor primário como definido nos estádios 1 ou 2 com disseminação restrita ao fígado, pele e/ou medula óssea.

FONTE: BRODEUR, G.M.; MARIS, J.M. Neuroblastoma. In: PIZZO, P.A.; POPLACK, D.G. **Principles and practice of pediatric oncology**. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2002, p.909.

<sup>4</sup> D'ANGIO, G. M.; EVANS, A. E.; KNOOP, C. E. Special pattern of widespread neuroblastoma with a favorable prognosis. **Lancet**, v. 1, p. 1046-1049, 1971.

### 2.3 PATOLOGIA

O neuroblastoma surge a partir de células nervosas simpáticas, pluripotentes que são derivadas da crista neural. Estas células se diferenciam dentro do tecido normal do sistema nervoso simpático, como os gânglios simpáticos paraespinais e as células cromafins da adrenal. Estas são neuroendócrinas na origem e produzem hormônios relacionados ao *stress* como a norepinefrina e epinefrina. A medula adrenal fetal é constituída por células cromafins e por um aglomerado de células gangliônicas maduras. Ocorre um aumento significativo da quantidade de células cromafins da medula adrenal, após o nascimento, enquanto ocorre uma perda gradual das células gangliônicas. No sistema nervoso simpático ocorre o oposto. O neuroblastoma origina-se de ambas as células ou de precursores pluripotentes que podem conter propriedades de diferenciação neuronal e células cromafins (van NOESEL; VERSTEEG, 2004). As três classes histopatológicas relacionadas à diferenciação dos neuroblastos são o ganglioneuroma, o ganglioneuroblastoma e o neuroblastoma, refletindo um espectro de diferenciação morfológica e bioquímica.

O ganglioneuroma é um tumor benigno, completamente diferenciado e é composto por células ganglionares maduras, processos dendríticos periféricos e células de Schwan.

O ganglioneuroblastoma define um grupo heterogêneo de tumores com características histopatológicas com estágios de diferentes graus de maturação representados pelo neuroblastoma (células indiferenciadas) e ganglioneuroma (células diferenciadas). Alguns autores utilizam o termo “neuroblastoma em maturação” para os tumores que contém menos que 50% de gânglios maduros, ou em maturação, e ganglioneuroblastoma para os tumores com extensiva maturação. Este está associado a um comportamento menos agressivo. Múltiplas secções do tumor devem ser realizadas para se determinar o diagnóstico com segurança (BRODEUR; MARIS, 2002).



O neuroblastoma é uma das neoplasias de pequenas células, redondas e azuis da infância. As demais neoplasias deste grupo incluem o sarcoma de Ewing, os linfomas não Hodgkin, o tumor primitivo das células neuroectodérmicas (PNET) e o rabdomyosarcoma. O neuroblastoma típico é composto por células pequenas, densas, de tamanho uniforme contendo citoplasma escasso e núcleo hiper cromático. Ocasionalmente as células podem ser ovóides. A presença de processos neuríticos é uma característica patognomônica de todos os neuroblastomas primitivos (BRODEUR; MARIS, 2002). Os neuroblastos rodeando áreas dendríticas periféricas eosinofílicas podem formar rosetas, que contém material neurofibrilar, (SIMPSON; GAZE, 1998) e pseudo-rosetas de Homer-Wright, ambas são características do neuroblastoma, observadas em 15 a 50% dos casos. O diagnóstico do neuroblastoma é comumente realizado através da análise histopatológica e imunohistoquímica. A análise histopatológica, sob microscopia óptica, o diferencia de outros tumores de pequenas células. A microscopia eletrônica demonstra núcleo denso, membrana ligada a grânulos secretores, bem como microfilamentos e arranjos paralelos de microtúbulos dentro dos processos dendríticos periféricos, porém raramente usada com propósito diagnóstico (CASTLEBERRY, 1997).

Na imunohistoquímica utiliza-se um painel de anticorpos monoclonais para o reconhecimento de proteínas neurofilamentosas, sinaptofisina e NSE (enolase neuro-específica) para diferenciar o neuroblastoma dos outros tumores (BRODEUR; MARIS, 2002).

Embora a confirmação histopatológica não seja necessária em determinados casos, ela é importante para os estudos biológicos. Atualmente, estes fornecem informações importantes para definir o tratamento do paciente (SIMPSON; GAZE, 1998).

A Tabela 2 apresenta as características do diagnóstico diferencial do neuroblastoma através da análise imunohistoquímica.

TABELA 2 - DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DO NEUROBLASTOMA PELA ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

Anticorpos monoclonais	NB	LNH	Ewing	RMS	PNET
Neurofilamento	+	-	+/-	-	-
Sinaptofisina	+	-	-	-	-
ENE	+	-	.*	.*	+
Microglobulina b2	-	-	-	-	+
ACL (proteína T-200)	-	+	-	-	-
Vimentina	-	+/-	+	+	+
Mioglobina	-	-	-	+	-
Miosina	-	-	-	+	-
Actina	-	-	-	+	-
Desmina	-	-	-	+	-

FONTES: CASTLEBERRY, R.P. Biologia e tratamento do neuroblastoma. In: LINK, M.P. **Clínicas pediátricas da América do Norte**. Tradução: E.B. Cosendey e R.S.M. Gesteira. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997, p.929. Original: inglês.

NOTAS: \* As variantes extra-ósseas do sarcoma de Ewing e rhabdomyosarcoma poderão corar-se pela enolase neuro-específica (NSE)

NB, neuroblastoma; LNH, linfoma não Hodgkin; Ewing, sarcoma de Ewing; RMS, rhabdomyosarcoma; PNET, tumor primitivo de células neuro-ectodérmicas; ACL, antígeno comum leucocitário.

O *International Diagnostic Criteria* (INDC) permite determinar o diagnóstico do neuroblastoma sem a necessidade da realização de uma biópsia. Neste caso o diagnóstico pode ser feito através do aspirado de medula óssea quando esta está infiltrada por neuroblastos em estádios avançados. O aumento dos níveis de catecolaminas e metabólitos urinários (VMA ou HVA) ou séricos (dopamina ou noradrenalina) também auxiliam quando há dúvida no estabelecimento do diagnóstico. Além disso, marcadores genéticos, tais como grau de amplificação do oncogene *MYCN*, índice de DNA ou expressão aumentada do gene *NTRK1*, podem também ser utilizados para a definição do diagnóstico e prognóstico (BRODEUR; MARIS, 2002).

A classificação prognóstica do neuroblastoma foi desenvolvida por SHIMADA e colaboradores em 1984 (Tabela 3), baseada em características histopatológicas, considerando a idade do paciente e características histológicas, tais como a presença ou ausência do estroma Schwanniano, o grau de diferenciação e o MKI (número de células tumorais em mitose e em processo de ruptura nuclear mitótico).

TABELA 3 - GRUPOS DE PROGNÓSTICO CONFORME A CLASSIFICAÇÃO DE SHIMADA

Prognóstico	Histopatologia e idade
FAVORÁVEL	<p>Estroma rico, não nodular, todas as idades.</p> <p>Estroma pobre, em diferenciação, MKI&lt;100, idades: 1,5 - 5anos.</p> <p>Estroma pobre, MKI &lt;200, idade &lt; 1,5 ano.</p>
DESFAVORÁVEL	<p>Estroma rico, nodular, qualquer idade.</p> <p>Estroma pobre, idade &gt; 5 anos.</p> <p>Estroma pobre, indiferenciado, idades: 1,5 a 5 anos.</p> <p>Estroma pobre, em diferenciação, MKI&gt;100, idades: 1,5 - 5 anos.</p> <p>Estroma pobre, MKI&gt;200, idade &lt; 1,5 ano.</p>

FONTE: CASTLEBERRY, R.P. Biologia e tratamento do neuroblastoma. In: LINK, M.P. **Clínicas pediátricas da América do Norte**. Tradução: E.B. Cosendey e R.S.M. Gesteira. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997, p.930. Original: inglês.

NOTA: MKI, índice de cariorréxis mitótico.

Em 1999, SHIMADA, JOSHI e outros patologistas pediátricos desenvolveram a *International Neuroblastoma Pathology Classification* (INPC) (Tabela 4), que foi a melhor combinação entre estes dois sistemas. A classificação é baseada primeiramente no sistema de SHIMADA et al., de 1984, porém incorpora outras características, resultando num sistema unificado de uso comum pelos patologistas (SHIMADA et al., 1999).

TABELA 4 - CLASSIFICAÇÃO PATOLÓGICA INTERNACIONAL DO NEUROBLASTOMA (INPC)

Classificação Patológica Internacional do Neuroblastoma		Grupo prognóstico
Neuroblastoma	Estroma Schwanniano pobre	Favorável
<1,5 anos	Tumor bem diferenciado ou em diferenciação e MKI baixo ou intermediário	Favorável
1,5-5 anos	Tumor diferenciado e MKI baixo	Favorável
<1,5 anos	Tumor indiferenciado MKI alto	Desfavorável
1,5-5 anos	Tumor indiferenciado ou pobremente diferenciado e MKI intermediário ou alto	Desfavorável
5 anos	Todos os tumores	Desfavorável

FONTE: BRODEUR, G.M.; MARIS, J.M. Neuroblastoma. In: PIZZO, P.A.; POPLACK, D.G. **Principles and practice of pediatric oncology**. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2002, p.912.  
 NOTA: MKI, índice de cariorréxis mitótico.

## 2.4 ETIOLOGIA

Apesar da etiologia do neuroblastoma ainda ser desconhecida, sugere-se a influência de fatores genéticos e ambientais. Há poucos relatos deste tumor estar relacionado a fatores ambientais. No entanto, há descrições do uso materno de anticonvulsivantes, tais como a hidantoína e o fenobarbital, ou síndromes alcoólicas na gestação relacionadas ao aparecimento deste tumor em crianças após o nascimento (BRODEUR, 1998). Os fatores genéticos estão descritos a seguir.

## 2.5 ASPECTOS GENÉTICOS DO NEUROBLASTOMA

A maioria dos casos de neuroblastoma ocorre de forma esporádica, no entanto, 1 a 2% dos pacientes apresenta história familiar da doença. O neuroblastoma familiar é herdado de forma autossômica dominante com penetrância incompleta. As crianças afetadas destas famílias diferem das que apresentam a forma esporádica por apresentarem idade precoce (freqüentemente lactentes) e múltiplos tumores primários. KNUDSON e STRONG<sup>5</sup> (1972), citados por BRODEUR (1998), estimaram que mais de 22% dos neuroblastomas esporádicos poderiam resultar de mutação germinativa. De acordo com a hipótese de KNUDSON<sup>6</sup> (1971), citado por BRODEUR (1998), é necessário que duas mutações ocorram para que o câncer hereditário se desenvolva. Nos cânceres esporádicos (não hereditários), as duas mutações ocorrem em uma célula somática após o nascimento, causando a transformação maligna da célula e o conseqüente desenvolvimento do tumor. Nos cânceres hereditários, a primeira mutação é germinativa e é adquirida antes do nascimento, estando presente em todas as células do corpo; a transformação maligna ocorre a partir de uma segunda mutação em uma célula somática após o nascimento. Há relatos de neuroblastoma familiar, bem como bilateral ou multifocal, consistente com predisposição hereditária descrita por KUSHNER<sup>7</sup> et al. (1986), citado por BRODEUR e MARIS (2002). A heterogeneidade clínica do neuroblastoma familiar pode parcialmente explicar porque alguns tumores permanecem ocultos ou regredem e outros nunca são detectados.

A idade média do diagnóstico do neuroblastoma hereditário é de nove meses, que contrasta com os 22 meses da população geral (o neuroblastoma esporádico) (ROSS; DAVIES, 1999). A presença deste tumor em gêmeos monozigóticos sugere também fatores hereditários. Há, no entanto, poucos relatos entre síndromes genéticas ou associação de anomalias congênitas com o neuroblastoma (BRODEUR, 1998).

---

<sup>5</sup> KNUDSON, A. G. J.; STRONG, L. C. Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. **Am J Hum Genet**, v. 24, p. 514, 1972.

<sup>6</sup> KNUDSON, A. G. J. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Nat Acad Sci**, v. 68, p. 8820, 1971.

<sup>7</sup> KUSHNER, B. H.; GILBERT, F.; HELSON, L. Familial neuroblastoma: case reports, literature review, and etiologic considerations. **Cancer**, v. 57, p. 1887, 1986.

Muitos estudos sugerem que o gene do neuroblastoma hereditário esteja localizado no braço curto do cromossomo 1, entretanto um recente estudo propôs que a predisposição genética do neuroblastoma hereditário está localizada no braço curto do cromossomo 16 (BRODEUR; MARIS, 2002).

Nas últimas décadas, um progresso considerável ocorreu em relação à pesquisa da biologia molecular do neuroblastoma. Estes estudos têm contribuído para o entendimento dos mecanismos de transformação e progressão maligna e na identificação de genes e proteínas envolvidas na gênese ou progressão destes tumores. Isto tem sido importante para aperfeiçoar o diagnóstico e a subclassificação tumoral, definindo o comportamento clínico do neuroblastoma em relação à evolução da doença (van NOESEL; VERSTEEG, 2004).

A aneuploidia (ganhos ou perdas de um ou mais cromossomos do genoma) é uma forma de instabilidade genética freqüentemente observada nos neuroblastomas (van NOESEL; VERSTEEG, 2004).

O conteúdo de DNA é subdividido em 2 tipos principais: os diplóides (cerca de 45% de todos os tumores) e os triplóides (55% dos restantes). A maioria dos tumores que apresentam regressão e amadurecimento espontâneo está no grupo dos triplóides. Provavelmente nos lactentes, o ganho cromossômico é total, sem rearranjos estruturais, enquanto estes rearranjos geralmente estão presentes em crianças maiores de dois anos de idade. Porém esses ganhos cromossômicos devem ser avaliados em conjunto com as demais alterações genéticas (BRODEUR; MARIS, 2002).

Os tumores quase-diplóides e quase-tetraplóides são usualmente encontrados em pacientes com mais de um ano de idade e associados a anormalidades estruturais envolvendo as perdas alélicas no cromossomo 1p, amplificação do *MYCN*, agressividade tumoral e prognóstico desfavorável (van NOESEL; VERSTEEG, 2004).

Uma das mais importantes alterações genéticas no neuroblastoma é a amplificação do oncogene *MYCN*.

### 2.5.1 O Oncogene *MYCN*

O *MYCN* é um proto-oncogene da família *MYC*, identificado em 1983 por SCHWAB e colaboradores, localizado no braço curto do cromossomo 2 (2p23-24) (SCHWAB, 2003). Este gene codifica fosfoproteínas nucleares que atuam como fatores de transcrição. Foi o primeiro oncogene amplificado descrito em neuroblastomas (SEEGER et al., 1985) e apresenta um significado clínico importante, devido à associação com fenótipos tumorais agressivos (SCHWAB, 2003). Este gene tem uma importante função reguladora durante o desenvolvimento e diferenciação neuroectodérmica (SHAPIRO et al., 1993 e SARTELET et al., 2002). O *MYCN* foi identificado como gene homólogo do *C-MYC* e sua expressão aumentada foi primeiramente observada em neuroblastomas por SCHWAB em 1983 (van NOESEL; VERSTEEG, 2004).

A família dos oncogenes *MYC* é constituída pelos genes *MYCN*, o *C-MYC* e o *L-MYC*, relacionados com neuroblastoma, linfoma de Burkitt e câncer de pulmão de pequenas células, respectivamente (ZAJAC-KAYE, 2001). Estes genes codificam um grupo de fosfoproteínas nucleares importantes no controle dos processos celulares e apoptose. Quando ocorre a perda da regulação destas proteínas, estas podem estar envolvidas profundamente com o desenvolvimento de tumores humanos (EISENMAN, 2001). Estes genes podem sofrer rearranjos, mutação, amplificação e/ou superexpressão em muitos tipos de tumores (BOON et al., 2001).

O gene *MYC* tem sido proposto como tendo um papel importante no controle do crescimento e na progressão do ciclo celular, inibindo e regulando a expressão de proteínas chaves do ciclo celular. A progressão do ciclo celular da fase G1/S é regulada pela via da proteína do retinoblastoma (RB), que inclui as ciclinas D e E, as quinases dependente de ciclinas (CDK 2, 4 e 6), CDK inibidores (CKIs, p15 Ink4b, p16 Ink4a, p21 Waf1 e p27 Kip1) e proteínas RB ligantes, incluindo a família do fator de transcrição E2F. Esta via parece regular a progressão do ciclo celular e previne o crescimento neoplásico. Em todas as células eucariontes, a fosforilação mediada por ciclina, libera E2F-1, que atua na transativação gênica, induzindo a síntese de DNA. A expressão do *MYC* modula os níveis fisiológicos da p27Kip1 e controla a progressão G1 pela supressão da função inibidora do crescimento do p27Kip e então, ativando os complexos ciclina D e E. A expressão aumentada do *MYC* resulta na inativação da RB através da fosforilação, liberando o E2F e permitindo a progressão da fase G1 para S. Além disso, o *MYC* induz a atividade de E2F, resultando em ativação transcricional das enzimas que sintetizam o DNA (ZAJAC-KAYE, 2001).

Alterações em qualquer componente da via do ciclo celular, como mutação ou deleção do gene *TP16*, amplificação ou expressão aumentada dos CDKs ou das ciclinas D e mutações dos CDKs que afetam a ligação com a proteína p16, resultam em fosforilação da RB e subsequente progressão da fase G1 para S. Do mesmo modo, alterações na RB também levam a transição G1-S. Estas alterações têm sido freqüentemente encontradas em vários tumores humanos sugerindo que a inativação da via p16-CDK/ciclinaD-RB pode ser uma via importante na patogênese destes tumores (ZAJAC-KAYE, 2001). OMURA-MINAMISAWA et al. (2001), demonstraram que a proteína p16 pode não ser regulada exclusivamente pela transcrição do gene *TP16*, podendo ser induzida independente do mecanismo da proteína RB, em contraste com o mecanismo RB/p16 que é relatado em outros cânceres. Estes autores observaram expressão aumentada desta proteína em tumores associados a um prognóstico desfavorável, sugerindo que o aumento da expressão da p16 está associado à agressividade das células do neuroblastoma.

Embora os componentes das vias da RB, isto é, as ciclinas, CDK e CDKI, sejam alvos moleculares lógicos para o desenvolvimento de inibidores específicos da transição de G1-S, estudos recentes apontaram o oncogene *MYC* como outro importante alvo molecular potencial do desenvolvimento de muitas drogas que podem ser especificamente reguladas pelo *MYC* na atividade celular do câncer (ZAJAC-KAYE, 2001).

Enquanto a ativação dos oncogenes *MYC* não tem mostrado associação com um tipo particular de câncer, danos genéticos envolvendo o *MYCN* têm alta preferência por tumores de derivação neuro-ectodérmica (SCHWAB, 2003 e ZAJAC-KAYE, 2001) e tecidos embrionários (BOON et al., 2001).

A amplificação do oncogene *MYCN* é a alteração genética mais comum que ocorre nos neuroblastomas, sendo detectada em 25 a 30% dos tumores primários (GODFRIED et al., 2002 e VALENT et al., 2002).

Apesar da amplificação do *MYCN* ser encontrada com muita freqüência nos neuroblastomas, ela não é específica para estes tumores, podendo também ser encontrada com baixa incidência no câncer de pulmão de pequenas células, retinoblastomas, gliomas malignos e PNETs (tumor primitivo de células neuroectodérmicas).



Os níveis de amplificação no neuroblastoma são em média superiores a 500 vezes, embora os valores são geralmente entre 50 a 100 vezes. A amplificação não representa necessariamente simples cópias do *MYCN*, mas pode conter uma a quatro cópias extras do gene relativa ao número do cromossomo 2 e do grau de ploidia do tumor. Este ganho é específico e não é devido ao simples aumento da ploidia.

Há 3 possibilidades nas quais as células tumorais ganham pequenos números adicionais de cópias. Uma delas é por acúmulo de cópias no braço curto do cromossomo 2 ou devido à formação de um isocromossomo 2p. Outra é a duplicação do *MYCN in situ* no 2p24, como demonstrado por FISH (hibridização *in situ* por fluorescência) em 2 linhagens celulares de neuroblastoma (VALENT et al., 2002). A terceira possibilidade é uma translocação não balanceada da porção distal do braço curto do cromossomo 2 para vários cromossomos, como previamente detectados em 5 linhagens celulares sem amplificação do *MYCN* (VALENT et al., 2002). A amplificação corresponde, na citogenética, aos corpos cromatínicos “*double minutes*” (dmin) e as regiões homoganeamente coradas (HSRs) que contém 50 a 500 cópias do gene *MYCN* (SCHWAB, 2003 e van NOESEL; VERSTEEG, 2004). Nos “*double minutes*”, estruturas acêntricas, a duplicação das cromátides é extracromossômica e são observadas em 30% dos neuroblastomas que apresentam amplificação deste gene. Na região homoganeamente corada (HSR) as sequências de amplificações ocorrem dentro do cromossomo (SHAPIRO et al., 1993 e VALENT et al., 2001).

O *MYCN*, muitas vezes, pode estar duplicado no 2p24, porém não amplificado. Não está claro se a duplicação representa o prelúdio para a amplificação ou uma via alternativa para ativação do potencial oncogênico do *MYCN*. O tamanho do DNA do *MYCN* pode possibilitar a coamplificação de genes adicionais como o *DDX1*, localizado em 2p24-25, que tem sido co-amplificado nos retinoblastomas e neuroblastomas. Porém, ele só está amplificado em células com *MYCN* amplificado, sugerindo uma responsividade funcional para manutenção da amplificação do DNA no 2p24. Outro gene *NAG* (*neuroblastoma amplified gene*), localizado em 2p24, também tem sido encontrado co-amplificado ao *MYCN* (SCOTT, et al., 2003 e WEBER et al., 2004). A co-amplificação de ambos está correlacionada a desregulação da expressão de RNAm do oncogene *MYCN*. WEBER e colaboradores, em 2004, demonstraram que a co-amplificação de *DDX1* está relacionada com melhora na sobrevida em pacientes com neuroblastoma com *MYCN* amplificado.

Estudos de sequenciamento da região do gene *MYCN* não tem revelado mutações na sequência codificante deste gene. Estudos sugerem que as cópias da amplificação são transcricionalmente ativas, o que poderia explicar o aumento do nível do RNAm do *MYCN* nas células portadoras de *MYCN* amplificado em células de neuroblastomas, retinoblastomas e câncer de pulmão de pequenas células. O aumento de RNAm nem sempre é proporcional ao número de cópias do gene (SCHWAB, 2003).

SEEGER et al. (1985), foram os primeiros a demonstrar que a amplificação do *MYCN* está associada a um prognóstico desfavorável. Ela está intimamente relacionada a um comportamento mais agressivo do neuroblastoma com rápida progressão tumoral e má resposta ao tratamento, independente da idade e estágio da doença (SEEGER et al., 1985; YOSHIMOTO et al., 1999; VALENT et al., 2002 e TANAKA et al., 2004).

A amplificação do oncogene *MYCN*, na maioria das vezes, ocorre concomitante com a expressão aumentada da proteína MYCN. Entretanto, CHAN et al. (1997), encontraram expressão aumentada da proteína MYCN em estádios 3, 4 e 4S sem amplificação do gene *MYCN*. A expressão aumentada da proteína MYCN também está relacionada a um prognóstico desfavorável. A proteína MYCN pode também mediar a transcrição de outros genes que regulam a resposta à quimioterapia, como por exemplo, a glicoproteína P e o gene *MRP* (SIMPSON; GAZE, 1998). Ambos os genes, a glicoproteína P e o gene *MRP*, co-expressam com o *MYCN* no neuroblastoma, mas ainda não é conhecido se eles afetam o prognóstico isoladamente (CHAN et al., 1997).

A expressão aumentada do oncogene *MYCN*, sem a presença de amplificação gênica é uma característica normal das células de vários tecidos como retina, rim e células do tecido embrionário de mamíferos. A expressão protéica aumentada, equivalente ao que ocorre nas células do neuroblastoma (amplificação gênica de até 150 vezes) é também encontrada no cérebro humano fetal. A expressão do *MYCN* sem amplificação é provavelmente, na maioria dos casos, uma característica normal de células indiferenciadas (SCHWAB, 2003) A maioria dos protocolos de tratamento requer o exame da amplificação do *MYCN* antes deste ser iniciado nos pacientes com neuroblastoma (YOSHIMOTO et al., 1999).

### 2.5.2 Outras Alterações Genéticas

Deleções no braço curto do cromossomo 1 estão entre as anomalias citogenéticas mais comuns no neuroblastoma, sendo associadas a um pior prognóstico, independente da idade e do estadiamento tumoral (CARON et al., 1996). Estas deleções são encontradas em 70 a 80% de neuroblastomas que apresentam o cariótipo quase-diplóide. Os pontos de quebra são variáveis, porém a deleção em 1p36 ocorre com maior frequência, com perda de heterozigose (LOH) nesta região em 35% dos casos dos tumores primários (BRODEUR; MARIS, 2002). A perda deste material cromossômico em 1p está associada frequentemente com a translocação não balanceada com o braço longo do cromossomo 17 (van NOESEL; VERSTEEG, 2004).

O ganho não balanceado na região distal do braço longo do cromossomo 17 talvez seja a anormalidade genética mais comum em neuroblastomas primários, ocorrendo entre 63 a 83% dos casos (BOWN et al., 1999). Esta alteração tem sido observada em casos tumorais com amplificação do oncogene *MYCN*, sendo associada a um prognóstico adverso (BRODEUR; MARIS, 2002). Frequentemente ocorre, além do envolvimento da região 1p nestas translocações não balanceadas, o envolvimento do cromossomo 11q. Os pontos de quebra neste cromossomo são variáveis, e eles também estão envolvidos com progressão tumoral (van NOESEL; VERSTEEG, 2004).

O ganho em 17q é também comum em pacientes com estádios 3 e 4 (BRODEUR; MARIS, 2002 e van NOESEL; VERSTEEG, 2004).

Alguns estudos sugerem que o gene de supressão tumoral do neuroblastoma esteja localizado no cromossomo 11. Tem sido observada uma série de anormalidades cromossômicas estruturais envolvendo este cromossomo, tais como: translocações cromossômicas balanceadas envolvendo 11q21 e 11q22, deleção em 11q23, inversão em 11q21-q23 e mais frequentemente, perda alélica em 11q. Esta última tem sido relatada em 15 a 44% dos neuroblastomas (SPITZ et al., 2003), ocorrendo em aproximadamente um terço dos tumores primários.

GUO et al. (1999), mapearam uma região comum de deleção em 11q23, indicando esta como provavelmente, a que contém o gene de supressão tumoral do neuroblastoma. Em contraste com a perda de heterozigose em 1p, a perda de heterozigose em 11q se correlaciona inversamente com amplificação do oncogene *MYCN*, porém a deleção em 11q também indica um prognóstico desfavorável.

MARIS et al. (2001), confirmaram esta observação relatando uma região comum de deleção em 11q14-23 na análise de 129 neuroblastomas.

Em 11q13 localiza-se o gene *GST-P1*, que está envolvido no prognóstico do neuroblastoma e relacionado à resistência a múltiplas drogas quimioterápicas, principalmente à cisplatina (CAPPELLEN; BERNARD, 1997 e CULLEN et al., 2003). Devido à cisplatina ser uma droga comumente usada no tratamento deste tumor, entender o mecanismo molecular que leva a resistência é fundamental para a intervenção terapêutica.

A expressão do oncogene *HRAS*, localizado no cromossomo 11p15, está relacionada a estádios tumorais iniciais em diferentes tipos de câncer, porém raramente encontra-se mutado nos neuroblastomas. No entanto, nos casos onde ocorre expressão aumentada deste gene, há uma associação com melhor prognóstico nos neuroblastomas (BRODEUR; MARIS, 2002). O oncogene *HRAS* está fortemente relacionado com expressão aumentada do gene *NTRK1*. A concomitante expressão aumentada de ambos os genes pode induzir a morte celular, independentemente das caspases em linhagens celulares do neuroblastoma, podendo apresentar um papel intrigante no processo de regressão espontânea destes tumores (van NOESEL; VERSTEEG, 2004).

A deleção do braço longo do cromossomo 14 é também uma anormalidade comum nos neuroblastomas. A perda de heterozigose em 14q foi diretamente correlacionada a perdas alélicas em 11q e inversamente correlacionada com a deleção em 1p36 e amplificação do *MYCN* (BRODEUR; MARIS, 2002). Há estudos que sugerem que poderia haver mais de uma região de perda alélica na região 14q, havendo a presença de um gene supressor de tumor nesta região cromossômica (van NOESEL; VERSTEEG, 2004).

Outras deleções observadas nos neuroblastomas, porém com menor frequência, envolve as regiões cromossômicas 2p, 3p, 4p, 7q, 9p, 18q e 19q (BRODEUR; MARIS, 2002). A perda de 2q33 está associada com baixa expressão do gene da caspase 8. Quinze a 16% das deleções de 3p (SPITZ et al., 2003) e 14q estão associados à perda de 11q e ausência de amplificação do oncogene *MYCN* (van NOESEL; VERSTEEG, 2004).

Outros genes envolvidos no prognóstico do neuroblastoma são aqueles que conferem resistência simultânea a múltiplos agentes quimioterápicos tais como o *MDR1* e *MRP*. A resistência aos quimioterápicos está relacionada aos pacientes com amplificação do *MYCN* (BRODEUR; 1995). No entanto, NORRIS et al. (1996) encontraram uma associação entre altos níveis de *MRP* (*multidrug-resistance-associated protein*) e prognóstico desfavorável, independentemente da amplificação do *MYCN*.

A expressão da glicoproteína CD44 foi observada com relação inversa a amplificação do *MYCN*, sendo associada a neuroblastomas de melhor prognóstico. Ela está correlacionada com expressão aumentada do gene *NTRK1*, principalmente em pacientes com estágio 4S. Em pacientes com estágio 4 e amplificação do oncogene *MYCN*, não foi observada expressão aumentada da proteína CD44 (KRAMER et al., 1997).

Outras alterações genéticas presentes no neuroblastoma podem incluir o gene da caspase 8 (*CASP8*) e  $p75^{NTR}$  que influenciam na apoptose das células do neuroblastoma (van NOESEL; VERSTEEG, 2004); o gene *SRC* que interfere na transdução dos receptores de fatores neurotróficos (NGF) e na diferenciação neuronal deste tumor (MATSUGANA et al., 2000).

A expressão aumentada da telomerase concomitante com a amplificação do oncogene *MYCN* foi observada associada a um prognóstico desfavorável, diminuindo a sobrevida dos pacientes com neuroblastomas, mesmo naqueles com estágio 4S (HIYAMA et al., 1999).

Alterações no gene supressor tumoral *TP53* têm sido avaliadas em pacientes com amplificação do *MYCN*, no entanto esta associação é rara (BRODEUR; MARIS, 2002). Há estudos, em linhagens celulares de neuroblastomas, sugerindo que a inativação da proteína p53 pode estar relacionada à resistência a drogas quimioterápicos (TWEDDLE et al., 2003).

## 2.6 RECEPTORES NEUOTRÓFICOS

Os fatores responsáveis pela regulação da diferenciação normal dos neuroblastos em neuroblastomas, ganglioneuroblastomas e ganglioneuromas ainda não são bem entendidos, porém eles provavelmente envolvem um ou vários receptores de neurotrofinas que sinalizam a diferenciação celular. Uma das vias importantes para esta sinalização parece envolver o NGF (*nerve growth factor*) e seu receptor (BRODEUR; MARIS, 2002). De fato, esta via é representativa das neurotrofinas homólogas e receptores que podem atuar na regulação da sobrevivência, crescimento e diferenciação dos neuroblastos simpáticos. Estes fatores e receptores neurotróficos têm sido descritos e podem conduzir a uma melhor classificação e tratamento do neuroblastoma, induzindo a diferenciação celular e regressão tumoral.

Foi postulado o envolvimento dos receptores neurotróficos, presentes nas células de Schwann na expressão gênica. Entretanto, o papel do receptor de NGF na via da patogênese do neuroblastoma ainda não está claro (BRODEUR; MARIS, 2002).

Os membros da família homóloga das neurotrofinas incluem BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), NT-3 (neurotrofina-3) e NT 4/5 (neurotrofina 4/5). Recentemente, três genes, receptores de tirosina quinase (*TRK*), associados a estes fatores neurotróficos foram clonados e suas principais associações aos fatores neurotróficos foram identificadas: gene *NTRK1* associado ao NGF, *NTRK2* associado ao BDNF e *NTRK3* associado ao NT-3.

Todos os tumores com estádios limitados e ausência da amplificação do *MYCN* revelam expressão aumentada do gene *NTRK1*. Este foi associado a um comportamento clínico e biológico favorável num grupo de pacientes com neuroblastoma menores que um ano de idade ou nos estádios 1, 2 e 4S. A via NGF/*NTRK1* poderia explicar a propensão de alguns neuroblastomas se diferenciarem e regredirem espontaneamente (NAKAGAWARA et al., 1992).

Na ausência do NGF a expressão do *NTRK1* leva a apoptose. As células de Schwann que podem fazer parte da constituição do estroma dos neuroblastos são conhecidas como originários da produção do NGF. O aumento dos componentes estromais no neuroblastoma está associado a um melhor prognóstico e diferenciação celular. No entanto, a ausência de NGF pode levar a um aumento na apoptose dos gânglios e tumores, expressando o *NTRK1*, e também pode levar a regressão dos neuroblastomas, principalmente vista em lactentes (van NOESEL; VERSTEEG, 2004).

As expressões elevadas do *NTRK2* associam-se a neoplasias de péssimo prognóstico e amplificação do oncogene *MYCN*. Ele está expresso em um terço dos neuroblastomas e em dois terços, quando ligado ao fator BDNF. A forma truncada de *NTRK2*, onde foi perdido o domínio da tirosina quinase, está expressa em tumores mais diferenciados, como os ganglioneuroblastomas e ganglioneuromas. A via *NTRK2*/BDNF pode servir como via autócrina ou parácrina e, quando em crianças com neuroblastoma que apresentam o oncogene *MYCN* amplificado, podendo aumentar a sobrevida destes pacientes. (NAKAGAWARA, 2001).

O gene *NTRK3* apresenta expressão similar ao *NTRK1* e está relacionado a um bom prognóstico. Foi encontrado com expressão aumentada em 25% dos neuroblastomas testados (NAKAGAWARA, 1992).

Devido à observação de que todos os tumores que apresentam expressão aumentada de *NTRK3* apresentarem expressão aumentada de *NTRK1*, não há significância adicional ao prognóstico pelo primeiro. Entretanto, eles podem representar uma via alternativa para a diferenciação destes tumores (BRODEUR; MARIS, 2002).

## 2.7 MARCADORES SÉRICOS

Os marcadores séricos importantes no acompanhamento terapêutico e preditivos de resposta ao tratamento do neuroblastoma são a ferritina, a desidrogenase láctica (LDH), a enolase neuro-específica (NSE) e disialogangliosídeo GD2. Embora estes marcadores tenham valor prognóstico, comparados aos marcadores moleculares, eles não interferem na estratificação dos riscos dos subgrupos dos pacientes com neuroblastomas (BRODEUR; MARIS, 2002).

A ferritina está elevada naqueles pacientes com crescimento tumoral em atividade (BRODEUR; MARIS, 2002). Há estudos que sugerem que as células tumorais produzam ferritina e esta potencializa o crescimento das células do neuroblastoma (BLATT; WHARTON, 1992).

O ferro sérico também pode ser importante para este crescimento celular, encontrando-se elevado principalmente em estádios avançados (3 e 4) da doença. O ferro é um componente essencial para o crescimento e replicação celular (RICHARDSON; PONKA, 1994).

A desidrogenase láctica tem sido proposta como um marcador de prognóstico do neuroblastoma, embora não seja específica. O rápido aumento de seus níveis, superiores a 1500UI/L ou 1,6 vezes o limite superior da normalidade, pode refletir em progressão ou atividade tumoral da doença (BRODEUR; MARIS, 2002).

A enolase neuro-específica (NSE) é uma proteína citoplasmática com atividade enolase que está associada às células neurais. No neuroblastoma, quando a NSE está elevada, há indicação de sobrevida nos pacientes com doença avançada. Esta proteína não é específica do neuroblastoma, podendo ser também encontrada com níveis alterados em outros tumores pediátricos (BRODEUR; MARIS, 2002).

O gangliosídeo GD2 é derivado de anticorpos monoclonais que reconhecem células do neuroblastoma contra os gangliosídeos. Os níveis séricos estão aumentados em pacientes com neuroblastoma, o que é utilizado também como marcador de doença em atividade ou resposta ao tratamento. Anticorpos contra GD2 podem ser usados como terapêutica para o neuroblastoma (CASTLEBERRY, 1997).

## 2.8 MARCADORES NEUROPEPTIDÉRGICOS

Os neuropeptídeos são marcadores de diferenciação neuronal que podem estar associados ao neuroblastoma, tais como a cromatogranina A e o neuropeptídeo Y (BRODEUR; MARIS, 2002).



A cromatogranina A é uma proteína ácida componente dos grânulos neurosecretores de células neuroendócrinas, tecidos e tumores. Está presente no soro dos pacientes com neuroblastoma, podendo ser utilizada como marcador sensível e específico para atividade da doença e resposta ao tratamento.

O neuropeptídeo Y é outro marcador proteico neurosecretor cuja função é regular e restringir o desenvolvimento do sistema nervoso. Essas duas proteínas podem ser úteis na caracterização dos neuroblastomas em termos de diferenciação do estadiamento ou monitorização do paciente. Outros peptídeos hormonais associados ao neuroblastoma são o SS (somatostatina) e o VIP (peptídeo vasointestinal). A expressão dos receptores SS nas células está associada com maior diferenciação histológica, baixos estádios da doença e prognóstico favorável.

Embora o VIP esteja associado com a síndrome paraneoplásica que inclui diarreia e distensão abdominal, sua expressão também está associada à diferenciação tumoral e neuronal em linhagens celulares de neuroblastoma (CASTLEBERRY, 1997). Ainda não está claro o papel dessas duas proteínas na regulação do crescimento ou diferenciação do sistema nervoso simpático durante o desenvolvimento normal (BRODEUR; MARIS, 2002).

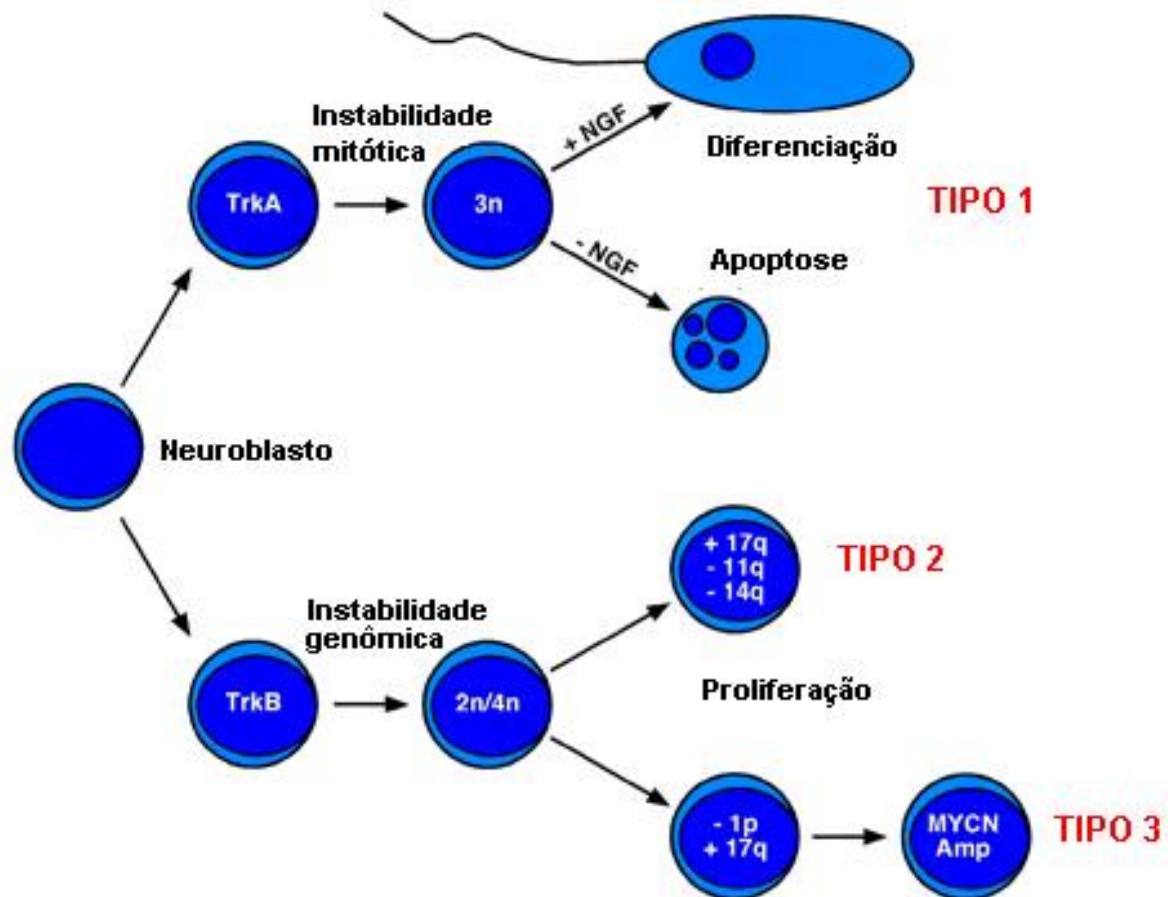
## 2.9 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-GENÉTICAS RELACIONADAS AO PROGNÓSTICO

De acordo com o COG (*Children's Oncology Group*) são estabelecidas três categorias de riscos para os pacientes com neuroblastoma: os de baixo risco incluem os estádios 1 e 2A, e lactentes com estágio 2B, 3 e 4S. Estes têm uma sobrevida livre de eventos na taxa de 90%. Os de alto risco incluem o estágio 4, e ocorrem em crianças acima de um ano de idade. A sobrevida livre de eventos deste grupo é em torno de 15%. Os de risco intermediário incluem crianças com estádios 2B e 3 e lactentes com estágio 4, apresentam uma sobrevida livre de eventos de 70% quando uma quimioterapia agressiva é adotada (BRODEUR; MARIS, 2002).

BRODEUR (1995), introduziu características genéticas a estes grupos de risco. Posteriormente, em 1997, BRODEUR et al. sugeriram o modelo da origem genética do neuroblastoma (Figura 1). A diferenciação destes tumores em relação à caracterização genética contribuiu para o aperfeiçoamento do diagnóstico e prognóstico e tem sido utilizada como ferramenta na classificação e estratificação dos pacientes com neuroblastoma (MORA et al., 2001).

De acordo com as alterações genéticas mais comuns, os neuroblastomas podem ser divididos em três subtipos genéticos, cujas características biológicas e clínicas estão associadas ao prognóstico (descritos na Tabela 5). O tipo 1 é caracterizado por disfunção mitótica, apresentando cariótipos com hiperdiploidia ou quase-triploidia e poucos rearranjos cromossômicos. Esses tumores não apresentam as alterações genéticas específicas como a amplificação do oncogene *MYCN* ou deleção em 1p, porém apresentam expressão aumentada do gene *NTRK1*. Esses pacientes são geralmente menores que um ano de idade, com doença localizada e têm um bom prognóstico. O tipo 2 é caracterizado por aberrações cromossômicas complexas e geralmente o cariótipo é quase-diplóide. Os pacientes apresentam idade acima de um ano e estádios mais avançados, a doença é lentamente progressiva e fatal. O tipo 3 é caracterizado por amplificação do *MYCN*, geralmente com perda de heterozigose em 1p36 e expressão aumentada do *NTRK2*. Esses pacientes têm idade entre 1 e 5 anos, com doença avançada, que é rapidamente progressiva e freqüentemente fatal (BRODEUR; MARIS, 2002).

FIGURA 1- MODELO HIPOTÉTICO DA ORIGEM GENÉTICA DO NEUROBLASTOMA



Neuroblastos indiferenciados ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso simpático são alvos de mutações que levam à formação tumoral. O grau de diferenciação neuroblástica durante o período de transformação maligna determina o padrão de expressão de neurotrofinas. Tumores com expressão de *NTRK1* são mais prováveis de terem erros de recombinação mitótica, resultando em ganhos cromossômicos. Os tumores do tipo 1 são freqüentemente quase triplóides e podem se diferenciar em resposta ao NGF ou entrarem em morte celular programada na ausência de NGF. Os tumores que expressam *NTRK2* mais freqüentemente desenvolvem instabilidade genômica (mas podem ter também instabilidade mitótica) com alterações cromossômicas estruturais. Tumores com instabilidade genômica freqüentemente têm ganho não balanceado da porção distal em parte de 17q. Perda de parte de 11q e/ou 14q geralmente ocorre com ganho de parte de 17q e freqüentemente sem deleção de 1p e amplificação de *MYCN* (tumores do tipo 2). Entretanto, o ganho de 17q pode ser o resultado de uma translocação não balanceada de 1p, com concomitante perda de parte de 1p. Tumores com perda de 1p (por translocação não balanceada ou outros mecanismos) freqüentemente apresentam amplificação de *MYCN* (tumores do tipo 3). Assim, a inativação do gene de 1p pode ser um pré-requisito para amplificação de *MYCN*.

FONTE: MARIS, J.M.; MATTHAY, K.K. Molecular Biology of Neuroblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 2264-2279, 1999.

Há estudos que sugerem que os neuroblastomas de baixo e alto risco poderiam surgir de diferentes etiologias ou diferentes estágios do desenvolvimento embrionário, provavelmente com o envolvimento de alterações nos mecanismos genéticos e moleculares (van NOESEL; VERSTEEG, 2004).

TABELA 5 - SUBDIVISÃO CLÍNICA DOS NEUROBLASTOMAS

Características tumorais	Tipo 1 Baixo risco	Tipo 2 Risco intermediário	Tipo 3 Alto risco
<i>MYCN</i>	Normal	Normal	Amplificado
Ploidia de DNA	Hiperdiplóide Quase-triplóide	Quase-diplóide Quase-tetraplóide	Quase-diplóide Quase-tetraplóide
Ganho 17q	Raro	Comum	Comum
LOH em 14q	Raro	Comum	Raro
LOH em 1p	Raro	Raro	Comum
LOH em 11q	Raro	Comum	Raro
Expressão <i>NTRK1</i>	Alta	Baixa ou ausente	Baixa ou ausente
Expressão <i>NTRK2</i>	Baixa	Baixa ou ausente	Alta
Expressão <i>NTRK3</i>	Alta	Baixa ou ausente	Baixa ou ausente
Idade	Geralmente <1 ano	Geralmente > 1 ano	Geralmente 1-5 anos
Estádio	Geralmente 1,2,4S	Geralmente 3,4	Geralmente 3,4
Sobrevida em 5 anos	95%	Aproximadamente 50%	Aproximadamente 25%

FONTE: BRODEUR, G.M.; MARIS, J.M. Neuroblastoma. In: PIZZO, P.A.; POPLACK, D.G. **Principles and practice of pediatric oncology**. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2002, p.902.

### 2.9.1 Tratamento

A resposta ao tratamento em pacientes com neuroblastoma depende de alguns critérios que foram estabelecidos internacionalmente (Tabela 6). A avaliação da resposta em pacientes recentemente diagnosticados é recomendada no final da indução da quimioterapia (3 a 4 meses após o início do tratamento) e no final do tratamento (8 a 12 meses após o início da quimioterapia), antes e após procedimentos cirúrgicos, antes do transplante de células tronco e quando indicado clinicamente (BRODEUR; MARIS, 2002).

TABELA 6 - DEFINIÇÕES PROPOSTAS DA RESPOSTA AO TRATAMENTO.

Resposta	Primário	Metástases	Marcadores
Resposta completa	Sem tumor	Sem tumor (tórax, abdome, medula óssea, linfonodos)	HVA/VMA normal
Resposta Parcial muito boa	Redução >90% mas <100%	Sem tumor (exceto osso), sem lesões ósseas novas, todas pré-existentes melhoradas.	HVA/VMA diminuiu > 90%
Resposta parcial	Redução 50-90%	Sem lesões novas; redução 50-90% dos locais mensurados; 0-1 caso de medula óssea com tumor; lesões ósseas com boa remissão parcial	HVA/VMA diminuiu 50-90%
Resposta mista	-	Sem lesões novas; > 50% redução lesões iniciais (primárias ou metástases) com redução <50% em qualquer local; aumento <25% em qualquer lesão existente.	-
Sem resposta	-	Sem lesões novas; redução <50% mas aumento <25% em qualquer lesão existente. Qualquer lesão nova; aumento de qualquer lesão inicial >25%;	-
Doença progressiva	-	medula previamente negativa e agora infiltrada.	-

FONTE: BRODEUR, G.M.; MARIS, J.M. Neuroblastoma. In: PIZZO, P.A.; POPLACK, D.G. **Principles and practice of pediatric oncology**. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2002, p.910.

O tratamento é realizado de acordo com o estadiamento e as opções geralmente incluem cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou transplante autólogo de medula óssea. A cirurgia é importante tanto para o diagnóstico quanto para o tratamento, sendo o procedimento de escolha, pois pode proporcionar tratamento curativo quando a doença for localizada e o tumor passível de ressecção. Através da ressecção tumoral, obtém-se tecido para estudos biológicos, e é feito o estadiamento cirúrgico. É importante retirar o tumor sem comprometer estruturas vitais, enquanto os linfonodos devem ser ressecados para estadiamento. Com o

*second look* (segundo procedimento cirúrgico), o cirurgião determina a resposta à terapia (completa ou parcial) e remove doença residual, quando possível. Se o tumor é irressecável, parcialmente ressecável ou apresenta metástases ao diagnóstico, a quimioterapia e/ou radioterapia devem ser utilizadas. A quimioterapia pode reduzir a massa tumoral, quando esta compromete estruturas vitais ou é de difícil ressecção, melhorando a morbidade e sobrevida dos pacientes (BRODEUR; MARIS, 2002).

O neuroblastoma é um tumor radiosensível e a dose geralmente utilizada é de 15 a 30Gy, dependendo da idade do paciente, volume e localização tumoral. As doses podem ser fracionadas de 150 a 400 cGy dependendo do volume tumoral. Antigamente a radioterapia era utilizada para neuroblastomas residuais, tumores irressecáveis e doença disseminada. Atualmente, a radioterapia é utilizada para controle local de foco residual da doença (HAAS-KOGAN et al., 2003) após a quimioterapia, ou como medida paliativa (BRODEUR; MARIS, 2002). Nos estádios 4, a radioterapia hiperfracionada após cirurgia é bem tolerada e melhora o controle local da doença (WOLDEN et al., 2000). No estágio 4S a radioterapia é indicada naqueles neonatos que desenvolvem desconforto respiratório secundário a hepatomegalia ou quando a quimioterapia foi ineficaz. A dose efetiva é de 3 a 6 Gy simples ou fracionada (BRODEUR; MARIS, 2002). Entretanto, devido aos efeitos colaterais da radioterapia, a quimioterapia deve ser a primeira escolha nestes pacientes (PAULINO et al., 2002).

A irradiação corporal total representa outra possibilidade terapêutica nos pacientes com neuroblastoma. As doses de 7,5 a 12 Gy, feitas em 3 a 5 frações, têm sido utilizadas para regimes de transplante autólogo (ABMT) ou transplante de células tronco. Os benefícios de altas doses de quimio e radioterapia, comparada com quimioterapia mieloablativas isolada no ABMT, ainda não são bem estabelecidos. Para as doenças metastáticas e medidas paliativas de dor, a dose utilizada é de 4 a 32 Gy, prolongando o crescimento tumoral e melhorando a qualidade de vida do paciente (BRODEUR; MARIS, 2002).

Apesar dos avanços na quimioterapia (fundamentados no emprego dos derivados da platina), a maioria das crianças com diagnóstico de neuroblastoma são de alto risco e alcançam sobrevida livre de eventos em aproximadamente 30% dos casos, aos 3 anos de acompanhamento, mesmo aquelas que são submetidas a transplante (MATTHAY et al., 1999).

O sistema de estratificação de risco para analisar os fatores prognósticos foi estabelecido pelo COG, baseado no POG e no CCG (CASTLEBERRY et al., 1997) apresentados na Tabela 7. Este sistema analisa os fatores clínicos como idade do paciente ao diagnóstico e estadiamento (INSS), e fatores biológicos como a histopatologia do tumor, índice de DNA, amplificação do *MYCN*, classificando o paciente em 3 grupos de risco (baixo, intermediário e alto).

TABELA 7 - PROPOSTA DOS GRUPOS DE RISCO DO NEUROBLASTOMA BASEADOS EM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS DO TUMOR

Estádio	Baixo risco	Risco intermediário	Alto risco
1	Todos	Nenhum	Nenhum
2A, 2B	Idade <1 ano, ou Idade 1-21 anos; <i>MYCN</i> não amp. <sup>1</sup> , ou idade 1-21 anos; <i>MYCN</i> amp. e FH <sup>2</sup> Nenhum	Nenhum	Idade 1-21 anos com <i>MYCN</i> amp. E DH
3		Idade <1 ano a <i>MYCN</i> não amp.; ou idade 1-21anos, <i>MYCN</i> não amp. e FH	Idade 0-21 anos com <i>MYCN</i> amp., ou idade 1-21 anos, com <i>MYCN</i> não amp. e DH
4	Nenhum	Idade <1 ano com <i>MYCN</i> não amp.	Idade <1 ano e <i>MYCN</i> amp., ou idade 1-21 anos com <i>MYCN</i> amp.
4S	<i>MYCN</i> não amp.; FH; DI <sup>4</sup> >1	<i>MYCN</i> não amp.; DH <sup>3</sup> ou DI=1	<i>MYCN</i> amp.

FONTE: BRODEUR, G.M.; MARIS, J.M. Neuroblastoma. In: PIZZO, P.A.; POPLACK, D.G.; **Principles and practice of pediatric oncology**. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2002, p.915.

NOTA: 1 Amp.= amplificado; 2 FH= histologia favorável; 3, DH= histologia desfavorável; 4, DI= índice de DNA

O tratamento dos neuroblastomas de baixo risco consiste em remoção cirúrgica do tumor primário. Se a doença é localizada e o tumor tem características biológicas favoráveis, mesmo com ressecção incompleta, a evolução é favorável, apresentando sobrevida livre de eventos em 90% dos casos, dependendo da idade (CASTLEBERRY, 1997).

A cirurgia é também o tratamento de escolha dos pacientes com estágio 2. A sobrevida livre de eventos em 4 anos é de 81%, e a maioria dos pacientes que recidivaram foram salvos, com sobrevida global de 98%. Muitos pacientes são tratados com quimioterapia e tem excelentes resultados de sobrevida, porém, há muita controvérsia na literatura se estes pacientes com estágio 2, com *MYCN* amplificado ou não, devem fazer quimioterapia, de acordo com RUBIE et al. (1997). A maioria dos pacientes do estágio 2 que fizeram cirurgia isolada e não fizeram quimioterapia tiveram recidiva ou óbito pela doença, principalmente aqueles pacientes com *MYCN* amplificado (RUBIE et al., 1997 e PEREZ et al., 2000).

O estágio 4S entra na classificação de baixo risco e a sobrevida global é de 57 a 97%. Há um subgrupo de pacientes com estágio 4S que apresenta histologia desfavorável com amplificação do *MYCN*, onde há rápida progressão tumoral ou recidiva de doença semelhante ao estágio 4. Isto enfatiza a importância das características biológicas dos tumores e indicações de intervenção terapêutica nestes pacientes (NICKERSON et al., 2000). Uma biópsia é indicada para definir as características biológicas desses tumores. Os pacientes que apresentam histologia favorável devem ser observados, principalmente aqueles menores de 2 meses de idade, pois o tumor pode regredir espontaneamente. Se há comprometimento respiratório a quimioterapia é indicada (KATZENSTEIN et al., 1998 e NICKERSON et al., 2000). A radioterapia em doses baixas de 450 a 600 cGy, em 3 ou 4 frações é indicada naqueles pacientes que já estão sendo tratados com quimioterapia e que mantêm desconforto respiratório. Os pacientes raros, de estágio 4S, que têm histologia desfavorável, devem ser classificados como risco intermediário (diploidia ou histologia desfavorável de SHIMADA) ou alto risco (amplificação do *MYCN*) e o tratamento deve ser planejado conforme o risco (BRODEUR; MARIS, 2002).

Os pacientes que apresentam infiltração da doença na extensão intratecal ou compressão do canal medular geralmente são de baixo risco, embora as características da doença possam parecer de risco intermediário ou alto. A laminectomia descompressiva e a radioterapia são de alta morbidade. A quimioterapia isolada reduz o tumor em 58% dos casos e a função neurológica é preservada em 92% dos casos. Então, a quimioterapia nesses casos é a melhor opção (BRODEUR; MARIS, 2002).



O tratamento adotado em pacientes com risco intermediário é a quimioterapia com ciclofosfamida, doxorubicina, cisplatina e etoposídeo. No estudo de MATTHAY et al. (1998), a sobrevida livre de eventos em 4 anos foi de 100% nos pacientes que tinham histologia favorável e *MYCN* não amplificado. Nos lactentes, a sobrevida livre de eventos e global foi de 90% e 93%, respectivamente; enquanto a sobrevida em crianças maiores que um ano, com características biológicas desfavoráveis livres de eventos, foi de 65% e a global 75% em 4 anos.

A maioria dos lactentes com estágio quatro são de risco intermediário e não está claro se lactentes com neuroblastoma metastático e *MYCN* amplificado tem curso altamente maligno. A sobrevida livre de eventos para estes pacientes foi de 10% e os lactentes com *MYCN* não amplificado têm comportamento menos agressivo e respondem a doses moderadas de quimioterapia e evitam a radioterapia externa. A sobrevida livre de eventos para estes pacientes foi de 93% (SCHMIDT et al., 2000). A combinação de quimioterápicos determinado pelo COG para o risco intermediário inclui a carboplatina, o etoposídeo, a ciclofosfamida e a doxorubicina (BRODEUR; MARIS, 2002).

Os neuroblastomas classificados como de alto risco apresentam sobrevida menor que 15%. O tratamento amplo, que inclui quimioterapia de indução, terapia de consolidação mieloablativa com resgate das células tronco e terapia centralizada na doença residual mínima melhorou a sobrevida global dos pacientes nos Estados Unidos. Entretanto, as taxas de sobrevida ainda são baixas e há alta morbidade.

O objetivo da terapia de indução consiste em redução máxima do tumor primário e dos sítios metastáticos. O neuroblastoma é sensível à quimioterapia, mesmo os com *MYCN* amplificado e doses intensivas dos derivados da platina têm melhorado a sobrevida da doença. A eficácia da quimioterapia de indução é determinada após o segundo procedimento cirúrgico (*second look*), onde é observada resposta completa ou parcial.

A terapia de consolidação geralmente é realizada com agentes citotóxicos e resgate com células tronco, com o objetivo de eliminar os clones tumorais resistentes à quimioterapia supraletal com transplante autólogo de medula óssea (ABMT). MATTHAY et al. (1999), relataram resultados de cinco anos de estudos do CCG, onde o ABMT melhora a sobrevida dos pacientes, quando comparado à quimioterapia convencional, principalmente nos casos de neuroblastomas de alto risco com *MYCN* amplificado.

O objetivo da terapia da doença residual mínima é erradicar as células tumorais residuais, utilizando agentes não diretamente citotóxicos e teoricamente ativos contra a alta resistência quimioterápica. O ácido retinóico induz a diferenciação celular concomitante com a diminuição da proliferação das células do neuroblastoma *in vitro*. A dose máxima tolerada em estudos de fase I foi de 160 mg/m<sup>2</sup> por dia, duas vezes ao dia. Os métodos apropriados para detectar a doença residual mínima ainda não foram definidos. Para doença cortical a cintilografia com MIBG (metaiodobenzilguanidina radiomarcada) pode melhorar a sensibilidade da detecção de doença ativa. A análise imunohistoquímica de aspirados de medula óssea com painel de anticorpos monoclonais tem aumentado a sensibilidade de detecção enquanto a reação em cadeia de polimerase (PCR) também pode ser útil (BRODEUR; MARIS, 2002).

O tratamento para neuroblastomas recorrentes ou refratários pode ser feito através de agentes citotóxicos (topotecano, paclitaxel, irinotecan e rebecamicina), radionuclídeos (MIBG, anticorpos anti-GD2), retinóides (13-cis-ácido retinóico) e terapia imune-mediada (anticorpos contra GD2). Entretanto, para neuroblastomas de alto risco a sobrevida ainda é muito baixa.

O ácido retinóico está envolvido na diferenciação neuronal e apoptose. Os ácidos retinóicos (trans-RA ou ATRA e 9-cis-RA) têm seus efeitos de interação, mediados por dois tipos de receptores, os receptores RA (RARs) e os receptores X (RXRs), ambos receptores hormonais nucleares não esteroidais. Ele mostra que a indução da apoptose por RA sintético como 13-cis-RA é dependente da coestimulação de ambos RAR alfa e RAR gama.

A hipótese de que o ácido retinóico pode exercer um efeito indireto no oncogene *MYCN* transcrito através de interações DNA-proteínas dentro desta região, é então denominado como região de resposta do ácido retinóico. Esta região é necessária para a resposta transcricional do *MYCN* ao ácido retinóico. Se esta região estiver mutada há resistência ao ácido retinóico nos pacientes com neuroblastomas (TUTHILL et al., 2003).

As complicações do tratamento podem ser cirúrgicas, além de efeitos tardios da quimio e radioterapia. Os pacientes de alto risco têm maiores riscos de complicações durante o tratamento, entre eles: alterações no crescimento, disfunções cardíaca e renal, ototoxicidade em pacientes que utilizaram derivados da platina, principalmente em crianças muito jovens, entre outras. O uso extensivo de agentes alquilantes e inibidores da topoisomerase II têm alta prevalência de esterilidade e neoplasias secundárias, particularmente síndromes mielodisplásicas e leucemias não linfoblásticas (BRODEUR; MARIS, 2002).

As propostas futuras de tratamento incluem a atuação direta contra as alterações gênicas e protéicas, que contribuem para o fenótipo maligno da célula (van NOESEL; VERSTEEG, 2004).

Desta forma, é importante a detecção de anomalias genéticas no momento do diagnóstico para que seja estabelecido um tratamento adequado, principalmente para aquelas crianças que são inicialmente estadiadas como de baixo risco, algumas com histologia favorável, mas que recidivaram ao longo do tratamento. Assim sendo, o diagnóstico molecular das alterações genéticas específicas do neuroblastoma, principalmente a amplificação do *MYCN*, torna-se fundamental na determinação do prognóstico clínico desses pacientes, capaz de alterar, através das mudanças dos protocolos de tratamento, a morbidade e mortalidade envolvida nesta doença (BRODEUR; MARIS, 2002 e TUTHILL et al., 2003).

## 2.10 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA (FISH)

A técnica utilizada para a detecção da amplificação do oncogene *MYCN* neste estudo foi o método de FISH.

### 2.10.1 Histórico e Princípios do Método

A hibridização *in situ* por fluorescência é um método que foi desenvolvido em 1980 por BAUMAN<sup>8</sup> e colaboradores, citados por LEVSKY e SINGER (2003) e representou um grande avanço na análise cromossômica, principalmente em sua aplicação nos tumores humanos (GOZZETTI; BEAU, 2000). Anterior ao FISH, desde 1960, o processo de hibridização era realizado com sondas de material radioativo, que são sondas instáveis, de resolução limitada, e que apresentam risco de exposição à radiação (LEVSKY; SINGER, 2003). O método de FISH permite localizar seqüências de ácidos nucleicos específicos em células individuais, de tecido parafinado, ou de preparações celulares metafásicas, interfásicas ou *citospin* (RAIMONDI, 2000). Especificamente, o método envolve a hibridização precisa de uma sonda de fita simples de DNA, marcada com fluorocromos ou haptenos que serão reconhecidos posteriormente por anticorpos conjugados a fluorocromos, a seqüências alvo complementares. A hibridização da sonda com o DNA celular é visível por detecção imunohistoquímica direta ou indireta, utilizando-se microscópio equipado, epi-iluminação e filtros específicos para a fluorescência (BLANCATO; HADDAD, 2000).

Uma variedade de sondas é usada para detectar anormalidades cromossômicas pelo FISH e são divididas em três grupos: sondas que identificam uma estrutura específica de um cromossomo, sondas que hibridizam múltiplas seqüências cromossômicas e sondas que hibridizam uma seqüência única de DNA.

---

<sup>8</sup> BAUMAN, J. G.; WIEGANT, J.; BORST, P.; van DUIJN, P. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. **Exp Cell Res**, v. 128, p. 485-490, 1980.

O primeiro grupo é representado pelas sondas alfa satélites ou centroméricas (CEPR) que são compostas de DNA de sequências repetitivas e hibridizam nas regiões centroméricas de cromossomos humanos específicos, tanto em núcleos interfásicos como em metafásicos, e são principalmente utilizadas para detecção de aneuploidias.

O segundo grupo são as sondas de pintura cromossômica (WCPR), construídas a partir de bibliotecas de DNA, e que são uma mistura de sequências específicas de DNA cromossômico, marcadas diretamente com fluorocromos e blocos de DNA não marcados, para suprimir sequências altamente repetitivas que são comuns a muitos cromossomos diferentes, principalmente usadas para a detecção de translocações e deleções. A hibridização resulta em pintar o cromossomo inteiro e é particularmente usada para marcar os cromossomos. As sondas de pintura são usadas apenas em cromossomos metafásicos.

O terceiro grupo representa as sondas que são usualmente clones genômicos e variam em tamanho, dependendo da natureza do vetor de clonagem, que podem ser plasmídeos, cosmídeos, PAC, BAC ou YAC, e variam em tamanhos de poucos Kb até 2 Mb. Sondas deste grupo marcam uma região ou todo o gene e são particularmente úteis para a detecção de rearranjos estruturais, deleções e/ou ampliações gênicas (GOZZETTI; SINGER, 2000).

A técnica de hibridização *in situ* por fluorescência permite a detecção de anormalidades numéricas e estruturais dos cromossomos, incluindo rearranjos complexos e microdeleções, confirmando a caracterização de aberrações cromossômicas detectadas pela citogenética convencional e definindo aquelas cuja resolução não seja alcançada por esta análise; incluindo, por exemplo, ampliações e deleções gênicas. As aplicações clínicas do FISH incluem a monitorização dos efeitos de terapia; detecção inicial de doença residual mínima; identificação cromossômica da origem das células da medula óssea (doadoras ou receptoras), antes e após o transplante de medula óssea, entre outras (GOZZETTI; SINGER, 2000).

Uma grande vantagem do FISH é permitir a identificação de anormalidades cromossômicas, diretamente em células interfásicas, obtidas a partir de suspensões de tecido fixado em parafina. Desta forma, é possível a análise de material arquivado, onde não há mais a disponibilidade de tecido a fresco (BLANCATO; HADDAD, 2000). A técnica de FISH permite também a localização direta dos genes nos cromossomos metafásicos, sendo um ponto de referência para o mapeamento gênico (ADINOLFI; DAVIS, 1994).

#### 2.10.2 Aplicação do FISH na Detecção da Amplificação do Oncogene *MYCN* em Neuroblastomas

O método de FISH permite avaliar a amplificação do oncogene *MYCN* em células individuais do neuroblastoma, revelando diretamente o número de cópias por célula analisada (em metáfase ou em núcleos interfásicos), correspondendo a dois sinais fluorescentes (SARTELET et al., 2002) e também se a amplificação está presente por *double minutes* (dmin) ou região homogeneamente corada (HSR) (YOSHIMOTO et al., 1999 e MATHEW et al., 2001). Através do número de cópias determina-se o prognóstico da doença, e mais de 10 cópias indica prognóstico desfavorável (SEEGER et al, 1985 e RAIMONDI, 2000). Há vários estudos que foram limitados a poucos casos, por apresentarem material fixado em parafina (SARTELET et al., 2002). Quanto mais imatura a área tumoral, maior a possibilidade de ser encontrada a amplificação nos neuroblastos. A técnica de FISH é mais sensível com o uso de sondas com fluorocromos, permitindo a diminuição do *background*, e é mais específica que outros métodos por ter a capacidade de detectar a amplificação, mesmo com pequenos fragmentos de células tumorais (MATHEW et al., 2001). Devido à análise citogenética ter um sucesso de aproximadamente 30% nos casos de neuroblastoma, o uso do FISH e RT-PCR, com a finalidade de determinar o número de cópias do gene, é fundamental para determinar a terapia apropriada e o prognóstico das crianças com neuroblastoma (RAIMONDI, 2000).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CASUÍSTICA

Este estudo foi retrospectivo, a partir dos dados de prontuários e da análise de amostras de tumor em blocos de parafina provenientes de três instituições: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (n=19), Hospital Erasto Gaertner (n=16) e Hospital Pequeno Príncipe (n=10) da cidade de Curitiba, Paraná. Este projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa das três instituições citadas acima (Anexos 1, 2 e 3).

A casuística inicial incluiu 45 pacientes, 25 do sexo masculino e 20 do sexo feminino, com idade no diagnóstico variando de 1 mês a 13 anos, correspondendo à idade média de 38,67 meses, desvio padrão de 33,16 meses e mediana de 33 meses no período entre 01/01/1990 a 31/12/2000. O grupo de pacientes com neuroblastoma atendidos nestas Instituições é muito maior ao utilizado neste estudo e a razão de terem sido incluídos apenas 45 pacientes foi à disponibilidade de amostras do tumor em blocos de parafina. O neuroblastoma foi confirmado pela análise histopatológica de biópsia ou ressecção cirúrgica do tumor primário ou metástases. Vinte por cento (9/45) das crianças apresentaram idade inferior a um ano e 80% (36/45) igual ou superior a um ano.

Nesta casuística, nota-se que havia dois pacientes no estágio 1, seis no estágio 2, dezesseis no estágio 3, vinte no estágio 4 e apenas um no estágio 4S. Assim, observou-se estádios de bom prognóstico (1, 2 e 4S) em 20% dos pacientes, em contraste com os estádios avançados (3 e 4), encontrados em 80% deles. Os pacientes do estágio 2 foram classificados apenas como 2, sem subdivisão em A e B, pois em alguns prontuários não foi encontrada esta subclassificação.

Estes pacientes foram tratados de acordo com os protocolos propostos nas 3 Instituições. As drogas utilizadas como primeira linha de tratamento para o estágio 2 foram ciclofosfamida e doxorrubicina nas 3 Instituições, de acordo com BRODEUR e MARIS, 2002. Um paciente do estágio 1 fez cirurgia curativa e o outro, o esquema quimioterápico citado acima. O esquema terapêutico utilizado para estádios 3 e 4 foi à associação das drogas: ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina, cisplatina e uma das 2 epipodofilotoxinas (etoposídeo ou teniposídeo), adaptados de protocolos

internacionais e nacionais (BRODEUR; MARIS, 2002 e GOLDSBY; MATTHAY, 2004). Esta diferença de tratamento, algumas vezes, ocorreu na mesma Instituição, decorrente de mudanças de protocolos em 10 anos de tratamento (1990 a 2000). Muitos pacientes necessitaram de esquemas alternativos devido à resistência ao tratamento quimioterápico e foram tratados com associações de duas ou mais das drogas: ifosfamida, carboplatina, etoposídeo e topotecano. A maioria dos pacientes (n=43) foi submetida à quimioterapia, os outros dois pacientes não a fizeram porque um era estágio 1 com ressecção completa e o outro foi a óbito após a cirurgia (antes de iniciar a quimioterapia). Em 27 pacientes a ressecção do tumor foi feita antes de iniciar o tratamento quimioterápico e os outros pacientes restantes (n=18) foram submetidos à quimioterapia antes da cirurgia, para reduzir o tamanho do tumor e após a ressecção, foram aplicados ciclos de quimioterapia adjuvante. A decisão quanto à indicação da quimioterapia antes da ressecção do tumor foi baseada em dois critérios: quando havia infiltração de medula óssea ou quando a massa não era totalmente ressecável. Foi também indicada quimioterapia antes da ressecção total nos casos sem infiltração de medula, mas apresentando imagens de infiltração do osso (pela radiografia ou cintilografia) e constatação de massa abdominal através da biópsia. Dos pacientes no estágio 4, apenas um paciente (uma menina) foi submetido ao transplante autólogo do seu próprio sangue de cordão umbilical congelado. Este sangue tinha sido guardado para seu irmão que estava com leucemia, porém a paciente teve diagnóstico de neuroblastoma com 1 ano e 8 meses de vida, necessitou do transplante e está viva.

Onze pacientes foram submetidos à radioterapia complementar para redução da massa tumoral no início do tratamento ou esquema paliativo em estádios avançados.

Os pacientes foram analisados quanto ao sexo, idade ao diagnóstico, estágio, localização da massa tumoral (supra-renal ou outros locais), grau de diferenciação do neuroblastoma (diferenciado, indiferenciado e bem diferenciado) (GOTO et al. 2001), classificação histopatológica pela *International Neuroblastoma Pathology Classification* (INPC) em histologia favorável e desfavorável (SHIMADA et al., 1999); quimioterapia antes ou depois da ressecção total do tumor, amplificação do gene *N-MYC* (identificada por FISH), sobrevida (4 a 14 anos). A tabela com os dados clínicos e parâmetros histopatológicos com os resultados do *N-MYC* (amplificado ou não) encontra-se no capítulo dos resultados (Tabela 8).



## 3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO:

### 3.2.1 Critérios de Inclusão dos Pacientes

- Crianças portadoras de neuroblastoma documentado, com idade  $\leq 15$  anos ao diagnóstico, independente do estadiamento, submetidas ou não a tratamento prévio.
- Critérios diagnósticos do neuroblastoma, adotados pelo grupo internacional da maioria de oncologistas pediátricos, incluindo pelo menos: diagnóstico patológico com ou sem imunohistoquímica do tumor, punção aspirativa ou biópsia de medula óssea contendo células tumorais (neuroblastos) e achados de catecolaminas e seus metabólicos séricos e/ou urinários elevados.

Por se tratar de estudo retrospectivo baseado em análise de material histopatológico em parafina, os Comitês de Ética em Pesquisa dos 3 hospitais aprovaram a não utilização do termo de consentimento livre e esclarecido.

### 3.2.2 Critérios de Exclusão dos Pacientes

Pacientes portadores de neuroblastoma sem amostra de tecido em bloco de parafina para análise histopatológica e por FISH.

## 3.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Cortes de 4 $\mu$ m (5 lâminas/tumor) foram obtidos dos blocos de parafina com tecido tumoral ou de medula óssea de neuroblastoma. Em seguida, um corte de cada bloco foi fixado em lâmina e esta foi corada com hematoxilina e eosina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990). A análise histopatológica foi revisada por microscopia óptica conforme a *International Neuroblastoma Pathology Classification* (INPC) descrita por SHIMADA et al., em 1999 por um patologista (Dr. Ewerton Marques Maggio do Hospital de Clínicas-UFPR), que delimitou a área tumoral dos cortes histopatológicos para posterior análise pelo método de FISH. Cortes imediatamente adjacentes ao analisado pelo patologista, sem coloração, foram utilizados para a análise do FISH.

Neste estudo foram incluídos 2 casos de pacientes com ganglioneuroblastoma (após quimioterapia), cujo diagnóstico inicial foi neuroblastoma, porém não houve biópsia do tecido tumoral pré-quimioterapia, o diagnóstico inicial foi feito com mielograma. Conseqüentemente, estes pacientes não foram classificados pela INPC, por serem tecidos tumorais amadurecidos devido à quimioterapia.

### 3.3.1 Critérios para Avaliação quanto a INPC

- Os pacientes com qualquer idade sem terem sido submetidos à quimioterapia antes da ressecção completa do tumor foram avaliados pelo INPC e receberam classificação histopatológica favorável ou desfavorável.
- Os pacientes submetidos à quimioterapia antes da ressecção completa do tumor que apresentaram histologia desfavorável na INPC no final da quimioterapia foram incluídos na avaliação.
- Não é possível classificar as metástases como histologia favorável ou desfavorável, logo elas não preenchem os critérios para a análise da INPC.
- Foram classificados de acordo com a INPC os tumores como tendo histologia desfavorável dos pacientes com idade acima de 5 anos de idade.

### 3.4 TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA (FISH) PARA O ONCOGENE *MYCN*

Nesta análise foram utilizadas simultaneamente 4 sondas de DNA para a detecção da amplificação do oncogene *MYCN*. Estes experimentos foram realizados no *Institute for Molecular and Human Genetics* na *Georgetown University*, Washington, DC, EUA, sob a orientação de Dr. Bassem Haddad e Dra. Luciane Regina Cavalli.

### 3.4.1 Preparo das Amostras para FISH

Cortes de aproximadamente 4µm do tecido embebido em parafina, fixados previamente em formalina, foram transferidos para as lâminas. Todos os cortes foram analisados histologicamente antes da hibridização por FISH para a confirmação de tecido tumoral. Os cortes foram desparafinizados em solução de xilol, seguido de tratamento com álcool a 100%. O material foi então processado de acordo com o protocolo descrito previamente por BLANCATO e HADDAD (2000). Resumindo, após secagem, os cortes foram digeridos em solução ácida preparada na seguinte proporção: 49,5 ml de água destilada, 0,5 ml de ácido clorídico (1N) e 250 µL de pepsina a 10% a 37° C por 3 horas e 30 minutos. O material digerido foi então desidratado em uma série etanólica de 70, 90 e 100% por 3 minutos em cada etapa. Após a secagem das lâminas, as proteínas contidas no tecido tumoral foram desnaturadas em solução de formamida a 70% e tampão citrato de sódio (2xSSC) a 80° C por 4 minutos. O material das lâminas foi desidratado com álcool gelado (-20°C) a 70%, 90% e 100% durante 5 minutos cada etapa. Novamente, foram colocadas as lâminas para secar em temperatura ambiente. O tampão citrato de sódio (SSC) é fornecido pelo fabricante como solução vinte vezes concentrada (20xSSC) e é composta de: 87,6g de NaCl, 44,1g de citrato de sódio, ambos completados até 500 ml de água bi-destilada e ajustado em pH 7,4 com HCl, depois autoclavado e estocado a 4 °C.

### 3.4.2 Preparo das Sondas e Hibridização

- Preparação da sonda

As sondas foram construídas a partir de BACS (*Bacterial Artificial Chromosomes*) selecionados através dos registros do banco de genes (<http://lestdb.nhri.org.tw/bankkey/prof.html>), contendo a seqüência do gene *MYCN*. Estes BACS RPCI 11: 355-H-10; 179-D-4; 68-A-23; 153-H-16 foram adquiridos comercialmente da empresa Research Genetics, USA. A extração do DNA foi realizada utilizando-se o kit *Qiagen Large-Construc* (*Qiagen*, Valencia, CA, EUA).

- Marcação das sondas

As sondas foram marcadas com as moléculas repórteres biotina (*bio-16-deoxy-UTP-Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany*) (gene *MYCN*) pelo processo de *nick translation* (FEINBERG; VOGELSTEIN<sup>8</sup>, 1983), citados por BLANCATO e HADDAD (2000). As sondas foram posteriormente desnaturadas a 90°C e pré-aneladas a 37° C.

- Hibridização

Foram aplicados 10µl da sonda na preparação desnaturada contida nas lâminas. As lâminas foram seladas e incubadas em estufa por 16 horas a 37° C.

- Lavagem pós-hibridização

As lâminas foram lavadas em solução de 50% de formamida (75ml 2xSSC + 75ml de formamida) por 5 minutos por três vezes e em solução de 1xSSC por 5 minutos por três vezes. Foram adicionados 100 µl de solução bloqueadora nas lâminas, sendo estas incubadas a 37°C em câmara úmida por 30 minutos.

- Detecção

Foram adicionados 100 µl da solução de detecção 1 (1 µl de Avidina – FITC, 1 µl de mouse anti-digoxigenina e 200 µl de tampão de detecção) nas lâminas, sendo estas incubadas a 37°C em câmara úmida por 45 minutos. Após lavagem específica, 100 µl da solução de detecção 2 (4 µl de *rabbit anti-mouse* – TRITC e 800 µl de tampão de detecção) foram adicionados nas lâminas e estas incubadas a 37°C em câmara úmida por 45 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas em solução de 4xSSC + 0,1% *Tween* 20 (500 µl de *Tween* em 500 ml de 4xSSC) a 42°C por 5 minutos, três vezes e coradas com DAPI em cuba escura por 10 minutos. Após esta coloração as lâminas foram lavadas em solução de 4xSSC + 0,1% *Tween* 20 (500 µl de *Tween* em 500 ml de 4xSSC) em temperatura ambiente por 2 minutos.

---

<sup>8</sup> FEINBERG, A. P; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high fragments specific activity. **Anal Biochem**, v. 132, n. 1, 1983.

Foram adicionadas aproximadamente 2 gotas de *antifade* nas lâminas e estas foram cobertas com lamínula, ficando prontas para análise.

As sondas foram detectadas utilizando-se avidina conjugada com o fluorocromo isoticianato (FITC) (*Vector laboratories, Inc, Burlingame, CA*) (gene *MYCN*). Os cromossomos e/ou núcleos interfásicos foram contra-corados com DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole).

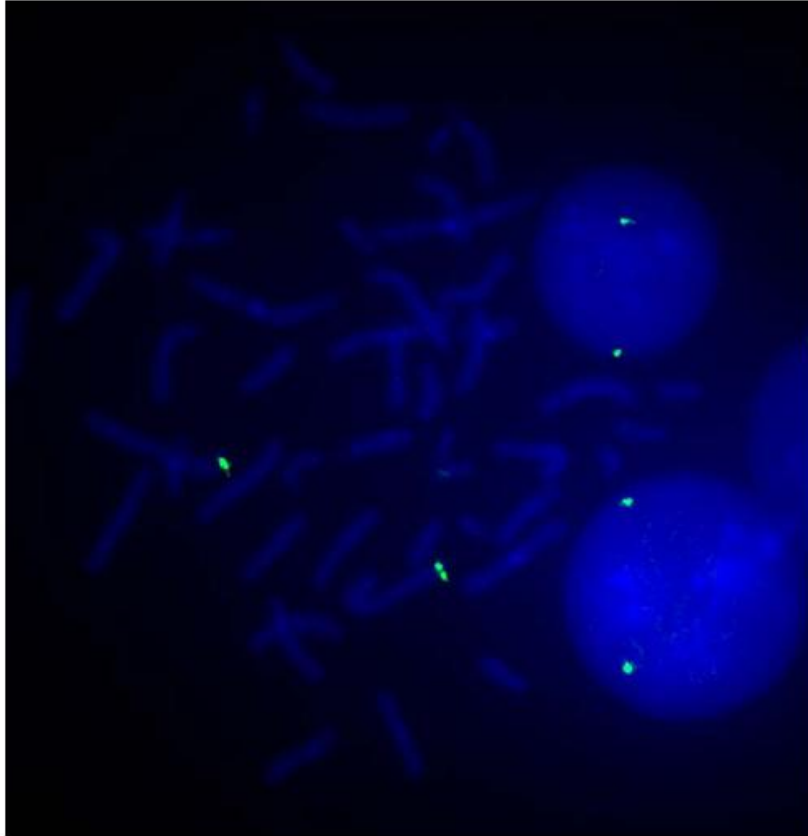
As sondas foram preparadas e hibridizadas em cromossomos metafásicos e núcleos interfásicos obtidos através da preparação citológica de sangue periférico proveniente de um indivíduo normal, para serem testadas quanto a sua localização cromossômica e eficiência de hibridização (intensidade de sinais, especificidade, etc). A Figura 2 mostra o mapeamento do gene *MYCN* no cromossomo 2p24, em núcleos interfásicos e metáfases de um indivíduo normal.

Como controle positivo para a hibridização, foi utilizada a linhagem celular N1E-115 (AMANO et al<sup>9</sup>, 1972), citados por BLANCATO e HADDAD (2000). Esta é uma linhagem proveniente de um paciente portador de neuroblastoma e foi adquirida do repositório de linhagens celulares do *Tissue Core Facility* da Universidade de *Georgetown* (Washington DC, USA). Foi realizada a cultura celular desta linhagem e posterior preparação citológica para a obtenção de cromossomos metafásicos e/ou núcleos interfásicos. Esta linhagem foi hibridizada em experimentos juntamente com as amostras deste estudo, utilizando-se as mesmas sondas, condições de hibridização e critérios de análise.

Como controle negativo para a hibridização, foi utilizada uma preparação citológica obtida a partir de sangue periférico de um indivíduo normal. Assim como no controle positivo, foram utilizadas as mesmas sondas, condições de hibridização e critérios de análise.

---

<sup>9</sup> AMANO, T.; RICHELSON, E.; NIRENBERG, M. Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites). *Proc Natl Acad Sci*, v. 69, n. 1, p. 258-263, 1972.

FIGURA 2 - MAPEAMENTO DO GENE *MYCN* NO CROMOSSOMO 2

### 3.4.3 Análise e Interpretação dos Resultados de FISH

O material hibridizado foi examinado utilizando o microscópio de fluorescência Leica DMRBE, equipado com lâmpada de mercúrio HBO 100W e com filtros para DAPI/ FITC/TRITC.

Somente núcleos individuais, não sobrepostos e intactos, é que foram analisados. Núcleos em áreas onde o tecido continha elevado nível de *background*, sinais de hibridização fracos ou inconsistentes, que pudessem causar dificuldade na interpretação dos resultados, não foram contados.

Dois observadores independentes examinaram 100 células interfásicas (50 células cada observador), anotando os escores (número de sinais) encontrados em cada célula, para cada uma das sondas utilizadas.

De acordo com os resultados obtidos através da hibridização da sonda *MYCN* em amostra de um indivíduo normal (controle negativo), foram determinados

o número de cópias de sinais considerados como positivos e negativos para a amplificação deste gene. Em núcleos interfásicos de células normais espera-se encontrar dois sinais (2 pontos verdes indicado pela sonda marcada com FITC), representando o par de cromossomos homólogos para cada indivíduo. O critério adotado para ser considerar amplificação do oncogene *MYCN* foi baseado em estudos descritos por SEEGER et al., 1985, YOSHIMOTO et al., 1999, RAIMONDI, 2000 e TANAKA et al., 2004, quando existir 10 ou mais cópias deste gene no mesmo núcleo interfásico.

A captura de 10 imagens por lâmina foi realizada em um computador, do Laboratório de Citogenética da Universidade de *Georgetown*, acoplado ao microscópio Leica e a câmera fotográfica para documentação dos casos.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram incluídos em uma planilha do Excel e posteriormente exportados para o software Statistica para que fosse efetuada a análise estatística, seguindo a orientação do professor Luis Gonzaga Caleffe, da Faculdade Evangélica do Paraná.

Todas as variáveis contínuas foram avaliadas quanto à sua distribuição e, para a distribuição normal, foram calculadas as medidas de tendência central, como a média aritmética e desvio padrão.

Para as variáveis categóricas binárias e normais foram utilizados:

- Teste Exato de Fisher (bilateral).
- Teste do Qui-quadrado de Pearson.
- Correção de Yates (quando necessária).
- Teste para a Diferença entre Proporções.

Para a análise de possível associação entre duas variáveis contínuas foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson.

O gráfico utilizado na análise de sobrevivência global foi a curva Kaplan-Meier.

Para todos os testes estatísticos foi considerado como nível mínimo de significância um valor de  $p < 0,05$ .



## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO ONCOGENE *MYCN*

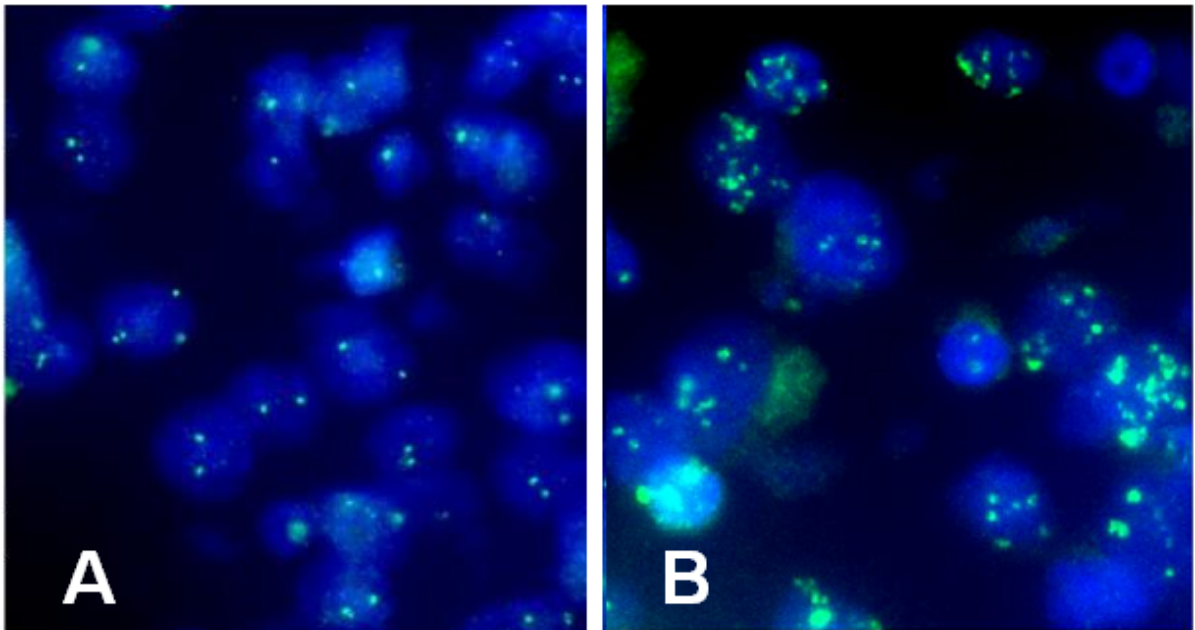
Quarenta e cinco casos de neuroblastoma, atendidos entre janeiro de 1990 e dezembro de 2000, foram analisados pela técnica de FISH (uma lâmina/tumor). A eficácia da hibridização das lâminas foi de 75,55%, sendo possível a obtenção de resultados satisfatórios por esta análise em 34 pacientes. Nos demais 11 casos não foi possível a interpretação por FISH, devido à qualidade inadequada da hibridização (sinais fluorescentes não específicos ou de baixa intensidade).

Dezesseis (47%) pacientes (3, 6, 10, 13, 15, 20, 22, 26, 27, 29, 37, 38, 39, 40, 43 e 45) apresentaram amplificação do oncogene *MYCN*. Os demais não apresentaram alteração do número de cópias deste gene (Tabela 8).

A Figura 3A ilustra núcleos interfásicos de um neuroblastoma (paciente 5) que apresenta 2 sinais verdes fluorescentes em cada núcleo interfásico mostrando, portanto o *MYCN* não amplificado.

A Figura 3B é representativa da análise por FISH do paciente 13, demonstrando vários sinais fluorescentes (mais de 10 cópias do gene) em núcleos interfásicos individuais, indicando, portanto, amplificação do oncogene *MYCN*.

FIGURA 3 - A - AUSÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO DO ONCOGENE *MYCN*  
B – AMPLIFICAÇÃO DO ONCOGENE *MYCN*

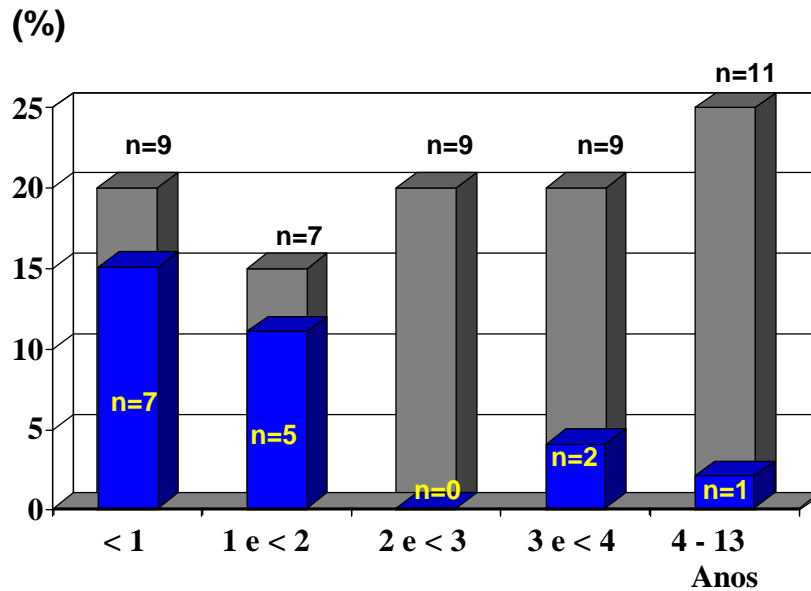


#### 4.2 COMPARAÇÃO ENTRE IDADE E SOBREVIDA DOS PACIENTES

Quinze dos 45 pacientes sobreviveram, 29 foram a óbito por progressão da doença e um paciente faleceu em consequência de complicação após a cirurgia.

A distribuição de pacientes em 5 faixas etárias com os correspondentes percentuais de sobrevidas está descrita na Figura 4.

FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DE FAIXA ETÁRIA (CINZA) E SOBREVIDA (AZUL).



Dos pacientes menores de 1 ano de idade, 78% sobreviveram (7/9); os que foram a óbito (n=2) a sobrevida média e mediana foi de 2 meses com desvio padrão de 1,41 meses.

A sobrevida global mínima de 4 anos (até o final de 2004) e máxima de 15 anos (desde 1990) foi de 25% (8/36) para os pacientes com idade igual ou maior a 1 ano, os que foram a óbito apresentaram sobrevida média de 23,57 meses com desvio padrão de 27,49 meses e mediana de 14 meses.

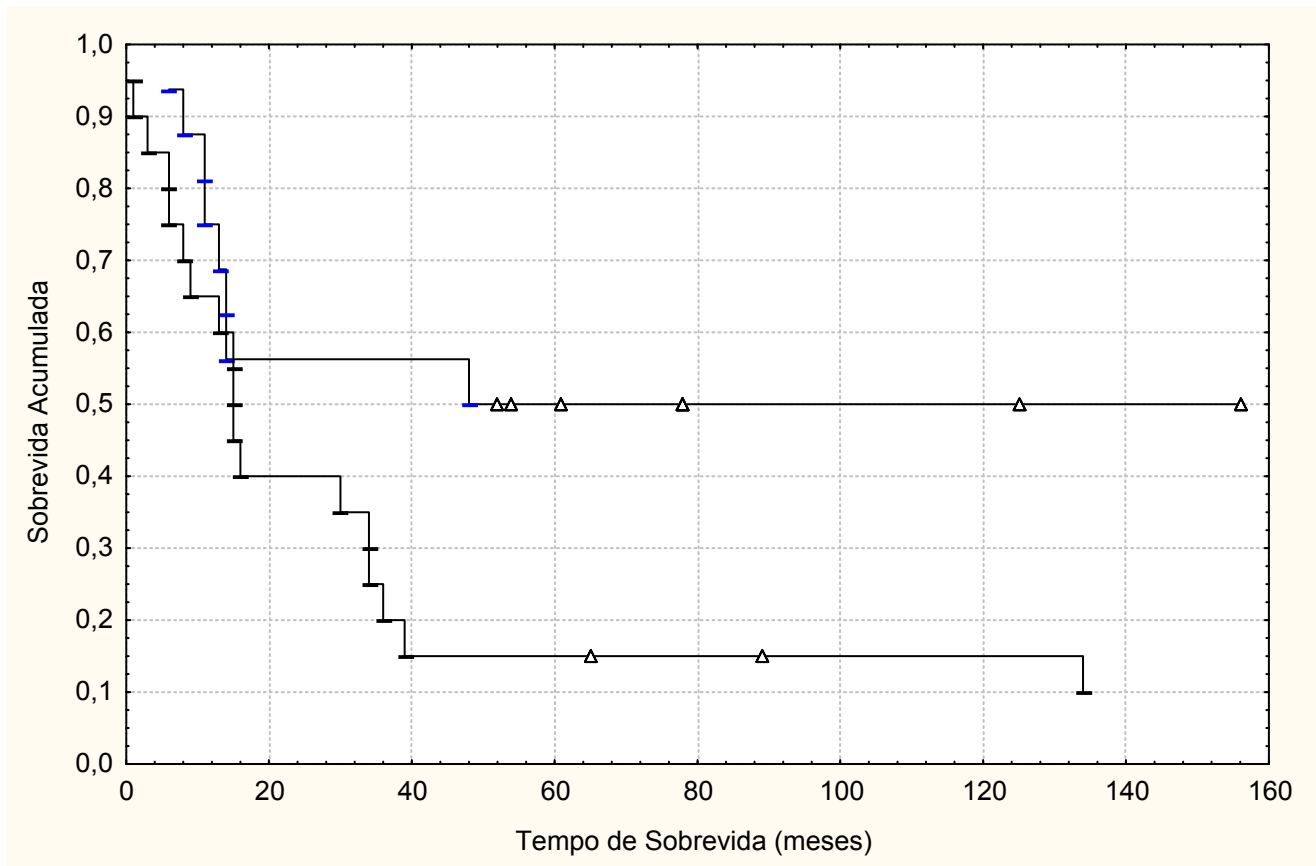
Houve um maior número de óbitos no grupo com idade maior ou igual a 1 ano em relação ao grupo com idade menor que 1 ano ( $p=0,038$ ), pelo teste Exato de Fisher. Notou-se uma sobrevida máxima de 156 meses, mínima de 1 mês, obtendo-se uma sobrevida média de 40,88 meses e mediana de 34 meses.

#### 4.3 COMPARAÇÃO ENTRE SOBREVIDA DOS PACIENTES E ESTADIAMENTO TUMORAL

A Figura 5 apresenta a sobrevida global de acordo com o estadiamento (estádios 3 e 4) através da curva de Kaplan-Meier.

A sobrevida dos pacientes nos estádios 1, 2, 3, 4 e 4S foi 100% (2/2), 50% (3/6), 50% (8/16), 10% (2/20) e 0% (n=1), respectivamente, com valor de  $p=0,09$ .

FIGURA 5 - SOBREVIDA DOS PACIENTES DE ACORDO COM OS ESTÁDIOS 3 E 4



Representação da sobrevida dos pacientes com estádios 3 (\_\_\_) e 4 (----). O estágio 1 apresentou 100% de sobrevida e o estágio 2 devido ao pequeno número de pacientes não permitiu a inclusão na curva de Kaplan-Meier.

#### 4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE O ONCOGENE *MYCN*, PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS.

Entre os pacientes (n=16) que apresentaram amplificação do *MYCN*, 81% (13/16) correspondiam a estádios avançados (3 e 4). No entanto, em nenhum dos testes estatísticos empregados, a sobrevida destes pacientes foi superior ao número de pacientes com estádios 3 e 4 que não apresentaram amplificação para este oncogene (n=14).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com *MYCN* amplificado e não amplificado, em relação aos seguintes parâmetros: grau de diferenciação do neuroblastoma (indiferenciado, pouco diferenciado, em diferenciação e ganglioneuroblastoma), tratamento (pré e pós-quimioterapia), estadiamento (1, 2, 3, 4 e 4S), radioterapia, idade (menores ou igual a 1 ano e maiores de 1 ano), sexo (masculino e feminino), localização de massa tumoral (supra-renal, mediastino, linfonodos e outros locais), avaliadas pelos testes Exato de Fisher (bilateral) e do Qui-quadrado de Pearson.

Entretanto, notou-se, pelo teste para diferenças entre as proporções, resultados significativos ( $p < 0,05$ ) para as seguintes associações:

- Dos meninos com *MYCN* amplificado (11 de um total de 20 com dados de FISH) apenas um sobreviveu (8%, 1/11). Esta proporção de vivos do sexo masculino foi inferior a do sexo feminino com *MYCN* amplificado, onde 5 meninas com amplificação deste oncogene (de um total de 14 meninas com dados de FISH), 3 sobreviveram (60%). No entanto, através do teste de Fisher foi obtido um valor de  $p = 0,06$ , em relação a esta diferença, sugerindo que com um número maior de casos, provavelmente esta diferença apresentaria um valor estatisticamente significativo. Todos os meninos com *MYCN* amplificado e histologia desfavorável ( $n=4$ ) foram a óbito.
- Dos meninos com *MYCN* amplificado que foram a óbito, a proporção com idade abaixo de 1 ano (10%, 1/10) foi inferior ao grupo com idade acima de 1 ano (90%, 9/10).

#### 4.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO TUMORAL NA ADRENAL, IDADE E ÓBITO

O percentual de pacientes com tumores localizados na adrenal para todas as idades foi de 46% (21/45). O grupo de pacientes com localização tumoral na adrenal com idade abaixo de 1 ano que foram a óbito (33%, 2/6) foi inferior ao grupo com idade superior a 1 ano (80%, 12/15) ( $p=0,027$  pelo teste Exato de Fisher).

continua

TABELA 8 - PARÂMETROS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DOS PACIENTES COM NEUROBLASTOMA

Paciente	Idade (meses)	Sexo	Estádio	RT	QT	Óbito	Sobrevida (meses)	Local do tumor	Tu1°/ Mx	Tratamento (pré/pós QT)	Grau de diferenciação	INPC	Amplificação do <i>MYCN</i>
1	10	M	1	Não	Não	Não	54	SR	Tu	Pré	Pouco diferenciado	F	-
2	37	F	3	Não	Sim	Não	78	SR	Tu	Pré	Em diferenciação	F	NA
3	1	F	4S	Não	Sim	Sim	1	Fígado	Mx	Pré	Pouco diferenciado	NA	+
4	31	F	2	Não	Sim	Sim	3	SR	Tu	Pré	Em diferenciação	F	NA
5	8	M	2	Não	Sim	Não	76	SR	Tu	Pré	Em diferenciação	F	-
6	13	F	4	Sim	Sim	Sim	8	SR	Tu	Pré	Pouco diferenciado	F	+
7	17	F	3	Não	Sim	Não	78	SR	Tu	Pré	Em diferenciação	F	-
8	3	M	2	Não	Sim	Não	89	LN	Tu	Pré	Em diferenciação	F	-
9	47	M	2	Não	Sim	Sim	71	SR	Tu	Pré	Em diferenciação	F	NA
10	20	F	4	Não	Sim	Não	89	SR	Tu	Pré	Pouco diferenciado	F	+
11	46	M	3	Sim	Sim	Sim	14	SR	Tu	Pré	Em diferenciação	F	-
12	33	M	4	Não	Sim	Sim	6	SR	Tu	Pós	Pouco diferenciado	NA	-
13	156	M	3	Não	Sim	Sim	48	Mediastino	Tu	Pré	Indiferenciado	D	+
14	34	M	4	Não	Não	Sim	1	LN	Mx	Pré	Em diferenciação	NA	NA
15	16	M	3	Não	Sim	Não	125	LN	Mx	Pós	Em diferenciação	NA	+
16	3	F	4	Não	Sim	Sim	3	Partes moles	Mx	Pré	Pouco diferenciado	NA	-
17	88	M	3	Não	Sim	Sim	8	LN	Mx	Pré	Em diferenciação	D	NA
18	64	M	4	Sim	Sim	Sim	13	LN	Mx	Pós	Pouco diferenciado	D	-
19	81	M	3	Sim	Sim	Sim	14	SR	Tu	Pós	Pouco diferenciado	D	-
20	120	M	3	Sim	Sim	Sim	6	SR	Tu	Pré	Em diferenciação	D	+
21	120	F	3	Sim	Sim	Não	52	SR	Tu	Pré	Pouco diferenciado	D	-
22	13	M	4	Não	Sim	Sim	1	LN	Mx	Pré	Em diferenciação	NA	+
23	41	M	3	Não	Sim	Não	61	SR	Tu	Pré	Em diferenciação	F	NA

Paciente	Idade (meses)	Sexo	Estádio	RT	QT	Óbito	Sobrevida (meses)	Local do tumor	Tu1°/ Mx	Tratamento (pré/pós QT)	Grau de diferenciação	conclusão	
												INPC	Amplificação do MYCN
24	47	F	4	Sim	Sim	Sim	134	SR	Mx	Pós	Em diferenciação	NA	NA
25	53	M	4	Sim	Sim	Sim	30	SR	Tu	Pós	Em diferenciação	NA	NA
26	41	M	3	Sim	Sim	Sim	13	SR	Tu	Pós	Em diferenciação	NA	+
27	26	M	4	Não	Sim	Sim	14	SR	Tu	Pós	Em diferenciação	NA	+
28	25	M	4	Não	Sim	Sim	16	LN	Mx	Pré	Indiferenciado	NA	-
29	33	M	2	Sim	Sim	Sim	49	SR	Tu	Pós	Pouco diferenciado	NA	+
30	39	M	4	Não	Sim	Sim	6	SR	Tu	Pós	Em diferenciação	NA	NA
31	11	F	4	Sim	Sim	Não	65	LN	Mx	Pós	Em diferenciação	NA	-
32	3	F	3	Não	Sim	Não	156	Mediastino	Tu	Pré	Pouco diferenciado	F	NA
33	26	F	4	Não	Sim	Sim	15	LN	Mx	Pós	GNB	NA	-
34	46	M	4	Não	Sim	Sim	9	Cérebro	Mx	Pré	Pouco diferenciado	NA	-
35	8	F	3	Não	Sim	Não	54	Partes moles	Mx	Pós	Indiferenciado	NA	-
36	38	F	4	Não	Sim	Sim	36	MO	Mx	Pré	Pouco diferenciado	NA	NA
37	27	F	4	Não	Sim	Sim	39	Cérebro	Mx	Pós	Pouco diferenciado	NA	+
38	33	F	2	Não	Sim	Não	60	LN	Mx	Pré	Pouco diferenciado	NA	+
39	51	M	4	Não	Sim	Sim	15	TN	Mx	Pós	Pouco diferenciado	NA	+
40	77	M	4	Não	Sim	Sim	15	SR	Tu	Pós	Em diferenciação	D	+
41	51	F	4	Sim	Sim	Sim	34	LN	Mx	Pré	Pouco diferenciado	NA	-
42	60	F	3	Não	Sim	Sim	11	SR	Tu	Pré	Indiferenciado	D	-
43	11	F	3	Não	Sim	Não	78	SR	Tu	Pré	Em diferenciação	D	+
44	16	F	1	Não	Sim	Não	61	LN	Mx	Pós	GNB	NA	-
45	26	M	3	Sim	Sim	Sim	11	SR	Tu	Pós	Pouco diferenciado	D	+

NOTA: \*QT= quimioterapia; RT= radioterapia; Tu 1°= tumor primário; Mx= metástase; MO= medula óssea; LN= linfonodo; TN= tecido nervoso.

\* INPC= Classificação Internacional de Patologia do Neuroblastoma; NA= não aplicável, F= histologia favorável, D= histologia desfavorável.

#### 4.6 ASSOCIAÇÃO ENTRE LOCALIZAÇÃO TUMORAL NA SUPRA-RENAL IDADE, SEXO MASCULINO E ÓBITO

Os dois pacientes do sexo masculino com tumores localizados na adrenal com idade abaixo de 1 ano estão vivos há mais de 4 anos. No entanto, apenas um paciente (8%) do sexo masculino com estágio 3 e idade igual ou acima de 1 ano (n=13) está vivo. Esta diferença foi significativa pelo teste Exato de Fisher ( $p=0,028$ ).

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando foi feita a mesma associação para pacientes do sexo feminino.

#### 4.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE A INPC E ÓBITO

Observou-se pelo teste Exato de Fisher, que os pacientes que tinham histologia desfavorável (n=10) apresentaram pior prognóstico (80% de óbitos) em contraste com os que tinham histologia favorável (33%, 4/12) apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,037$ ).



## 5 DISCUSSÃO

O neuroblastoma é uma neoplasia infantil que pode ser melhor classificada com estratificação de menor ou maior risco para se definir uma terapia menos ou mais agressiva (CASTLEBERRY et al., 1997). Ainda não está claro o papel de alguns marcadores identificados através de testes moleculares, os quais normalmente não estão disponíveis na maioria dos serviços de oncologia pediátrica no Brasil. Acredita-se que os melhores marcadores moleculares relacionados a um prognóstico desfavorável do neuroblastoma são amplificação do oncogene *MYCN* (SEEGER et al., 1985), perda de provável gene de supressão tumoral localizado em 1p36 (GODFRIED et al., 2002) e aumento na expressão da proteína tirosina quinase B (*NTRK2*) (NAKAGAWARA, 2001). Destes, a amplificação do oncogene *MYCN* parece ser o mais importante evento biológico, sendo o primeiro marcador genético empregado na oncologia pediátrica como guia para decisões terapêuticas (PÉREL et al., 2004).

É essencial para o tratamento do neuroblastoma, através da utilização das técnicas disponíveis, a identificação da amplificação do oncogene *MYCN*. A análise quantitativa do gene pode ser realizada pelo método de *Southern blotting*, apesar deste não permitir a detecção da heterogeneidade intratumoral (TANAKA, et al., 2004). Outra análise quantitativa que pode ser utilizada é o PCR em tempo real (RT-PCR) que tem a capacidade de detectar um pequeno número de células amplificadas do *MYCN*, que não poderia ser encontrado pelo método de *Southern blotting*. Já o método de FISH permite avaliar a amplificação do oncogene *MYCN* em células individuais do neuroblastoma, revelando diretamente o número de cópias por célula analisada e permitindo, portanto, a avaliação da heterogeneidade intra e intertumoral (YOSHIMOTO et al., 1999 e SARTELET et al., 2002).

O presente trabalho foi idealizado com o objetivo principal de analisar se esta informação (presença ou ausência de amplificação do oncogene *MYCN*), associada ou não a parâmetros clínicos e histopatológicos, podem prever o prognóstico de pacientes portadores de neuroblastoma no Paraná. O benefício desta informação e destes investimentos seria repassado para os novos casos de neuroblastoma, disponibilizando a avaliação da presença ou ausência do oncogene *MYCN*, pela técnica de FISH, na rotina do CEGEMPAC (Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças). Esta informação, associada a outros parâmetros

que determinam o prognóstico, atualmente utilizados, teria um papel imprescindível na escolha da terapêutica apropriada a ser adotada, de acordo com a estratificação de riscos (Tabela 5), conseqüentemente melhorando a sobrevida destas crianças portadoras de neuroblastoma.

A amplificação do oncogene *MYCN* é encontrada em 20-30% dos pacientes com neuroblastoma, analisados por FISH (BRODEUR, 1995; SARTELET et al., 2002 e PÉREL et al., 2004). Neste estudo, a amplificação do oncogene *MYCN* foi encontrada em 47% (16/34) dos casos analisados, uma freqüência superior à obtida nos estudos anteriores. Isto pode ser devido ao tamanho pequeno da amostra ou pela presença de um maior número de pacientes em estádios avançados. YOSHIMOTO et al. (1999), numa avaliação por FISH em 17 casos de São Paulo (incluindo todos os estádios), encontrou uma freqüência de amplificação de *MYCN* relativamente elevada (41%), encontrada somente em estádios 3 e 4. Na casuística do Paraná, do presente estudo, houve 80% (36/45) de neuroblastomas com estádios avançados (3 e 4) e 80% (36/45) com idade igual ou acima de um ano, sugerindo diagnóstico tardio, justificando assim o percentual maior de amplificação. Estas maiores proporções de estádios mais avançados e de faixa etária acima de um ano poderiam ser questionadas devido ao tamanho da amostragem (n=45). Neste sentido, na pequena casuística de São Paulo, (YOSHIMOTO et al., 1999) também foi encontrado num total de 20 pacientes, estádios avançados (3 e 4) em 75% (15/20) dos casos e 75% (15/20) de crianças com idade igual ou superior a 1 ano. As instituições envolvidas nestes estudos de São Paulo e do Paraná recebem todos os casos de neuroblastoma e não somente os mais complicados. Em contraste com outros estudos (RUBIE et al., 1997 e SCHILLING et al, 2002), aproximadamente 50% das crianças com neuroblastoma têm estádios avançados. Em relação à idade ao diagnóstico, um estudo da França entre 1950 e 1996 (época com maior probabilidade de atraso no diagnóstico do que a dos casos do Paraná, entre 1990 e 2000) já descrevia que apenas 30% dos casos são diagnosticados abaixo de 1 ano (SHOJAEI-BROSSEAU et al., 2004). Os dados americanos reportados pelo SEER (*Surveillance, Epidemiology, End Results*) pelo NCI (*National Cancer Institute*), 1999, referentes ao período 1975-1995, e pelo NCI em 2004, referentes ao período 1975-2001 mostram um pico de diagnóstico para o neuroblastoma no primeiro ano de vida, que diminui dramaticamente nos anos seguintes, ficando no patamar mais

baixo após os 5 anos de idade. O que foi demonstrado na Figura 4 é uma distribuição de diagnóstico para idades mais avançadas, sem o esperado pico nos primeiros dois anos de vida. Logo, ambos os estudos do Brasil (São Paulo e Curitiba) indicam haver diagnóstico tardio pela idade e pelo estadiamento. Pode-se sugerir que os motivos são o baixo nível de escolaridade da população e/ou atraso no encaminhamento do pediatra para as instituições que tratam câncer pediátrico.

É discutível se o neuroblastoma diagnosticado em estádios avançados é de fato originado de estádios iniciais ou representa um subgrupo diferente. Este argumento foi previamente discutido por WESTWEMANN e SCHWAB (2002). Segundo BRODEUR et al. (1997), a transição de um estágio inicial para outros mais avançados ocorre, porém é raro. A amplificação do oncogene *MYCN* é encontrada em 30 a 40% no estágio 4 (RUBIE et al. 1997 e SCHILLING et al., 2002) em contraste com 5 a 10% em casos dos pacientes com doença localizada ou 4S (COHN, 1999). No presente estudo, foi encontrada uma frequência de 43% (7/16) de pacientes com amplificação do *MYCN* no estágio 4, semelhante aos dados descritos acima. Desta forma, pode-se argumentar que como a amplificação do *MYCN* ocorre com maior frequência nos casos avançados, é possível que a amplificação seja um evento que poderia surgir a partir de um tumor ainda sem amplificação (num estágio inicial ou avançado), porém isto não foi confirmado até o momento.

Nos pacientes do Paraná incluídos neste estudo, foi encontrado 25% de sobrevida entre os que apresentaram amplificação do oncogene *MYCN* (n=16); correspondendo a 1 paciente com *MYCN* amplificado de 3, para os estádios de prognóstico favorável (2 e 4S) e 3 pacientes de 14 com estádios avançados (3 e 4). Entretanto, o achado de amplificação não influenciou na taxa de sobrevida em relação aos tumores sem amplificação neste estudo. Na literatura, a presença de amplificação deste oncogene é indicadora de prognóstico desfavorável (SEEGER et al., 1985 e PÉREL et al., 2004). Todas as associações entre *MYCN* amplificado e não amplificado e outros parâmetros, como idade (menores e maiores ou igual a 1 ano), sexo (masculino e feminino), grau de diferenciação do neuroblastoma (indiferenciado, pouco diferenciado, em diferenciação e ganglioneuroblastoma), tratamento (pré e pós-quimioterapia), estadiamento (1, 2, 3, 4 e 4S), radioterapia, localização de massa tumoral (supra-renal, mediastino, linfonodos e outros locais), avaliadas pelos testes Exato de Fisher (bilateral) e

do Qui-quadrado de Pearson não foram estatisticamente significativas neste estudo. É possível que estes resultados sejam decorrentes do pequeno número de casos estudados.

RUBIE e colaboradores do grupo francês (1997), realizaram um estudo entre 1990 a 1994 com 316 crianças com neuroblastoma apenas com doença localizada (sem metástases), para avaliar a sobrevida e influência da amplificação do *MYCN* em relação ao prognóstico. A sobrevida global dos pacientes com *MYCN* amplificado foi de 36% e a sobrevida livre de eventos (em um período de 5 anos) de 32%. Com base nestes resultados os autores atribuíram a presença de amplificação do oncogene *MYCN* a um prognóstico adverso. Porém, os próprios autores sugerem estudos simultâneos e prospectivos com associação de outros fatores biológicos para esclarecer o papel do *MYCN*.

Uma importante classificação histopatológica internacional para o neuroblastoma (INPC) estabelecida por SHIMADA et al. (1999) baseia-se na presença ou ausência de amplificação do oncogene *MYCN*, para definir a estratificação dos grupos de riscos, tratamento e prognóstico das crianças com este tipo de câncer. Um estudo foi realizado com 628 tumores neuroblásticos, entre eles 535 neuroblastomas provenientes do CCG (*Children's Cancer Group*) entre os meses de agosto de 1991 a agosto de 1995. Estes tumores foram avaliados quanto à histologia (favorável e desfavorável) e presença ou ausência de amplificação do *MYCN* (GOTO et al., 2001). Destes pacientes, 339 apresentaram histologia favorável e *MYCN* não amplificado, com uma sobrevida livre de eventos em 5 anos de 92,1%; 8 tinham histologia favorável e *MYCN* amplificado com sobrevida de 37,5%; 172 tinham tumores com histologia desfavorável e *MYCN* não amplificado com sobrevida de 40,9% e 109 tinham histologia desfavorável com *MYCN* amplificado com sobrevida de 15%. Comparando-se os dados a este estudo, observou-se que os pacientes que apresentavam histologia desfavorável (n=10) evoluíram significativamente com pior prognóstico (20% de sobrevida) em contraste com os que tinham histologia favorável (67%, 8/12) (p= 0,037). Todos os pacientes (n=4) com *MYCN* amplificado e histologia desfavorável foram a óbito. Entretanto a presença ou ausência da amplificação do *MYCN* associada à histologia (favorável e desfavorável) não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à sobrevida deste pacientes, provavelmente devido à pequena casuística deste estudo.

Comparando a taxa de sobrevida com o estudo de IKEDA et al. (2002) que demonstraram uma sobrevida em torno de 95% para histologia favorável e 60% para histologia desfavorável, a taxa de sobrevida do presente estudo foi inferior em ambas as situações. WEINSTEIN, KATZENSTEIN e COHN (2003) também observaram que os neuroblastomas com histologia desfavorável são mais agressivos e estão intrinsecamente associados à amplificação do *MYCN*. KATZENSTEIN et al. (1998) observaram que lactentes com estágio 4S e histologia favorável com *MYCN* amplificado deveriam ser tratados com protocolos de alto risco de quimioterapia e transplante. Por outro lado, lactentes com estágio 4S com diploidia e/ou histologia desfavorável deveriam ser classificados como risco intermediário e tratados com multiagentes quimioterápicos e ressecção cirúrgica. A amplificação do *MYCN* foi correlacionada com pior prognóstico somente em tumores quase-diplóide e não triplóides.

Notou-se uma associação entre amplificação do *MYCN*, sexo masculino e evolução desfavorável nos pacientes com neuroblastoma, o que não foi previamente descrito. Apenas uma criança do sexo masculino com *MYCN* amplificado (n=11) sobreviveu (8%). Houve óbito em 100% dos meninos (n=4) com *MYCN* amplificado e histologia desfavorável. Todas estas associações sugerem que há uma tendência (nestas crianças avaliadas), do sexo masculino com amplificação do *MYCN* apresentarem um pior prognóstico. Novamente, comparando ao estudo de São Paulo, YOSHIMOTO et al. (1999) demonstraram que a amplificação do *MYCN* foi encontrada em 5 de 12 meninos (41%) e todos (5/5, 100%) foram a óbito. No sexo feminino, a amplificação do *MYCN* foi encontrada em 2 das 8 meninas (25%) e apenas uma (1/2, 50%) foi a óbito. Neste estudo do Paraná, os dados foram semelhantes, com *MYCN* amplificado encontrado em 11 de 20 meninos (55%) e 10/11 (90%) foram a óbito, e 5 de 14 meninas (35%) e 2/5, (40%) foram a óbito. No entanto, esta diferença de sobrevida foi significativa pelo teste da diferença entre as proporções (p=0,04), porém não pelo teste Exato de Fisher (p=0,06). A compilação de dados de São Paulo e do Paraná, associados, demonstra que pelo teste de Fisher a diferença entre meninos e meninas com amplificação de *MYCN* foi estatisticamente significativa (p=0,017). Independente da sobrevida, nota-se nestes dois estudos (São Paulo e Curitiba) que há um predomínio de amplificação de *MYCN* no sexo masculino (juntos, apresentam 16 de 32 meninos, 50%) comparado

ao feminino 7/22 (31%). Esta diferença não foi previamente descrita e necessitaria de uma compilação de outros centros para avaliar se realmente é verdadeira esta hipótese. A citação da literatura em relação ao sexo não se relaciona à amplificação de *MYCN*, apenas relata a discreta prevalência do sexo masculino em relação ao feminino (1,2:1) nos neuroblastomas (GOODMAN et al., 1999 e BRODEUR; MARIS, 2002), semelhante ao encontrado neste estudo do Paraná (25 meninos/20 meninas). Não há, até o momento, uma explicação biológica que pudesse justificar maior tendência do sexo masculino a apresentar amplificação de *MYCN* e maior risco de óbito. Os achados do presente estudo em relação à amplificação de *MYCN* no sexo masculino apenas consideram a necessidade de um estudo multicêntrico, controlado, para confirmar estes dados, e posteriormente, considerar a possibilidade de estudos *in vitro* mais específicos.

Neste trabalho, observou-se que os pacientes com idade inferior a 1 ano (20% dos casos) tiveram melhor prognóstico em relação aos com idade superior ou igual a 1 ano (80% dos casos), resultando em uma sobrevida de 78% e 25% respectivamente com  $p=0,03$  pelo teste Exato de Fisher. BRODEUR, em 1995 mostrou previamente que os pacientes menores que 1 ano apresentavam melhor prognóstico quando comparados aos maiores de 1 ano de idade. Uma evolução favorável foi observada em casos que apresentavam doença disseminada e foram tratados com quimioterapia e cirurgia associada (WEINSTEIN; KATZENSTEIN; COHN, 2003). Estes dados foram obtidos a partir de triagens neonatais que foram realizados com o objetivo de diagnosticar precocemente e reduzir a mortalidade de crianças com neuroblastoma. Os pioneiros deste *screening* neonatal foram os japoneses, que desde 1980, vem demonstrando que o neuroblastoma pode ser detectado pelas catecolaminas aumentadas presentes na urina. Porém, este estudo não foi realizado de forma controlada e muitos destes tumores diagnosticados regrediram espontaneamente, sem qualquer tipo de tratamento. Na Alemanha e na América do Norte foram realizados dois estudos prospectivos controlados. Estes estudos demonstraram que a triagem dos lactentes com neuroblastoma com 3 semanas, 6 meses ou 1 ano não reduziu a mortalidade nestes pacientes. Outros estudos foram repetidos no Japão, Áustria, França, Inglaterra e Canadá, sendo obtidos os mesmos resultados dos grupos anteriores (SCHILING et al., 2002; ROSS e DAVIES, 1999; MATSUGANA et al., 2000 e KERBL et al., 2003).

Este tipo de triagem neonatal ainda não foi realizado no Brasil, uma vez que mundialmente não contribuiu para diminuir a mortalidade das crianças com neuroblastoma. Entretanto, se há o problema de atraso ao diagnóstico no Brasil, levando a estádios avançados e aumento da idade ao diagnóstico, talvez uma triagem numa faixa etária mais ampla (1-3 anos) melhoraria a sobrevida dos pacientes com neuroblastoma no Paraná.

A sobrevida dos pacientes com neuroblastoma, em geral tem melhorado com o uso de combinações quimioterápicas e doses mais efetivas. MOTT et al. (1997), apresentaram um estudo da Inglaterra com 20 anos da *United Kingdom Children's Cancer Study Group*, relacionado ao aumento da sobrevida significativo dos neuroblastomas, sendo que a sobrevida foi de 33% de 1977-1981; 46% de 1982-1986; 49% de 1987-1990 e 54% de 1991-1994, demonstrando que houve progresso no tratamento. Segundo os dados do SEER, nos Estados Unidos a sobrevida em 5 anos (1985-1994) dos lactentes com neuroblastomas foi de 83%; em crianças de 1 a 4 anos, 55%, e em crianças de 5 a 9 anos, 40% (GOODMAN et al., 1999). Comparando com os resultados do presente estudo, observou-se que a sobrevida dos lactentes é semelhante à americana, contudo nas crianças com idade superior a um ano de idade, a sobrevida geral foi inferior à da literatura americana e inglesa, provavelmente devido ao diagnóstico tardio e diferentes protocolos de tratamento. Um dos motivos para diferenças nos protocolos de tratamento é a não utilização da estratificação de riscos conforme os marcadores moleculares, principalmente o *MYCN*.

O estadiamento associado à sobrevida, neste estudo, apresentou uma tendência a significância pelo teste do Qui-quadrado de Pearson com  $p=0,09$ . O único paciente com estágio 4S foi a óbito, os pacientes do estágio 1 apresentaram sobrevida de 100%, os do estágio 2 e 3 de 50% e do estágio 4 de 10%. Num estudo do CCG, MATHHAY et al. (1999), demonstraram que a sobrevida livre de eventos em um período de 3 anos em pacientes randomizados com neuroblastomas de alto risco foi superior com transplante autólogo de medula óssea (34%) comparada à quimioterapia convencional (22%). Entretanto, apesar do transplante ter prolongado a sobrevida dos pacientes, não foi observada redução da mortalidade (BRODEUR; MARIS, 2002). No presente estudo, em apenas uma paciente foi realizado transplante autólogo e ela está curada.

PÉREL et al. (2004) através de um estudo de revisão sobre o prognóstico dos neuroblastomas (POG, CCG e COG) constataram que a sobrevida por estadiamento relacionado à idade foi idêntica nos estádios 1, 2A e 2B (85-95%) e 3 (70-90%), diferindo apenas no estágio 4. Nos lactentes a sobrevida foi de 60-70% e nas outras crianças de 25-35%. No estágio 4S a sobrevida foi de 80-90%. Comparando os dados com o presente estudo, como só havia 1 paciente com estágio 4S a análise ficou prejudicada. A sobrevida nos demais foi semelhante no estágio 1, um pouco inferior nos estádios 2 e 3 e muito inferior no estágio 4.

MATHHAY et al. (1998), realizaram um estudo baseado no CCG (de junho de 1989 a agosto de 1995) avaliando o prognóstico do estágio III de Evans (semelhante ao estágio 3 do INSS), em 228 pacientes com neuroblastoma. Pacientes de alto e baixo risco foram comparados, sendo observado uma sobrevida livre de eventos em 4 anos de 80%. Este percentual foi superior ao observado neste estudo, entretanto, não houve um protocolo de tratamento diferenciado baseado numa estratificação de alto e baixo risco. Por exemplo, os pacientes que foram estadiados como baixo risco com amplificação do *MYCN* poderiam ter recebido um tratamento quimioterápico mais agressivo.



## 6 CONCLUSÃO

1. O oncogene *MYCN* não influenciou no prognóstico dos pacientes com neuroblastoma
2. O percentual de pacientes com amplificação do oncogene *MYCN* (47%, 16/34) foi maior que o descrito na literatura, provavelmente em função do maior número de estádios 3 e 4.
3. A amplificação do *MYCN* está associada a prognóstico desfavorável em pacientes do sexo masculino.
4. A histologia desfavorável foi preditiva de pior prognóstico em relação à amplificação do *MYCN* e todos os outros parâmetros clínicos analisados.
5. Todos os pacientes do sexo masculino com *MYCN* amplificado e histologia desfavorável foram a óbito.
6. Idades e estádios mais avançados ocorreram com maior frequência no Paraná do que nos Estados Unidos e Europa, provavelmente devido ao diagnóstico tardio.
7. Os lactentes apresentaram melhor prognóstico comparado aos pacientes com idade igual a ou superior a um ano de idade.

## REFERÊNCIAS

ADINOLFI, M.; DAVIS, A. F. **Applications to clinical diagnosis and molecular genetics**. 3ª ed. Austin, RG Landes, 1994.

BLANCATO, J. K.; HADDAD, B. R. **Medical Cytogenetics**. Hon Fong L. Mark, Marcel Dekker, 2000.

BLATT, J.; WHARTON, V. Stimulation of growth of neuroblastoma cells by ferritin in vitro. **J Lab Clin Med**, v. 119, n.2, p. 139-142, 1992.

BOON, K.; CARON, H. N.; van ASPEREN, R.; VALENTIJN, L.; HERMUS, M-C.; van SLUIS, P.; ROOBEEK, I.; WEIS, I.; VOÛTE, P. A.; SCHWAB, M.; VERSTEEG, R. N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 6, p. 1383-1393, 2001.

BOURHIS, J.; DOMINICI, C.; MCDOWELL, H.; RASCHELLA, G.; WILSON, G.; CASTELLO, M. A.; PLOUVIER, E.; LEMERLE, J.; RIOU, G.; BÉRNARD, J.; HARTMANN, O. N-MYC genomic content and DNA ploidy in stage IVS neuroblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 9, n. 8, p. 1371-1375, 1991.

BOWN, N.; COTERILL, S.; LASTOWSKA, M.; O'NEILL, S.; PEARSON, A. D. J.; PLANTAZ, D.; MEDDEB, M.; DANGLLOT, G.; BRINKSCHIMIDT, C.; CHRISTIANSEN, H.; LAUREYS, G.; SPELEMAN, F. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 1954-1961, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. **Sistema de informação sobre mortalidade 1979-1998**. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>> Acesso em: 12 dez. 2004.

BRODEUR, G. M. Clinical and biological aspects of neuroblastoma. In: VOLGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. **The genetic basis of human cancer**. McGraw-Hill, 1998, p. 691-705.

BRODEUR, G.M. Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastomas. **European Journal of Cancer**, v. 31A, n. 4, p. 505-510, 1995.

BRODEUR, GM.; MARIS, J.M. Neuroblastoma. In: PIZZO, P.A.; POPLACK, D.G. **Principles and practice of pediatric oncology**. Lippincott Williams and Wilkins, 2002, p. 895-937.

BRODEUR, GM.; MARIS, J.M.; YASHIRO, D.J.; HOGARTY, M.D.; WHITE, P.S. Biology and genetics of human neuroblastoma. **J Pediatr. Hematol. Oncol**, v. 19, n. 2, p. 93-101, 1997.

CAMARGO, B.; LOPES, L. F. **Pediatria oncológica**. São Paulo, 2000.

CAPPELLEN, D.; BERNARD, J. Pleiotropic over-expression of multidrug-resistance-related genes is correlated to MYCN and max mRNA accumulation during tumor progression in the IGR-N-91 human neuroblastoma model. **Int J Cancer**, v. 70, n. 4, p. 430-436, 1997.

CARON, H.; SLUIS, P.V.; KRAKER, J.; BOKKERINK, J.; EGELER, M.; LAUREYS, G.; SLATER, R.; WESTERVELS, A.; VOUTE, P. A.; VERSTEEG, R. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. **The New England Journal Medicine**, v. 334, p. 225-230, 1996.

CASTLEBERRY, R. P. Biologia e tratamento do neuroblastoma. In: **Clínicas pediátricas da América do Norte**. Copyright by W.B. Saunders company, 1997, v. 4, p. 927-941.

CASTLEBERRY, R. P.; PRITCHARD, J.; AMBROS, P.; BERTHOLD, F.; BRODEUR, G. M.; CASTEL, V.; COHN, S. L.; De BERNARDI, B.; DICKS-MIREAUX, C.; FRAPPAZ, D.; HAASE, G. M.; HABER, M.; JONES, D. R.; JOSHI, V. V.; KANEKO, M.; KEMSHEAD, J. T.; KOGNER, P.; LEE, R. E. J.; MATTHAY, K. K.; MICHON, J. M.; MONCLAIR, R.; ROALD, B. R.; SEEGER, R. C.; SHAW, P. J.; SHIMADA, H.; SHUSTER, J. J. The international neuroblastoma risk groups (INRG): a preliminary report. **European Journal of Cancer**, v. 33, n. 12: 2113-2116, 1997.

CHAN, H. L. C.; GALLIE, B. L.; DEBOER, G.; HADDAD, G.; IKEGAKI, N.; DIMITROLAKOS, J.; YEGER, H.; LING, V. MYCN protein as a predictor of neuroblastoma prognosis. **Clinical Cancer Research**, v. 3: 1699-1706, 1997.

COHEN, P. S.; SEEGER, R. C.; TRICHE, T. J.; ISRAEL, M. A. N-myc gene expression in neuroblastoma. **American Journal of Pathology**, v. 131, n. 3, p. 391-397, 1988.

COHN, S. L.; LOOK, A. T.; JOSHI, V. V.; HOLBROOK, T.; SALWEN, H.; CHAGNOVICH, D.; CHESLER, L.; ROWE, S. T.; VALENTINE, M. B.; KOMURO, H.; CASTLEBERRY, R. P.; BOWMAN, L. C.; RAO, P. V.; SEEGER, R. C.; BRODEUR, G. M. Lack of correlation of N-MYC gene amplification with prognosis in localized neuroblastoma: a pediatric oncology group study. **Cancer Research**, v. 55, p. 721-726, 1995.

CONH, S. L. Diagnosis and classification of the small round- cell tumors of childhood. **American Journal of Pathology**, v. 155, n. 1, p. 11-15, 1999.

CULLEN, K. J.; NEWKIRK, K. A.; SCHUMAKER, L. M.; ALDOSARI, N.; RONE, J. D.; HADADD, B. R. Glutathione S-transferase amplification is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and primary tumors. **Cancer Research**, v. 63, p. 8097-8102, 2003.

DESANDES, E.; CLAVEL, J.; BERGER, C.; BERNARD, J-L.; BLOUIN, P.; LUMLEY, L.; DEMEOCQ, F.; FREYCON, F.; GEMBARA, P.; GOUBIN, A.; GALL, E. L.; PILLON, P.; SOMMELET, D.; TRON, I.; LACOUR, B. Cancer incidence among children in France, 1990-1999. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 43, p. 749-757, 2004.

EISENMAN R., N. Deconstructing MYC. **Genes and development**, v. 15, p. 2023-2030, 2001.

EVANS, A. E. Neuroblastoma: a historical perspective (1864-1998). In: BRODEUR, G. M.; SAWADA, T.; TSUCHIDA, Y.; VOÛTE, P. **Neuroblastoma**. Elsevier Science, 2000, p. 1-7.

GARAVENTA, A.; BONI, L.; Lo PICCOLO, M. S.; TONINI, G. P.; GAMBINI, C.; MANCINI, A.; TONEGATTI, L.; CARLI, M.; Di MONTEZEMOLO, L.C.; Di CATALDO, A.; CASALE, F.; MAZZOCCO, K.; CECCHETTO, G.; RIZZO, A.; De BERNARDI, B. Localized unresectable neuroblastoma: results of treatment based on clinical prognostic factors. **Annals of Oncology**, v. 13, p. 956-964, 2002.

GODFRIED, M. B.; VEENSTRA, M.; VALENT, A.; SLUIS, P. V.; VOÛTE, P. A.; VERSTEEG, R.; CARON, H. N. Lack of interstitial chromosome 1p deletions in clinically-detected neuroblastoma. **European Journal of Cancer**, v. 38, p. 1513-1519, 2002.

GOLDSBY, R. E.; MATTHAY, K. K. Neuroblastoma: evolving therapies for a disease with many faces. **Pediatr Drugs**, v. 6, p. 107-122, 2004.

GOODMAN, M. T.; GURNEY, J. G.; SMITH, M. A.; OLSHAN, A. F. Sympathetic nervous system tumors. **SEER Pediatric Monograph**, 1999. Disponível em: <<http://www-seer.ims.nci.nih.gov>> Acesso em: 22 dez. 2004.

GOTO, S.; UMEHARA, S.; GERBING, R. B.; STRAM, D. O.; BRODEUR, G. M.; LUKENS, J. L.; MATTHAY, K.; SHIMADA, H. Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and MYCN status in patients with peripheral neuroblastic tumors. **Cancer**, v. 92, n. 10, p. 4699-2708, 2001.

GOZZETTI, A.; BEAU, M. M. L. Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. **Seminars in Hematology**, v. 37, n. 4, p. 320-333, 2000.

GUO, C.; WHITE, P. S.; WEIS, M. J.; et al. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastoma. **Oncogene**, v. 18, p. 4948-4957, 1999.

HAAS-KOGEN, D. A.; SWIFT, P. S.; SELCH, M.; HAASE, G. M.; SEEGER, R. C.; GERBING, R. B.; STRAM, D. O.; MATTHAY, K. K. Impact of radiotherapy for high-risk neuroblastoma: a children's cancer group study. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys**, v. 56, n. 1, p. 28-39, 2003.

HIYAMA, E.; HIYAMA, K.; YOKOYAMA, T.; FUKUBA, I.; YAMAOKA, H.; SHAY, J.W.; MATSURA, Y. Rapid Detection of MYCN gene amplification and telomerase expression in neuroblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 5, p. 601-609, 1999.

IKEDA, H. I.; IEHARA, T.; TSUCHIDA, Y.; KANEKO, M.; HATA, J.; NAITO, H.; IWAFUCHI, M.; OHNUMA, N.; MUGISHIMA, H.; TOYODA, Y.; HAMAZAKI, M.; MIMAYA, J.; KONDO, S.; KAWA, K.; OKADA, A.; HIYAMA, E.; SUITA, S.; TAKAMATSU, H. Experience with international neuroblastoma staging system and pathology classification. **Br J Cancer**, v. 86, n. 7, p. 1110-1116, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 7ª ed. São Paulo: Guanabara, 1990, p. 1-14.

KATZENSTEIN, H. M.; BOWMAN, L. C.; BRODEUR, G. M.; THORNER, P. S.; JOSHI, V. V.; SMITH, E. I.; LOOK, A. T.; ROWE, S. T.; NASH, M. B.; HOLBROOK, T.; ALVARADO, C.; RAO, P. V.; CASTLEBERRY, R. P.; COHN, S. L. Prognostic significance of age, MYCN oncogene amplification, tumor cell ploidy, and histology in 110 infants with stage D (S) neuroblastoma: the pediatric oncology group experience- a pediatric oncology group study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 6, p. 2007-2017, 1998.

KERBL, R.; URBAN, C. E.; AMBROS, I. M.; DORNBUSCH, H. J.; SCHWINGER, W.; LACKER, H.; LADENSTEIN, R.; STRENGER, V.; GADNER, H.; AMBROS, P. F. Neuroblastoma mass screening in late infancy: insights into the biology of neuroblastic tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 22, p. 4228-4234, 2003.

KRAKER, J.; HOEFNAGEL, C. A.; CARON, H.; VALDÉS OLMOS, R. A.; ZSIROS, J.; HEIJ, H. A.; VOÛTE, P. A. First line targeted radiotherapy, a new concept in the treatment of advanced stage neuroblastoma. **Eur J Cancer**, v. 31 A, n. 4, p. 600-602, 1995.

KRAMER, K.; CHEUNG, N-K. V.; GERALD, W. L.; LAQUAGLIA, M.; KUSHNER, B. H.; LECLERC, J-M.; LESAUTER, L.; SARAGOVI, H. U. Correlation of MYCN amplification, Trk-A and CD44 expression with clinical stage in 250 patients with neuroblastoma. **European Journal of Cancer**, v. 33, n. 12, p. 2098-2100, 1997.

LEVSKY, J. M.; SINGER, R. H. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 14, p. 2833-2838, 2003.

LOOK, A. T.; HAYES, F. A.; SCHUSTER, J. J.; DOUGLASS, E. C.; CASTLEBERRY, R. P.; BOWMAN, L. C.; SMITH, E. I.; BRODEUR, G. M. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-MYC gene amplification in childhood neuroblastoma: a pediatric oncology group study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 9, n. 4, p. 581-591, 1991.

MARIS, J. M.; GUO, C.; WHITE, P. S.; HOGARTY, M. D.; THOMPSON, P. M.; STRAN, D. O.; GUBING, R.; MATTHAY, K. K.; SEEGER, R. C.; BRODEUR, G. M. Allelic deletion at chromosome bands 11q14-23 is common in neuroblastoma. **Med. Pediatr. Oncol.** v. 36, p. 24-27, 2001.

MARIS, J. M.; MATTHAY, K. K. Molecular Biology of Neuroblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 2264-2279, 1999.

MATHEW, P.; VALENTINE, M. B.; BOWMAN, L.; ROWE, S. T.; NASH, M. B.; VALENTINE, V. A.; COHN, S. L.; CASTLEBERRY, R. P.; BRODEUR, G. M.; LOOK, T. Detection of MYCN gene amplification in neuroblastoma by fluorescence in situ hybridization: A pediatric oncology group study. **Neoplasia**, v. 3, n. 2, p. 105-109, 2001.

MATSUNAGA, T.; SHIRASAWA, H.; HISHIKI, T.; YOSHIDA, H.; KOUCHI, K.; OHTSUKA, Y.; KAWAMURA, K.; ETOH, T.; OHNUMA, N. Enhanced expression of N-myc messenger RNA in neuroblastomas found by mass screening. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 3199-3204, 2000.

MATTHAY, K. K.; PEREZ, C.; SEEGER, R. C.; BRODEUR, G. M.; SHIMADA, H.; ATKINSON, J. B.; BLACK, C. T.; GERBING, R.; HAASE, G. M.; STRAM, D. O.; SWIFT, P.; LUKENS, J. N. Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a children's cancer group study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 4, p. 1256-1264, 1998.

MATTHAY, K.K.; VILLABLANCA, J. G.; SEEGER, R.C.; et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13- cis- retinoic acid. Children's Cancer Group. **N Engl J Med**, 341: 1165-1173, 1999.

MORA, J.; GERALD, W. L.; CHEUNG, N-K., V. Evolving significance of prognostic markers associated with new treatment strategies in neuroblastoma. **Cancer Letters**, v. 197, p. 119-124, 2003.

MORA, J.; GERALD, W. L.; QIN, J.; CHEUNG, N-K., V. Molecular genetics of neuroblastoma and the implications for clinical management: A review of the MSKCC experience. **The Oncologist**, v. 6, p. 263-268, 2001.

MOTOKO, O-M.; DICCIANI, M. B.; CHANG, R. C.; BATOVA, A.; BRIDGEMAN, L. J.; SCHIFF, J.; COHN, S. L.; LONDON, W. B.; YU, A. L. p16/p14<sup>arf</sup> Cell cycle regulatory pathways in primary neuroblastoma: p16 expression is associated with advanced stage disease. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 3481-3490, 2001.

MOTT M. G.; MANN, J. R.; STILLER, C. A. The United Kingdom Children's Cancer Group- the first 20 years of growth and development. **Eur J Cancer**, v. 33, p. 1448-1452, 1997.

NAKAGAWARA, A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. **Cancer Letters**, v. 169, p. 107-114, 2001.

NAKAGAWARA, A.; ARIMA, M.; AZAR, C. G.; SCAVARDA, N. J.; BRODEUR, G. M. Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. **Cancer Research**, v. 52, p. 1364-1368, 1992.

NICKERSON, H. J.; MATTHAY, K. K.; SEEGER, R. C.; BRODEUR, G. M.; SHIMADA, H.; PEREZ, C.; ATKINSON, J. B.; SELCH, M.; GERBING, R. B.; STRAM, D. O.; LUKENS, J. Favorable biology and outcome of stage IV-S neuroblastoma with supportive care or minimal therapy: a children cancer group study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 3, p. 477-486, 2000.

NORRIS, M. D.; BORDON, S. B.; MARSHALL, G. M.; HABER, P. S.; COHN, S. L.; HABER, M. Expression of the gene for multidrug-resistance-associated protein and outcome in patients with neuroblastoma. **The New England Journal Medicine**, v. 334, n. 4, p. 231-238, 1996.

OMURA-MINAMISAWA, M.; DICCIANNI, M. B.; CHANG, R. C.; BATOVA, A.; BRIDGEMAN, L. J.; SCHIFF, J.; COHN, S. L.; LONDON, W. B.; YU, A. L. p16/p14<sup>ARF</sup> Cell cycle regulatory pathways in primary neuroblastoma: p16 expression is associated with advanced stage disease. **Cinical Cancer Research**, v. 7, p. 3481-3490, 2001.

PAULINO, A. C.; MAYR, N. A.; SIMON, J. H.; BUATI, J. M. Locoregional control in infants with neuroblastoma: role of radiation therapy and late toxicity. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v. 52, n. 4, p. 1025-1031, 2002.

PÉREL, Y.; VALTEAU-COUANET, D.; MICHON, J.; LAVRAND, F.; COZE, C.; BERGERON, C.; NOTZ, A.; PLANTAZ, D.; CHASTAGNER, P.; BERNARD, F.; THOMAS, C.; RUBIE, H. Prognosis of neuroblastoma in childhood. Methods of assessment and clinical use. **Archives de Pédiatrie**, v. 11, p. 834-842, 2004.

PEREZ, C. A.; MATTHAY, K. K.; ARKINSON, J. B.; SEEGER, R. C.; SHIMADA, H.; HAASE, G. M.; STRAM D.O.; GERBING, R. B.; LUKENS, J. N. Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a children's cancer group study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 1, p. 18-26, 2000.

PRICE, C. M. Fluorescence in situ hybridization. **Blood Reviews**, v. 7, p. 127-134, 1993.

RAIMONDI, S. C. Fluorescence in situ hybridization: molecular probes for diagnosis of pediatric neoplastic diseases. **Cancer Investigation**, v. 18, n. 2, p. 135-147, 2000.

RICHARDSON, D. R.; PONKA, P. The iron metabolism of the human neuroblastoma cell: lack of relationship between the efficacy of iron chelation and the inhibition of DNA synthesis. **J Lab Clin Med**, v. 124, n. 5, p. 671, 1994.

RIES, L. A. G.; SMITH, M. A.; GURNEY, J. G.; LINET, M.; TAMRA, T.; YONUG, J. L.; BUNIN, G. R. **Cancer incidence and survival among children and adolescents: SEER Program 1975-1995**, National Cancer Institute, 1999. Disponível em: <[http:// www-seer.ims.nci.nih.gov](http://www-seer.ims.nci.nih.gov)> Acesso em: 22 dez. 2004.

ROSS, J. A.; DAVIES, S. M. Screening for neuroblastoma: progress and pitfalls. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v. 8, p. 189-194, 1999.

RUBIE, H.; HARTMANN, O.; MICHON, J.; FRAPPAZ, D.; COZE, C.; CHASFAGNER, P.; BARANZELLI, M. C.; PLANTAZ, D.; AVET-LOISEAU, H.; BÉRNARD, J.; DELATTRE, O.; FAVROT, M.; PEYROULET, M. C.; THYSS, A.; PEREL, Y.; BERGERON, C.; COURBON-COLEET, B.; VANNIER, J-P.; LEMERLE, J.; SOMMELET, D. N-MYC Gene Amplification is major prognostic factor in localized neuroblastoma: results of French NBL 90 study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 15, n. 3, p. 1171-1182, 1997.

SARTELET, H.; GROSSI, L.; PASQUIER, D.; COMBARET, V.; BOUVIER, R.; RANCHÈRE, D.; PLANTAZ, D.; MUNZER, M.; BIREMBAUT, P.; ZAHM, J-M.; BERGERON, C.; GAILLARD, D.; PASQUIER, B. Detection of N-myc amplification by FISH in immature areas of fixed neuroblastomas: more efficient than Southern blot/PCR. **Journal of Pathology**, v. 198, p. 83-91, 2002.

SAVELYEVA, L.; SCHWAB, M. Amplification of oncogenes revisited: from expressing profiling to clinical application. **Cancer Letters**, v. 167, p. 115-123, 2001.

SCHILLING, F. H.; SPIX, C.; BERTHOLD, F.; ERTTMAN, R.; FEHSE, N.; HERO, B.; KLEIN, G.; SANDER, J.; SCHWARZ, K.; TREUNER, J.; ZORN, U.; MICHAELIS, J. Neuroblastoma screening at one year of age. **The New England Journal Medicine**, v. 346, n. 14, p. 1047-53, 2002.

SCHMIDT, M. L.; LUKENS, J. N.; SEEGER, R. C.; BRODEUR, G. M.; SHIMADA, H.; GERBING, R. B.; STRAM, D. O.; PEREZ, C.; HAASE, G. M.; MATTHAY, K. K. Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma: a prospective children's cancer group study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 6, p. 1260-1268, 2000.

SCHWAB, M. MYCN in neuronal tumors. **Cancer Letters**, v. 249, n. 2, p. 179-182, 2003.

SCOTT, D.; ELSDEN, J.; PEARSON, A.; LUNEC, J. Genes co-amplified with in neuroblastoma: silent passengers or co-determinants of phenotype? **Cancer Letters**, v. 197, p. 81-86, 2003.

SEEGER, R. C.; BROUDEUR, G. M.; SATHER, H.; DALTON, A.; SIEGEL, S. E.; WONG, K. Y.; HAMMOND, D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. **The New England Journal Medicine**, v. 313, p. 1111-1116, 1985 (abstract).

SEER, **National Cancer Institute**. Disponível em <<http://seer.cancer.gov>> acesso 02 jan. 2005

SHAPIRO, D. N.; VALENTINE, M. B.; ROWE, S. T.; SINCLAIR, A. E.; SUBLETT, J. E.; ROBERTS, W. M.; LOOK, A. T. Detection of N-myc gene amplification by fluorescence in situ hybridization. Diagnostic utility for neuroblastoma. **American Journal of Pathology**, v. 142, n. 5, p. 1339-45, 1993.

SHIMADA, H.; AMBROS, I. M.; DEHNER, L. P.; HATA, J.; JOSHI, V. V.; ROALD, B. et al. The International neuroblastoma pathology classification (the SHIMADA system). **Cancer**, v. 86, p. 364-372, 1999.

SHIMADA, H.; CHATTEN, J.; NEWTON, W. A. JR.; SACHS, N.; HAMOUNDI, A. B.; CHIBA, T. et al. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. **J Natl Cancer Inst**, v. 73, p. 405-416, 1984.

SHOJAEI-BROSSEAU, T.; CHOMPRET, A.; ABEL, A.; VATHAIRE, F.; RAQUIN, A.-N.; BUGIÈRES, L.; FEUNTEUN, L.; HARTMANN, O.; BONAÏT-PELLIE, C. Genetic epidemiology of neuroblastoma: a study of 426 cases at the institut Gustave-Roussy in France. **Pediatric Blood and Cancer**, v. 42, p. 99-105, 2004.

SIMPSON, J. K.; GAZE, M. N. Current management of neuroblastoma. **The Oncologist**, v. 3, p. 253-262, 1998.

SPITZ, R.; HERO, B.; ERNESTUS, K.; BERTHOLD, F. FISH analyses for alterations in chromosomes 1,2,3, and 11 define high-risk groups in neuroblastoma. **Med Pediatr Oncol**, v. 41, p. 30-35, 2003.



TANAKA, S.; TAJIRI, T.; NOGUCHI, S-I.; SHONO, K.; IHARA, K.; HARA, T.; SUITA, S. Clinical significance of a highly sensitive analysis for gene dosage and the expression level of MYCN in neuroblastoma. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 39, n. 1, p. 63-68, 2004.

TUTHILL, M. C.; WADA, K. W.; ARIMOTO, J. M.; SUGINO, C. N.; KANEMARU, K. K.; TAKEUCHI, K. K.; SIDELL, N. N-myc oncogene expression in neuroblastoma is driven by Sp1 and Sp3. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 89, n. 2, p. 272-280, 2003.

TWEDDLE, D. A.; PEARSON, A. D. J.; HABER, M.; NORRIS, M. D.; XUE, C.; FLEMMING, C.; LUNEC, J. The p53 pathway and its inactivation in neuroblastoma. **Cancer Letters**, v. 197, p. 93-98, 2003.

VALENT, A.; BÉNARD, J.; CLAUSSE, B.; BARROIS, M.; VALTEAU-COUANET, D.; TERRIER-LACOMBE, M-J.; SPENGLER, B.; BERNHEIM, A. In vivo elimination of acentric double minutes containing amplified MYCN from neuroblastoma tumor cells through the formation of micronuclei. **American Journal of Pathology**, v. 158, n. 5, p. 1579-1584, 2001.

VALENT, A.; ROUX, G. L.; BARROIS, M.; TERRIER-LACOMBE, M-J.; VALTEAU-COUANET, D.; LÉON, B.; SPENGLER, B.; LENOIR, G.; BÉRNARD, J.; BERMHEIM, A. MYCN gene overrepresentation detected in primary neuroblastoma tumour cells without amplification. **Journal of Pathology**, v. 198, p. 495-501, 2002.

van NOESEL, M. M.; VERSTEEG, R. Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic "Dance Macabre". **Gene**, v. 325, p. 1-15, 2004.

WEBER, A.; IMISCH, P.; BERGMANN, E.; CHRISTIANSEN. Coamplification of DDX1 correlates with an improved survival probability in children with MYCN- amplified human neuroblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 13, p.2681-2690, 2004.

WEINSTEIN, J. L.; KATZENSTEIN, H. M.; COHN, S. L. Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. **The Oncologist**, v. 8, p. 278-292, 2003.

WEISS, W. A.; ALDAPE, K.; MOHAPATRA, G.; FEUERSTEIN, B. G.; BISHOP, J. M. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 11, p. 2985-2995, 1997.

WESTWEMANN, F.; SCHWAB, M. Genetic parameters of neuroblastomas. **Cancer Letters**, v. 184, p. 127-147, 2002.

WOLDEN, S. L.; GOLLAMUDI, S. V.; KUSHNER, B. H.; LAQUAGLIA, M.; KRAMER, K.; ROSEN, N.; ABRAMSON, S.; CHEUNG, N-K. V. Local control with multimodality therapy for stage 4 neuroblastoma. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys**, v. 46, n. 4, p. 969-974, 2000.

YASUNO, T.; MATSUMURA, T.; SHIKATA, T.; INAZAWA, J.; SAKABE, T.; TSUCHIDA, S.; TAKAHATA, T.; MIYAIRI, S.; NAGANUMA, A.; SAWADA, T. Establishment and characterization of a cisplatin-resistant human neuroblastoma cell line. **Anticancer Res**, v. 19, n. 5B, p. 4049-57, 1999.

YOSHIMOTO, M.; TOLEDO, S. R. C.; CARAN, M. M.; SEIXAS, M. T.; LEE, M. L. M.; ABIB, S. C. V.; VIANNA, S. M. R.; SCHETTINI, S. T.; ANDRADE, J. A. D. Identification of cell populations containing double minutes and homogeneously staining regions in neuroblastoma tumors. **American Journal of Pathology**, v. 155, n. 5, p. 1439-1443, 1999.

ZAJAC-KAYE, M. Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer. **Lung Cancer**, v. 34, p. 43- 46, 2001.

**ANEXOS**

ANEXO 1	CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UFPR.....	78
ANEXO 2	CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER .....	79
ANEXO 3	CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE .....	80

**ANEXO 1- CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UFPR**

Curitiba, 26 de agosto de 2003.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Dra. Ivy Zortéa da Silva Parise**  
Nesta

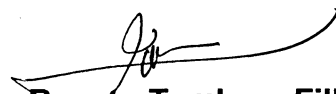
Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulada: **“AVALIAÇÃO DE PROGNÓSTICO DO NEUROBLASTOMA ATRAVÉS DE FISH PARA O GENE N-myc E DE PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS: ESTUDO RETROSPECTIVO EM CORTES DE PARAFINA”**, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 26 de agosto de 2003, o referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96 e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos. **Protocolo CEP/HC 703.122/2003-08.**

**Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.**

**Data para entrega do primeiro relatório: 26 de fevereiro de 2004.**

Atenciosamente,



**Prof. Dr. Renato Tambara Filho**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

**ANEXO 2- CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER**

Curitiba, 11 de novembro de 2003.

**Dra. Ivy Zortea da Silva Parise**  
**Pesquisadora Responsável**

Prezada Sra.,

Gostaríamos de informar que o projeto de pesquisa intitulado como "**Avaliação de prognóstico do neuroblastoma através de FISH para o gene N-myc e de parâmetros histopatológicos: estudo retrospectivo em cortes de parafina**", cujo número de protocolo é **P.P. nº 943**, e tem como pesquisadora responsável V. Sa. foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e **aprovado**.

Solicitamos que seja enviado um relatório semestral informando sobre o andamento do projeto e ao término do trabalho um relatório final, para darmos fechamento ao projeto. Cada alteração realizada no projeto deve ser comunicada imediatamente ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Sem mais agradecemos a atenção e colocamo-nos a disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente,

  
**Dr. Jordan Zanetti Silva**  
**Presidente do CEP**

Membros do CEP:

Andréa Silvana Rossi – Psicóloga Mestre  
Dr. Ariovaldo Donizetti de Abreu – Fisioterapeuta  
Dr. Edson Luiz Michalkiewicz – Médico Especialista (Mestre e Doutorando)  
Dr. Fausto Rohnelt Durante – Médico Especialista  
Dr. Flávio Daniel Saavedra Tomasich – Médico Especialista e Mestre  
Dr. Gyl Henrique Albrecht Ramos – Médico Especialista e Mestre  
Dr. Jordan Zanetti Silva – Médico Especialista e Advogado  
Dr. Luiz Antonio Negrão Dias – Médico Especialista e Mestre

Dra. Ana Luiza Wiermann – Médica Especialista  
Dra. Ieda N. O. Fernandes – Física Médica  
Enfª Andréa Melo Tratch – Enfermeira Especialista  
Enfª Luciana Puchalski Kalinke – Enfª Especialista e Mestre  
Enfª Telma Pelaes – Enfermeira Especialista  
Regina Célia Anastácio da Silva – Jornalista  
Vânia Mari Andrzejewski – Farmacêutica Especialista  
Jose Carlos Wiederkehr – Representante da Comunidade

## PARECER CONSUBSTANCIADO

No dia 11 de novembro de 2003, o Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição avaliou o projeto intitulado como: **“Avaliação de prognóstico do neuroblastoma através de FISH para o gene N-myc e de parâmetros histopatológicos: estudo retrospectivo em cortes de parafina” P.P. nº 943**, cuja pesquisadora principal, responsável pela condução do estudo neste centro é: **Dra. Ivy Zortea da Silva Parise**, do Setor de Pediatria do Hospital Erasto Gaertner, tendo o seguinte parecer:

**OBJETIVOS:** Avaliar o prognóstico de crianças com neuroblastoma à partir da histopatologia e citogenética (N-myc por FISH).

**ESTRUTURA DO PROJETO:** Estudo com enfoque de prognóstico, eixo longitudinal, não controlado, experimental, histórico e individual.

O estudo se justifica pela importância dos fatores biológicos na classificação e estadiamento do neuroblastoma. A identificação do N-myc nos neuroblastomas é uma prática rotineira na maioria dos países, mas no Brasil não há disponibilidade deste método para o uso rotineiro.

**AMOSTRA:** Serão revisados 150 pacientes entre 1990 e 2000.

**POPULAÇÃO:** Os pacientes serão identificados em três instituições: Hospital Erasto Gaertner, Hospital de Clínicas e Hospital Pequeno Príncipe.

**PROCEDIMENTOS:** Será feita análise histopatológica e citogenética dos pacientes que tiverem material suficiente para a análise.

**MÉTODOS ESTATÍSTICOS:** O resumo cita que serão utilizados os métodos de Kaplan-Meyer, Teste exato de Fisher e Qui-quadrado.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:** Não se aplica.

**CRONOGRAMA:** término previsto para janeiro de 2005.

**CURRÍCULOS DOS PESQUISADORES:** Presentes.

**PARECER: APROVADO**

  
**Dr. Jordan Zanetti Silva**  
**Presidente do CEP**

Membros do CEP:

Andréa Silvana Rossi – Psicóloga Mestre  
Dr. Ariovaldo Donizetti de Abreu – Fisioterapeuta  
Dr. Edson Luiz Michalkiewicz – Médico Especialista (Mestre e Doutorando)  
Dr. Fausto Rohnelt Durante – Médico Especialista  
Dr. Flávio Daniel Saavedra Tomasich – Médico Especialista e Mestre  
Dr. Gyl Henrique Albrecht Ramos – Médico Especialista e Mestre  
Dr. Jordan Zanetti Silva – Médico Especialista e Advogado  
Dr. Luiz Antonio Negrão Dias – Médico Especialista e Mestre

Dra. Ana Luiza Wiemann – Médica Especialista  
Dra. Ieda N. O. Fernandes – Física Médica  
Enfª Andréa Melo Tratch – Enfermeira Especialista  
Enfª Luciana Puchalski Kalinke – Enfª Especialista e Mestre  
Enfª Telma Pelaes – Enfermeira Especialista  
Regina Célia Anastácio da Silva – Jornalista  
Vânia Mari Andrzejewski – Farmacêutica Especialista  
Jose Carlos Wiederkehr – Representante da Comunidade



**ANEXO 3- CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE**

Curitiba, 28 de outubro de 2003

Ilma. Sra.  
Dra. Ivy Zortéa da Silva Parise

Prezada Senhora,

Comunicamos que o projeto de pesquisa intitulado AVALIAÇÃO DE PROGNÓSTICO DE NEUROBLASTOMA ATRAVÉS DE FISH PARA O GENE N-MYC E DE PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS: ESTUDO RETROSPECTIVO EM CORTES DE PARAFINA apresentado ao CEP SH-HIPP, em reunião plenária realizada no dia 27 de outubro de 2003 está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, mas ressaltamos que a pesquisadora deverá fazer menção aos pacientes do HPP.

**Lembramos que conforme as normas da CONEP/MS o pesquisador deverá enviar ao CEP um relatório trimestral do andamento do projeto, primeiro relatório previsto para 23 de janeiro de 2004.**

Sem mais para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Luiz Antonio M. da Cunha  
Coordenador do Comitê de Ética em  
Pesquisa em Seres Humanos -HIPP



ASSOCIAÇÃO HOSPITALAR DE PROTEÇÃO À INFÂNCIA DR. RAUL CARNEIRO  
HOSPITAL INFANTIL PEQUENO PRÍNCIPE . HOSPITAL DE CRIANÇAS CÉSAR PERNETTA  
*Atendendo crianças desde 1919*

Rua Desembargador Motta, 1070 • CEP 80.250-060 • Água Verde • Curitiba PR  
tel.: (41) 310.1010 • fax: (41) 225.2291 • e-mail: info@hpp.org.br • site: www.pequenoprincipe.org.br  
C.N.P.J.: 76.591.569/0001-30 • Inscrição Estadual: isento • Inscrição Municipal: 5.002.035.943-2