

**Ana Carolina Mamana Fernandes de Souza**

**Comparação das técnicas de PCR em tempo real e PCR para o estudo dos genes *MYCN*, *DDX1* e *NAG* em pacientes portadores de neuroblastoma**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Hematologia  
Orientador: Dr Israel Bendit

São Paulo  
2007

## SUMÁRIO

Lista de Figuras	
Lista de Gráficos	
Lista de Tabelas	
Resumo	
Summary	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1 Revisão da Literatura	03
1.1.1 Neuroblastoma	03
1.1.2 Epidemiologia	05
1.1.3 Genética	07
1.1.4 Diagnóstico	09
1.1.5 Estadiamento	11
1.1.6 Oncogene <i>MYCN</i>	12
1.1.7 Gene <i>DDX1</i>	15
1.1.8 Gene <i>NAG</i>	16
1.1.9 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em Tempo Real	17
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>3. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
3.1 Casuística	23
3.2 Métodos	24
3.2.1 Espécimes tumorais	24
3.2.2 Extração do DNA genômico	24

3.2.3	Quantificação do DNA.....	25
3.3	Estudo da amplificação dos genes <i>MYCN</i> , <i>DDX1</i> e <i>NAG</i> .....	26
3.3.1	PCR semiquantitativa ou convencional.....	26
3.3.2	PCR em Tempo Real (qPCR).....	28
3.3.3	Clonagem.....	31
3.3.4	Purificação do DNA de plasmídeo.....	33
3.3.5	Digestão do plasmídeo.....	35
3.3.6	Quantificação do DNA de plasmídeo.....	35
3.3.7	Análise Estatística.....	36
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
4.1	Variáveis clínicas.....	38
4.1.1	Idade ao diagnóstico.....	38
4.1.2	Estadiamento (INSS).....	39
4.1.3	Sobrevida global.....	41
4.2	Estudo da amplificação do oncogene <i>MYCN</i> .....	42
4.2.1	Análise da intensidade da banda em gel de agarose.....	42
4.2.2	PCR em tempo real: quantificação relativa.....	45
4.2.3	PCR em tempo real: quantificação absoluta.....	47
4.3	Estudo da amplificação do gene <i>DDX1</i> .....	49
4.3.1	Análise da intensidade da banda em gel de agarose.....	49
4.3.2	PCR em tempo real: quantificação relativa.....	50
4.3.3	PCR em tempo real: quantificação absoluta.....	51
4.4	Estudo da amplificação do gene <i>NAG</i> .....	54

4.4.1 Análise da intensidade da banda em gel de agarose.....	54
4.4.2 PCR em tempo real: quantificação relativa.....	55
4.4.3 PCR em tempo real: quantificação absoluta.....	56
4.5 Comparação entre as metodologias estudadas.....	58
4.6 Análise Multivariada.....	60
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>68</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>
<b>APÊNDICE</b>	

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Curva de Kaplan-Meier para análise de sobrevida dos pacientes portadores de neuroblastoma divididos conforme a idade em menores ou maiores de 12 meses.....39
- Figura 2** - Curva de Kaplan-Meier para análise de sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma divididos conforme os estádios não avançados (1 e 2) e avançados (3 e 4).....41
- Figura 3** - Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida global livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma.....42
- Figura 4** - Visualização do produto de PCR aos 18, 20, 22, 24, 26 e 28 ciclos da reação.....43
- Figura 5** - Amplificação do oncogene *MYCN* através da técnica de PCR. A imagem do gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo foi obtida no Sistema Kodak na presença de luz UV. (A) representação do controle positivo (C+) com intensidade de banda do *MYCN* maior que dos demais genes (*P53* e  *$\beta$ -globina*) e do linfócito normal que não apresenta amplificação do gene. P1 e P2 representam dois pacientes sendo P1 amplificado para *MYCN*. (B) representação do software que foi utilizado para quantificar a intensidade das bandas no gel.....44
- Figura 6** - Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação de *MYCN* através do gel. *MYCN* A = amostras com aumento do número de cópias do oncogene. *MYCN* NA = amostras com 2 cópias de *MYCN*.....45
- Figura 7** - Curva de dissociação realizada no estudo da amplificação do oncogene *MYCN*. Pico máximo de fluorescência entre 85-90 °C.....46
- Figura 8** - Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação do

	oncogene <i>MYCN</i> através da quantificação relativa. <i>MYCN</i> NA = amostras com 2 cópias de <i>MYCN</i> . <i>MYCN</i> A = amostras com aumento de número de cópias do oncogene.....	47
<b>Figura 9 -</b>	Curva de diluição seriada de DNA de plasmídeo clonado com o fragmento de interesse. Concentrações de 100.000 a 10 cópias.....	48
<b>Figura 10 -</b>	Reta formada pelos pontos da curva padrão. M representa o valor do “slope” .....	48
<b>Figura 11 -</b>	Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação de <i>MYCN</i> através da quantificação absoluta.....	49
<b>Figura 12 -</b>	Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação de <i>DDX1</i> através do gel de agarose. <i>DDX1</i> NA = amostras com 2 cópias do gene. <i>DDX1</i> A = amostras com aumento de número de cópias do gene .....	50
<b>Figura 13 -</b>	Curva de dissociação realizada para o estudo do gene <i>DDX1</i> . Pico máximo de fluorescência entre 75-80 °C.....	51
<b>Figura 14 -</b>	Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes portadores de neuroblastoma. Determinação da amplificação do gene <i>DDX1</i> através da quantificação relativa. <i>DDX1</i> NA = amostras com 2n. <i>DDX1</i> A = amostras com aumento de número de cópias do gene.....	52
<b>Figura 15 -</b>	Reta formada pelos pontos da curva de cópias. M representa o valor do “slope” .....	52
<b>Figura 16 -</b>	Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação de <i>DDX1</i> através da quantificação absoluta. <i>DDX1</i> NA = amostras com 2 cópias do gene. <i>DDX1</i> A = amostras com aumento de número de cópias do gene.....	53
<b>Figura 17 -</b>	Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação de	

	<i>NAG</i> através do gel de agarose. <i>NAG</i> NA = amostras com 2 cópias do gene. <i>NAG</i> A = amostras com aumento de número de cópias do gene.....	54
<b>Figura 18</b>	- Curva de dissociação realizada para o estudo do <i>NAG</i> . Pico máximo de fluorescência próximo 75°C.....	55
<b>Figura 19</b>	- Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação de <i>NAG</i> através da quantificação relativa. <i>NAG</i> NA = amostras com 2 cópias do gene. <i>NAG</i> A = amostras com aumento de número de cópias do gene.....	56
<b>Figura 20</b>	- Reta formada pelos pontos da curva padrão. M representa o valor do “slope”.....	56
<b>Figura 21</b>	- Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação de <i>NAG</i> através da quantificação absoluta. <i>NAG</i> NA = amostras com 2 cópias do gene. <i>NAG</i> A = amostras com aumento de cópias do gene.....	57
<b>Figura 22</b>	- Comparação da quantificação relativa e absoluta da PCR em Tempo Real para o oncogene <i>MYCN</i> .....	59
<b>Figura 23</b>	- Comparação da quantificação relativa e o gel de agarose para o oncogene <i>MYCN</i> .....	59
<b>Figura 24</b>	- Comparação da quantificação absoluta e o gel de agarose para o oncogene <i>MYCN</i> .....	59

## **LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes de acordo com a classificação do estadiamento (INSS) .....	40
---------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma (INSS) .....	12
Tabela 2 -	Protocolos de Amplificação da PCR .....	26
Tabela 3 -	Seqüência dos “primers” .....	27
Tabela 4 -	Relação entre risco relativo de óbito e fatores de prognóstico clínicos e biológicos.....	60

## Resumo

**SOUZA, ACMF. Comparação das Técnicas de PCR em Tempo Real e PCR para o estudo dos genes *MYCN*, *DDX1* e *NAG* em pacientes portadores de neuroblastoma [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 78p**

O neuroblastoma é o tumor sólido extra-cranial mais comum e mortal da infância, sendo o tempo de sobrevida nos casos mais agressivos ainda muito curto. Uma das esperanças nesses casos é que os estudos moleculares possam fornecer informações sobre os genes ou as vias moleculares que governam a patogênese dos neuroblastomas. Pois, há poucos genes como o *MYCN*, que foi descrito por estar diretamente ligado ao neuroblastoma. A amplificação deste oncogene ocorre em pouco mais de 25% dos neuroblastomas e é considerada como o mais importante marcador de prognóstico nestes tumores, sendo fortemente relacionada aos estádios avançados da doença e falha no tratamento.

Outros genes do amplicon do *MYCN*, incluindo o *DDX1* “DEAD box polypeptide 1 gene” e o *NAG* “neuroblastoma-amplified gene”, estão sendo observados por se apresentarem co-amplificados com o *MYCN*. Entretanto, a importância deste fenômeno no prognóstico ainda é desconhecida.

Os objetivos deste trabalho foram determinar qual o melhor método para estudar a amplificação dos genes *MYCN*, *DDX1* e *NAG*, além de esclarecer a importância da co-amplificação dos genes *DDX1* e *NAG* no prognóstico.

**Procedimento:** O número de cópias dos genes *MYCN*, *DDX1* e *NAG* foi determinado por PCR em Tempo Real e PCR convencional em 100 neuroblastomas primários. Os dados da PCR em Tempo Real foram analisados por quantificação absoluta e relativa. Os resultados da PCR convencional foram analisados por eletroforese em gel de agarose, medindo a intensidade das bandas formadas no gel no sistema Kodak. A relevância da amplificação gênica como marcador de prognóstico foi avaliada em 74 pacientes, dos quais nós obtivemos o acompanhamento clínico.

**Resultados:** Nos 74 casos estudados, ambos os métodos demonstraram que a amplificação do *MYCN* estava associada com os estádios mais avançados da doença. A análise das curvas de sobrevida livre de progressão confirmou que pacientes com ausência de amplificação do *MYCN* apresentavam maior tempo de sobrevida. Nós também analisamos a amplificação do *DDX1* nas mesmas amostras incluindo aquelas com ausência de amplificação de *MYCN*. Não foi encontrada nenhuma relação entre a co-amplificação com idade ao diagnóstico ou tempo de sobrevida.

**Conclusões:** Os métodos aplicados para calcular o número de cópias dos genes na PCR em Tempo Real mostraram-se equivalentes. A PCR em Tempo Real apresentou maior acurácia nos resultados quando comparada à PCR convencional. A análise da sobrevida não demonstrou relação entre a amplificação dos genes *DDX1* e/ou *NAG* com piora no prognóstico.

Descritores: neuroblastoma; Reação em cadeia da polimerase; genes *MYC*; prognóstico.

## SUMMARY

**SOUZA, ACMF. Comparison between Real Time PCR and PCR for the determination of *MYCN*, *DDX1* and *NAG* amplification in patients with neuroblastoma [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 78p**

Neuroblastoma is the most common and deadly extra-cranial solid childhood tumor. Survival rates for aggressive neuroblastomas are still disappointingly low. One of the hopes is that molecular studies will provide insights into the genes and molecular pathways that govern neuroblastoma pathogenesis. However, at present only a few genes as *MYCN* have been directly linked to neuroblastoma. *MYCN* oncogene amplification, occurring in up to 25% of neuroblastomas, has been considered the most important prognostic factor, strongly correlating to advanced stage disease and treatment failure.

Another genes in the *MYCN* amplicon, including the DEAD box polypeptide 1 (*DDX1*) gene, and neuroblastoma-amplified gene (*NAG* gene), have been found to be frequently co-amplified with *MYCN* in NB. But the prognostic significance of the co-amplification remains unclear.

The aims of this study were to evaluate which is the best method to study the gene amplification of those three genes *MYCN*, *DDX1* and *NAG*, as well as clarify the prognostic significance of the co-amplification or *DDX1* and *NAG* with *MYCN*.

**Procedure:** The gene copy numbers of *MYCN*, *DDX1*, and *NAG* were determined by the real-time quantitative polymerase chain reaction and conventional polymerase chain reaction in 100 primary NBs. Real-Time data were analyzed by absolute and relative quantification. For conventional PCR, samples were electrophoresed on a 2% agarose gel and the intensity of each band evaluated by Kodak image software. To evaluate of the prognostic significance of the gene amplification we had only 74 cases in witch we could analyze the follow-up.

**Results:** In all 74 cases, both methods demonstrated that *MYCN* amplification was associated mainly with advanced cancer stages, and the analysis of overall survival confirmed that patients without *MYCN* amplification had a cumulative survival significantly higher than patients with oncogene amplification. We also studied *DDX1* and *NAG* amplification for all NB samples even that without *MYCN* amplification. No relationship between any gene co-amplification status and disease stage, age at diagnosis, or overall survival was found.

**Conclusions:** The two methods used to calculate gene copy number for Real Time PCR assay shown to be equivalent.

Real Time PCR assay shown to be more accurate to study gene amplification than conventional PCR assay.

Survival analysis pointed out that *DDX1* and/or *NAG* amplification has no additional adverse effect on prognosis.

Descriptors: neuroblastoma; polymerase chain reaction; genes *MYC*; prognosis.

## 1 INTRODUÇÃO

O neuroblastoma é um tumor sólido derivado das células primordiais da crista neural, as quais participam da formação dos glânglios simpáticos e medula adrenal (Castleberry, 1997). Embriologicamente, o neuroblastoma pode ser originário de células cromafins extra-medulares, as quais compõem a medula adrenal fetal, de células nervosas ou de células precursoras pluripotentes, desde que estas possuam propriedades nervosas (Pizzo & Poplack, 1997).

Para os profissionais que se dedicam ao entendimento dos tumores pediátricos, o neuroblastoma possivelmente é o mais desafiador, devido à sua capacidade de ser o tumor sólido com maior probabilidade de regressão espontânea, especialmente em crianças menores de 12 meses de idade, e ao mesmo tempo apresentar comportamento extremamente agressivo e alto índice de mortalidade em crianças acima de um e abaixo de cinco anos de idade (van Noesel, 2004; Bernardi, 2005).

A característica biológica dos neuroblastomas é a complexidade de anormalidades genéticas adquiridas pelas células tumorais e o fato de algumas dessas anormalidades serem marcadores de prognóstico importantes como, por exemplo, o aumento do número de cópias do oncogene *MYCN*. (Brodeur, 1997).

O oncogene *MYCN* é membro da família *MYC* de oncogenes, a qual codifica proteínas nucleares que agem como fatores de transcrição em condições normais. Nos tumores neuroblásticos, o estudo da amplificação do oncogene *MYCN* é particularmente relevante, devido à associação desse fenômeno com agressividade, crescimento tumoral e indicação de mau prognóstico, principalmente nos tumores localizados, nos quais os pacientes que não apresentam tal anomalia genética respondem melhor ao tratamento (Schwab, 2004).

Com o avanço das pesquisas e a melhor compreensão dos eventos biológicos, outros genes foram descritos por estarem co-amplificados com *MYCN*, porém, a correlação entre os demais genes que aparecem amplificados nos neuroblastomas e a clínica ainda permanece obscura. (Katleen De Preter, 2002).

Dentre os genes que podem apresentar co-amplificação com o oncogene *MYCN* estão os genes *DDX1*, um membro da família de genes DEAD Box Asp(D)-Glu(E)-Ala(A)-Asp(D), e o *NAG* gene amplificado do neuroblastoma, ambos localizados no cromossomo 2 em regiões próximas ao oncogene *MYCN* (Frühwald, 2000).

Estudando os marcadores de prognóstico e sua correlação clínica, preservamos os pacientes com tumores de características menos agressivas, de serem expostos aos efeitos de protocolos quimioterápicos mais invasivos. (Bown, 2001). Portanto, o desafio de tratar crianças com neuroblastoma é

aumentar a sobrevida do grupo de pacientes de alto risco e ao mesmo tempo não “supertratar” o grupo de baixo risco (Vasudevan, 2005).

## **1.1 REVISÃO DA LITERATURA**

### **1.1.1 NEUROBLASTOMA**

Esta neoplasia foi, inicialmente, descrita por Virchow (Virchow, 1864 apud Hayes; Smith, 1989) e sua relação com a medula adrenal embrionária foi posteriormente descrita por Wright em 1910 (Wright, 1910 apud Hayes; Smith, 1989).

O neuroblastoma provavelmente deriva dos precursores simpáticos neurais primitivos, sendo 50% originários na medula adrenal, a qual é o centro da glândula adrenal e de onde as células ganglionares produzem substâncias como noradrenalina e adrenalina. Os outros 50% são originários dos glânglios simpáticos paraespinais ou pélvicos. Assim, temos neuroblastomas originários de diferentes tipos celulares, tanto do lado da cadeia simpática quanto da medula adrenal (Brossard, 1996; Brodeur, 2003).

Microscopicamente, o neuroblastoma faz parte do grupo de neoplasias da infância de células pequenas redondas e indiferenciadas, e apresenta tipos histológicos relacionados com o padrão de diferenciação normal do sistema

nervoso simpático, os quais vão desde o indiferenciado e verdadeiramente maligno ou neuroblastoma, até a forma bem diferenciada e benigna que é observada nos ganglioneuromas, passando pelos ganglioneuroblastomas, os quais apresentam padrão celular intermediário entre as formas maligna e benigna (Pizzo & Poplack, 1997).

O prognóstico pode ser classificado considerando-se fatores de risco clínicos e biológicos como idade, estadiamento, índice de DNA, *MYCN* e histologia, sendo os marcadores cromossômicos e moleculares extremamente importantes na determinação acurada dos grupos de alto risco e na previsão da resposta do paciente (George, 2005). A idade tem se mostrado um preditor de resposta confiável visto que muitos estudos indicam que há relação entre crianças diagnosticadas antes do primeiro ano de idade e melhora na sobrevida (Grosfeld, 1993), contrastando com o que se observa em crianças mais velhas, as quais costumam apresentar metástase hematológica extensiva ao diagnóstico, e evoluem para morte causada por progressão da doença, independente do protocolo terapêutico realizado (Maris, 1999).

Esta heterogeneidade de comportamento é justamente a característica clínica mais marcante do neuroblastoma. O fenômeno de regressão espontânea, que é observado geralmente em crianças diagnosticadas antes do primeiro ano de vida, pode ser explicado em parte pela origem embrionária dessa neoplasia (Brodeur, 2003). Assim como as células embrionárias são programadas para proliferar intensamente, diferenciar-se e então diminuir seu crescimento ou sinalizar para apoptose, os tumores que se diferenciam

espontaneamente para formas benignas ou regridem podem estar respondendo ao programa de desenvolvimento da célula progenitora. No entanto, algumas células progenitoras sofrem alterações genéticas tão severas que passam a resistir ao programa de desenvolvimento e dão origem ao tumor (Vasudevan, 2005).

### **1.1.2 EPIDEMIOLOGIA**

O neuroblastoma é o tumor sólido extracraniano mais comum em crianças com idade até cinco anos, podendo ocorrer em outras faixas etárias de forma esporádica. A doença corresponde a aproximadamente 9% de todos os tumores da infância, com uma incidência anual de 1-3 novos casos para cada 100.000 crianças em idade entre 1-14 anos, sendo 90% dos casos diagnosticados nos primeiros cinco anos de vida (Schwab, 2003).

Esta neoplasia é responsável por 15% de todas as mortes causadas por câncer na infância e sua sobrevida está estimada em 60% num período de 6 anos após o diagnóstico. Esta porcentagem diminui ainda mais quando levamos em conta a presença de amplificação do oncogene *MYCN*, sendo a sobrevida neste segundo grupo menor que 30% (Weber, 2004).

Observamos maior incidência desta neoplasia em crianças negras e do sexo masculino, quando comparadas com crianças brancas e do sexo feminino, dada uma proporção de 1,1:1,0 entre meninos e meninas. A localização do

tumor primário ao diagnóstico pode variar ao longo da cadeia simpática e muda de acordo com a idade, sendo mais comum que crianças mais velhas apresentem maior incidência de tumores adrenais quando comparadas aos pacientes mais jovens, os quais apresentam maior incidência nas regiões cervical e torácica (Castleberry, 1997). A maioria dos tumores primários ocorre no abdome (65%), medula adrenal ou na glândula simpática paravertebral.

Tumores primários na região torácica são encontrados em aproximadamente 20% dos casos, sendo pescoço (1-5%) e pélvis (2-3%) regiões menos freqüentes para o aparecimento do tumor primário. Por volta de 1% dos pacientes não apresenta tumor primário detectável (Brossard, 1996; Castleberry, 1997).

A disseminação da doença pode ocorrer por via linfática ou hematológica, sendo medula óssea, osso, fígado e pele os focos preferenciais para o aparecimento de metástase (Brossard, 1996). Entretanto, tem-se observado uma mudança no comportamento do tumor e o aparecimento de metástase também em pulmão e parênquima cerebral (Castleberry, 1997).

A etiologia dos neuroblastomas é desconhecida na maioria dos casos e a exposição a fatores ambientais parece não ser relevante no seu aparecimento, ainda que alguns estudos tenham descrito a associação de neuroblastoma com o uso de hidantal, fenobarbital e álcool durante a gestação (Michalek, 1996). Outras substâncias como, diuréticos, drogas com atividade neural e tintura de cabelo, que fossem utilizadas pela mãe durante o período de gestação, ou a exposição paterna a campos eletromagnéticos no ambiente de trabalho,

também foram relatados por estarem associados ao aparecimento de neuroblastoma (Wilkins, 1990), mas nenhum dos estudos foi confirmado. Assim, nenhuma exposição pré e pós-natal a drogas, produtos químicos ou radiação pode ser considerada, de modo inequívoco, como sendo responsável pelo aumento da incidência de neuroblastoma. (Pizzo & Poplack, 1997).

Alguns pacientes com neuroblastoma demonstram uma predisposição para desenvolver a doença e isto segue um padrão hereditário autossômico dominante. Um locus que indica predisposição ao neuroblastoma foi mapeado no braço curto do cromossomo 16 (Maris, 2002). Ainda não está claro se este é o único ponto de predisposição ou se há múltiplos loci, mas este locus pode apontar para famílias com alto risco.

Mesmo considerando-se que algumas crianças tenham predisposição para desenvolver a doença, a maioria dos neuroblastomas ocorre espontaneamente. Mutações somáticas como ganho ou perda de alelos, ativação oncogênica ou alteração no índice de DNA das células tumorais têm sido considerados fatores importantes no desenvolvimento de neuroblastoma esporádico (Brodeur, 2003).

### **1.1.3 GENÉTICA**

O seqüenciamento do genoma humano e o desenvolvimento de novas tecnologias possibilitaram o estudo mais detalhado das células neoplásicas. Análises de alta resolução de aberrações cromossômicas podem colaborar no

melhor entendimento de características complexas dessas células como ampliações e deleções, habitualmente associadas com neuroblastomas e outras neoplasias.

A investigação da biologia molecular do neuroblastoma iniciou-se com a caracterização citogenética das linhagens celulares derivadas do tumor, as quais em sua maioria, apresentam regiões homogeneamente coradas (HSR) e minutos-duplos (DM), ambas manifestações da amplificação gênica (Brodeur, 1997). Estes fenômenos indicam que tanto ganho quanto perda de material genético ocorre com frequência durante a evolução do neuroblastoma, de acordo com o que observamos na tumorigênese, que envolve ativação oncogênica e inativação de genes supressores de tumor (Maris, 1999)

Outra característica citogenética importante na avaliação de resposta à terapia é o índice de DNA, segundo o qual pacientes com tumores hiperplóides estão associados com estádios baixos da doença e melhor resposta à quimioterapia, quando comparados aos pacientes com tumores diplóides, os quais também parecem ter maior incidência de amplificação de *MYCN* (George, 2005). No entanto, o índice de DNA não é preditor de resposta em pacientes com estádios avançados da doença e que foram diagnosticados após 2 anos de idade (Look, 1991).

A primeira alteração estrutural encontrada em crianças com neuroblastoma é ainda a mais estudada nos casos de neuroblastoma até hoje, e envolve a deleção do braço curto do cromossomo 1 (Brodeur, 1977). Esta perda de heterozigosidade (LOH) foi demonstrada em 33% dos pacientes e associada

com outros fatores de risco como idade e estágio (Caron, 1996). O ganho do braço longo do cromossomo 17 também é observado em uma grande gama de pacientes portadores de neuroblastoma (Bown, 1999) e está associada com a amplificação de *MYCN* (Caron, 1996).

A deleção do 1p e a amplificação do *MYCN* estão ambas fortemente correlacionadas com mau prognóstico e também apresentam relação entre si por caracterizar um grupo de neuroblastomas geneticamente distintos, que apresenta alta agressividade. A maioria dos casos com amplificação de *MYCN* também apresenta deleção de 1p. No entanto, nem todo caso com deleção de 1p apresenta a amplificação do *MYCN*, indicando que a deleção do 1p deve preceder a amplificação de *MYCN* (Maris, 2000). Outros fatores que permitam a amplificação, como a deleção de um gene que regule a expressão de *MYCN* ou a presença de um gene que sinalize para apoptose em situações de aumento de expressão de *MYCN*, devem ocorrer concomitantemente. Ou seja, deve haver uma anormalidade genética qualquer que leve a uma instabilidade genômica e, assim, predisponha a perda de 1p e amplificação de *MYCN* (Brodeur, 2003).

Outras alterações que podem ser encontradas são deleção do 11q e do 14q, mas ainda não se sabe de qualquer relação prognóstica entre essas alterações e o neuroblastoma.

#### **1.1.4 DIAGNÓSTICO**

Diferenças no critério utilizado para a confirmação do diagnóstico inviabilizavam a comparação de estudos realizados em diferentes centros de estudo, assim, foi necessário um consenso mundial quanto à criação de critérios diagnósticos.

Este critério internacional determinou que o diagnóstico de um neuroblastoma fosse estabelecido quando uma das circunstâncias listadas a seguir ocorresse:

1. Diagnóstico patológico inequívoco realizado no tecido tumoral por microscopia óptica com ou sem imunohistoquímica; microscopia eletrônica ou aumento de catecolaminas ou seus metabólitos (ácido homovanílico e ácido vanilmandélico) no soro ou na urina.

2. Aspirado de medula óssea contendo células tumorais inequívocas e aumento das catecolaminas ou seus metabólitos na urina ou no soro.

Cerca de 90 a 95% dos neuroblastomas produzem catecolaminas suficientes para aumentar seus metabólitos na urina. Esta característica fornece vantagem na confirmação do diagnóstico bem como no acompanhamento da atividade da doença nestes pacientes.

Devido às múltiplas características clínicas que o neuroblastoma pode apresentar, há risco de haver um diagnóstico equivocado da doença. No entanto, isto normalmente ocorre apenas em 5 a 10% dos tumores que não

produzem catecolaminas e em 1% nos pacientes que não apresentam tumor primário.

Os níveis de ferritina sérica que normalmente aparecem aumentados em alguns pacientes com estádios avançados da doença, podem estar sinalizando apenas para crescimento tumoral acelerado. A enolase neuroespecífica, uma proteína citoplasmática que está associada com células nervosas, em níveis altos indica piora na sobrevida de crianças com estádios avançados da doença. A desidrogenase láctica não é específica dos neuroblastomas, mas pode exercer o papel de marcador prognóstico nestes tumores, indicando rápida alteração celular ou crescimento tumoral. (Brodeur, 2003). Ainda que os níveis plasmáticos destes marcadores sejam analisados, nenhum deles é utilizado para prever resposta do paciente ou escolha do esquema terapêutico.

No campo do diagnóstico por imagem, a ultra-sonografia, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética são exames que podem fornecer informações precisas da doença nas regiões torácica ou abdominal. Recentemente, com a utilização do MIBG com <sup>131</sup>iodo (meta-iodobenzilguanidina) é possível detectar a atividade da doença em qualquer parte do corpo, diagnosticar recidiva e auxiliar no tratamento da doença.

### **1.1.5 ESTADIAMENTO**

Como na maioria das neoplasias, o estadiamento propõe uma nomenclatura padrão para descrever a doença. A comunidade internacional usou vários sistemas para classificar os neuroblastomas e finalmente chegou a um consenso adotando o INSS, Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma, no qual estão combinados aspectos comuns dos sistemas já utilizados, a fim de criar uma classificação uniforme (Castleberry, 1997). A Tabela 1 descreve o estadiamento de acordo com o INSS.

**Tabela 1.** Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma (INSS)

<b>Estádio 1</b> – Tumor localizado confinado a área de origem, ressecção completa, com ou sem doença microscópica residual; linfonodos ipsi e contralaterais negativos microscopicamente.
<b>Estádio 2 A</b> – Tumor unilateral com ressecção incompleta e linfonodos ipsi e contralaterais negativos microscopicamente.
<b>Estádio 2 B</b> – Tumor unilateral com ressecção completa ou não, com linfonodos ipsilaterais positivos e contra laterais negativos microscopicamente.
<b>Estádio 3</b> – Tumor infiltrando a linha média, com ou sem linfonodos regionais envolvidos; ou tumor unilateral com linfonodos contralaterais envolvidos; ou tumor na linha média com linfonodos bilaterais envolvidos.
<b>Estádio 4</b> – Disseminação do tumor para linfonodos à distância, osso, medula óssea, fígado, e/ou outros órgãos (exceto os descritos no estágio 4S).
<b>Estádio 4S</b> – Tumor localizado como definido nos estádios I e II com disseminação limitada ao fígado, pele e/ou medula óssea.

### 1.1.6 ONCOGENE MYCN

Entre os pesquisadores ele se tornou o alvo de muitas pesquisas que visam entender o mecanismo pelo qual este gene ativa vias intracelulares e regula a expressão gênica. Do ponto de vista clínico, tornou-se um importante

teste para triagem dos pacientes a fim de determinar melhor o risco, a resposta à terapia e a taxa de mortalidade e morbidade (Vasudevan, 2005).

O gene *MYCN* foi clonado como resultado de experimentos citogenéticos com linhagens celulares de neuroblastomas que apresentavam minutos duplos (DM) e regiões homogeneamente coradas (HSR), dois fenômenos que representam aumento de cópias de um segmento cromossômico (Brodeur, 2003), e que mais tarde seriam associados com a amplificação do oncogene *MYCN* (Schwab, 1983).

A relevância do *MYCN* em neuroblastomas foi primeiramente descrita por Schwab em 1983. E ainda que a amplificação seja observada mais freqüentemente nos estádios avançados da doença, a sua presença pode colocar um paciente de estágio baixo numa categoria de alto risco (Rubie, 1997).

O *MYCN* pertence a uma família de oncogenes que engloba o *MYCC*, encontrado em vários tipos de câncer como mama, colo, glioblastoma, linfoma de Burkitt e certas leucemias; o *MYCL*, encontrado em tumores de células pequenas de pulmão; o *MYCS* e o *MYCB* os quais ainda não estão muito bem descritos (Ryan, 1996).

Os genes que são regulados secundariamente pelo *MYCN* estão envolvidos em funções como: (1) síntese e degradação protéica; (2) fatores de transcrição; (3) metabolismo; (4) processamento e síntese de DNA e RNA; (5) controle do ciclo celular; (6) crescimento e diferenciação e (7) sinais de

tradução. O desequilíbrio em qualquer uma dessas funções celulares tem o potencial de iniciar ou promover a tumorigênese (Coller, 2000).

O oncogene *MYCN* apresenta-se amplificado em 25-30% dos neuroblastomas, sendo 5-10% pacientes dos estádios mais baixos da doença e 4S (Brodeur, 1992). A presença de amplificação está fortemente associada com progressão rápida da doença e pior prognóstico independentemente de outros fatores de prognóstico (Brodeur, 1987).

Membro da família de genes *MYC-box*, o *MYCN* foi mapeado no braço curto do cromossomo 2 na região 2p24. As proteínas MYC são fatores de transcrição altamente conservados e bem regulados, tendo sua expressão aumentada no início do ciclo celular (Nikiforov, 2000).

Na era pós-genoma, em que a expressão gênica vem sendo difundida como o principal meio de responder às questões que levarão à cura do câncer, o estudo do número de cópias vem perdendo espaço. No entanto, isto não ocorre quando a relação é entre o oncogene *MYCN* e o neuroblastoma. As metodologias de estudo estão se aperfeiçoando, mas independentemente do nível de tecnologia utilizada e ainda que apenas a presença de amplificação não possa esclarecer todas as questões sobre neuroblastoma, o oncogene *MYCN* mostra-se intimamente ligado a esta neoplasia. Constatamos esta ligação em estudos recentes que, visando descobrir novos fatores de prognóstico, acabaram recaindo na alta relevância do *MYCN* que, juntamente com idade e estadiamento, ainda é um dos mais importantes (Riley, 2004). No campo das anormalidades cromossômicas, a região onde está mapeado o

oncogene *MYCN* é apontada como sendo a de maior frequência de ganho e alto índice de amplificação em neuroblastomas (Mosse, 2005).

A amplificação gênica é uma das maneiras pelas quais os oncogenes são ativados a partir do seu estado normal e alteram as vias regulatórias de crescimento celular durante a tumorigênese. A unidade de amplificação (amplicon) foi descrita como sendo muito maior que o gene amplificado. Sendo assim, genes que estejam próximos do gene amplificado podem apresentar co-amplificação e conseqüentemente, co-expressão elevada. Nos neuroblastomas, ainda não está claro até que ponto o aumento do número de cópias do *MYCN*, isoladamente, é suficiente para explicar o fenótipo de agressividade ou se isto está atribuído a co-amplificação de outros genes no mesmo amplicon (George, 1997).

Ainda que a amplificação do oncogene *MYCN* esteja bem documentada como fator determinante de pior prognóstico nos neuroblastomas, por volta de 60% dos tumores que não respondem bem ao tratamento não apresentam amplificação desses oncogene (Squire,1995). Em contrapartida, 7% dos tumores que apresentam a amplificação do oncogene *MYCN* respondem bem ao tratamento e apresentam sobrevida acima de 72 meses (Weber, 2004). Estes dados indicam que a amplificação do oncogene *MYCN* não é o único fator determinante de mau prognóstico e que é necessário pesquisar mais sobre outros marcadores moleculares que possam ser responsáveis pelo comportamento dos neuroblastomas.

### 1.1.7 GENE *DDX1*

O gene *DDX1* foi mapeado na região 2p24 e é membro da família de proteínas DEAD box [Asp(D)-Glu(E)-Ala(A)-Asp(D)] as quais são RNA helicases que participam de diversas funções celulares, como: estrutura ribossomal, “splicing” do RNA, espermatogênese, embriogênese, crescimento e divisão celular (Squire, 1995).

A proteína *DDX1* é encontrada tanto no núcleo de linhagens celulares com amplificação desse gene, como no citoplasma. No entanto, é mais comumente encontrada no núcleo das linhagens não-amplificadas. Estudos realizados com neuroblastomas e retinoblastomas para análise da expressão de *DDX1* obtiveram resultados que indicam a participação desse gene no metabolismo de RNA localizado no núcleo celular (Godbout, 1998).

A função da maioria dos genes *DEAD* “box” ainda permanece obscura, mas há um gene dessa família, o *MrDb* (*DDX18*), que interage com o *MYCC*, sugerindo que a transcrição de alguns genes *DEAD* “box” pode ser regulada através de interação com genes da família *MYC* (Grandori, 1996).

O estudo do gene *DDX1* é relevante para os neuroblastomas por apresentar-se co-amplificado com o oncogene *MYCN* em mais de 50% dos casos com amplificação de *MYCN* (De Preter, 2002). No entanto, não há nada bem estabelecido sobre a relevância desta co-amplificação no comportamento tumoral ou sobrevida dos pacientes.

### 1.1.8 GENE *NAG*

O *NAG* “neuroblastoma amplified gene” foi mapeado no cromossomo 2 à 400Kb telomérico ao *MYCN*. Este gene foi isolado em dois laboratórios através de técnicas de mapeamento genético e, subseqüentemente, descrito por estar co-amplificado com o *MYCN* em algumas linhagens celulares de neuroblastomas.

Scott e colaboradores, comparando a amplificação de *MYCN* e *NAG* em neuroblastomas, observaram que células com *MYCN* amplificado, na ausência de amplificação de *NAG*, apresentavam maior expressão tanto de *MYCN* quanto de *NAG*, quando comparadas com células sem amplificação de *MYCN*, indicando uma possível associação na expressão dos dois genes (Scott, 2003).

Este mesmo trabalho relaciona a amplificação do *NAG* com baixos estádios da doença, sugerindo que esse gene tenha ação anti-tumoral e que a proteína *NAG* possa exercer papel significativo como um supressor de metástase.

O gene *NAG* não pertence a nenhuma família de proteínas conhecidas e nem sua seqüência nucleotídica ou protéica apresenta homologia com qualquer outra seqüência humana já descrita. No entanto, já existem alguns estudos que demonstraram variação na expressão deste gene nos diferentes tecidos e durante o desenvolvimento embrionário (Wimmer, 1999; Frühwald, 2000). Ainda

que pouco descrito na literatura, o gene *NAG* parece ser bem expresso e conservado entre as espécies (Scott, 2003).

### **1.1.9 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E PCR EM TEMPO REAL**

As análises moleculares podem ser de grande utilidade como determinante de prognóstico na prática clínica, desde que haja confiabilidade, rapidez e simplicidade no método aplicado. Normalmente, os estudos de amplificação gênica são realizados utilizando o “Southern blot” ou o “dot blot”, dois procedimentos que requerem amostras em concentração elevada e de boa qualidade e gastam muito tempo até a obtenção do resultado.

Assim, verificamos que técnicas de hibridização não são as mais adequadas quando objetivamos estudar amplificação gênica em amostras tumorais que normalmente são escassas, quando provenientes de biópsia ou aspirado medular ou de baixa qualidade, quando o DNA precisa ser extraído de blocos de parafina. Outro ponto desfavorável em relação às técnicas de hibridização é a morosidade do método.

Especificamente para o estudo da amplificação do oncogene *MYCN* em neuroblastomas, a rapidez na obtenção do resultado é imprescindível, visto que a presença de amplificação pode redirecionar o tratamento.

A PCR consiste na síntese bidirecional e repetitiva de DNA através da extensão de uma região do ácido nucléico com a utilização de “primers” ou iniciadores.

A amplificação de uma amostra pela técnica de PCR requer um par de iniciadores, os quatro deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), íons de magnésio ( $MgCl_2$ ), que devem estar em maior concentração que os dNTPs e uma DNA polimerase termoestável para sintetizar o DNA. As concentrações de iniciador, dNTP e magnésio são variáveis de acordo com a reação .

Três eventos distintos devem ocorrer durante a reação de PCR, a cada ciclo. O primeiro é a desnaturação da dupla fita de DNA que acontece quando a reação é aquecida a 92-96°C. O tempo necessário para a desnaturação depende da geometria do tubo, do termociclador, do volume da reação e da proporção de C+G (citosina e guanina) da seqüência de DNA. Nos casos em que temos altas quantidades de C+G, a adição de glicerol e o aumento do tempo de desnaturação podem melhorar o resultado da reação.

O segundo evento do ciclo de PCR é o anelamento dos iniciadores à fita de DNA que será sintetizada. A temperatura varia de 37 a 65°C, dependendo da homologia dos iniciadores pela seqüência alvo e da composição dos iniciadores. O anelamento ocorre com sucesso porque os iniciadores estão em maior concentração que o DNA e seu tamanho é muitas vezes inferior, assim eles hibridizam com sua seqüência complementar num espaço de tempo bem menor que o necessário para as fitas se renaturarem.

A última parte do ciclo é a extensão, a partir dos iniciadores, por uma polimerase termoestável. Tradicionalmente, esta parte do ciclo é realizada a 72°C. O tempo necessário para copiar a fita de DNA completamente depende do tamanho do produto de PCR (Dieffenbach, 1995).

Nos últimos anos foram desenvolvidos ensaios PCR em Tempo Real a fim de aperfeiçoar o diagnóstico. A técnica de PCR em Tempo Real quantitativo é uma metodologia confiável, capaz de quantificar a concentração do produto de PCR gerado durante cada ciclo da reação. Para tanto, é necessário ter um método de detecção do acúmulo do produto de PCR e um termociclador que seja adaptado para gravar os resultados a cada novo ciclo da reação.

Antes do instrumento de PCR em Tempo Real ser desenvolvido, a reação de PCR quantitativa era realizada adicionando-se Brometo de Etídio ou qualquer outro intercalante de DNA ao produto de PCR num ciclo da reação que era determinado empiricamente. Este produto de PCR era aplicado a um gel de agarose e as bandas encontradas quantificadas por algum método densitométrico. A reação de PCR competitiva aumentou a capacidade de quantificação, mas nenhum destes métodos fornecia dados quantitativos realmente confiáveis.

O primeiro relato de PCR em Tempo Real foi feito em 1993 por Higuchi, que usando Brometo de Etídio como intercalante durante a reação de PCR, e um termociclador modificado, para irradiar as amostras com luz ultravioleta (UV), conseguia detectar a fluorescência resultante da reação com uma câmera acoplada. O gráfico resultante da fluorescência gerada em função do número

de ciclos representa de maneira precisa a concentração de produto de PCR que está sendo gerado a cada ciclo da reação, exceto nos ciclos iniciais, ou seja, aqueles que precedem a fase exponencial.

Apesar de precisa e mais confiável que as demais metodologias utilizadas para quantificação até então, esta técnica apresentava alguns inconvenientes, pois, detectava a fluorescência produzida por produtos de PCR não específicos, além do uso de uma substância carcinogênica, o brometo de etídio.

Assim, outras técnicas foram desenvolvidas a fim de aprimorar o método, porém mantendo o mesmo princípio. Atualmente, os métodos mais utilizados são o corante intercalante Syber Green I e as sondas Taqman e molecular beacons. (Ginzinger, 2002).

## **2 OBJETIVOS**

1. Definir entre os métodos de PCR e PCR em Tempo Real, qual o mais adequado para o estudo da amplificação dos genes *MYCN*, *DDX1* e *NAG*.
2. Relacionar a presença de amplificação dos genes *MYCN*, *DDX1* e *NAG* com o prognóstico em pacientes portadores de neuroblastoma.



### **3 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1 CASUÍSTICA**

Cem amostras tumorais de pacientes portadores de neuroblastoma obtidas através de biópsia ou cirurgia foram enviadas ao Laboratório de Biologia Tumoral do Serviço de Hematologia da Faculdade de Medicina do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. O diagnóstico confirmatório de neuroblastoma, estabelecido por exame anátomo-patológico, bem como a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (do protocolo de tratamento Neuro – IX – 2000 CAPPesq (projeto “Tratamento combinado dos neuroblastomas de alto risco”, protocolo de pesquisa nº 666/01, aprovado em 25/10/2001) foi realizado nos diversos centros de oncologia pediátrica que encaminharam as amostras para diagnóstico de amplificação gênica. Infelizmente, não obtivemos os dados clínicos de todas as amostras encaminhadas, mas somente de 74 pacientes. Também foram analisadas 10 amostras de sangue periférico de doadores voluntários, as quais foram consideradas controles negativos para a amplificação dos genes *MYCN*, *DDX1* e *NAG*.

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 ESPÉCIMES TUMORAIS**

As amostras de tecido tumoral provenientes da ressecção cirúrgica ou de biópsia do tumor foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Tumoral da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em tubo tipo Falcon de 15mL contendo meio RPMI 1640 e mantidas em freezer a -80°C até o momento do processamento.

### **3.2.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO**

Cinco miligramas de tecido tumoral foram fragmentados em pulverizador de tecido (Mikro-Dismenbrenator II, B. Braun, Melsungen, Germany) após a adição de nitrogênio líquido. O pulverizado foi acrescido de 3mL de tampão PK (0,5M de EDTA, 10mM de Tris-HCL, 50mM de NaCl, pH 8,0), 200 µL de SDS 10% e 100 µL de proteinase K (10 mg/mL). O material foi incubado em banho-maria a 37°C por uma noite. No dia seguinte, o material foi retirado do banho-maria, acrescido de 1mL de NaCl 5M e mantido sob agitação por 30 minutos em homogeneizador (Temperature Controlled Rocked Platform, Model RP-50, Elmeco, USA). O material foi, então, submetido à centrifugação não refrigerada (Centrifuge 5403, eppendorf) a 2.500rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi

transferido para um tubo tipo Falcon e acrescido de dois volumes de etanol absoluto a -20 °C (Merck) e misturado por inversão. Após a homogeneização, a fita de DNA estava visível e pôde ser retirada com o auxílio de uma pipeta pasteur, sendo então, transferida para um tubo eppendorf de 1,5mL e diluída em água deionizada e bidestilada autoclava (milli-Q) antes de ser armazenado em freezer -20°C.

### **3.2.3 QUANTIFICAÇÃO DO DNA**

A concentração do DNA foi determinada com a utilização do fluorômetro Victor Wallac nos comprimentos de onda 510 e 527 nm, para excitação e emissão, respectivamente. Para a realização da leitura no fluorômetro foi utilizado um kit de quantificação de DNA (Quant-iT™ DNA Assay Kit, Broad Range (Q33130), Molecular Probes), o qual contém um fluorocromo (componente A) e 8 padrões contendo DNA nas seguintes concentrações: 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 ng/μL. Em todos os ensaios foram analisados os oito padrões além das amostras dos pacientes.

O resultado da leitura obtido em cada um dos padrões foi relacionado em função da concentração nos mesmos. A equação da reta resultante desse gráfico foi utilizada para calcular a concentração de cada uma das amostras dos pacientes.

### **3.3 ESTUDO DA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *MYCN*, *DDX1* E *NAG***

#### **3.3.1 PCR SEMIQUANTITATIVA OU CONVENCIONAL**

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada de forma semiquantitativa no estudo da amplificação dos genes *MYCN*, *DDX1* e *NAG*. Os genes  *$\beta$ -globina* e *p53* foram utilizados como calibradores no estudo do oncogene *MYCN* e os genes *SDC4* e *p53* nos estudos dos genes *DDX1* e *NAG*, respectivamente. O gene calibrador atua como controle interno da reação e fator de correção da concentração de DNA de cada amostra. A seqüência dos “primers” de estudo bem como dos calibradores está demonstrada na Tabela 3.

O volume total da reação de 50  $\mu$ L compreendeu os seguintes reagentes: 100 ng de DNA genômico, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 250  $\mu$ M de deoxinucleosídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 25pmol de cada iniciador “primer”, tampão da enzima 1X, 2U da enzima Taq polimerase (Invitrogen<sup>TM</sup>, USA) e água milli-Q q.s.p. 50 $\mu$ L. O material foi submetido ao protocolo de amplificação que está representado na Tabela 2. Quanto aos genes calibradores, os protocolos foram os mesmos que os dos genes alvo.

**Tabela 2.** Protocolos de Amplificação da PCR

GENE	DESNATURAÇÃO		ANELAMENTO		EXTENSÃO		CICLOS
<i>MYCN</i>	94°C	60"	60°C	70"	72°C	70"	25
<i>DDX1</i>	95°C	60"	55°C	70"	72°C	70"	30
<i>NAG</i>	95 °C	60"	60°C	60"	72°C	60"	24

O número de ciclos foi estabelecido de modo que a reação terminasse antes de atingir a fase de platô, pois poderia resultar numa falsa análise da amplificação nos pacientes com um pequeno aumento de número de cópias.

Todas as reações foram realizadas em termociclador automático (MJ Research PTC 200, USA) e compostas de um controle negativo, linfócitos de doadores normais e um controle de contaminação da reação, ausente de material genético.

O controle positivo, que se constituiu de uma linhagem celular de neuroblastoma (NB19), com aumento de número de cópias do oncogene *MYCN*, foi analisado apenas nos estudos deste gene, pois não apresenta aumento de número de cópias dos demais genes que estavam sendo analisados.

**Tabela 3.** Seqüência dos “primers”

GENES	“PRIMERS”	SEQUÊNCIA
TP53	direto	5´ CTT GCC ACA GGT CTC CCC AA 3´
	indireto	5´AGG GGT CAG CGG CAA GCA GA 3´
<i>β-globina</i> exon 3	direto	5´ GTG TGC TGG CCC ATC ACT TT 3´
	indireto	5´ CAA GAA AGC GAG CTT AGT GA 3´
<i>MYCN</i>	direto	5´ GGT AGT ATT CGT CCC ATT GGC A 3´

<i>DDX1</i>	indireto	5' GTG AAT CAG GTT GAG TTC ATT G 3'
	direto	5' TGC ATC TTG GCT ACC TTC CT 3'
	indireto	5' TTC ATT GGG ATG CCA TTT TT 3'
<i>NAG</i>	direto	5' GCC TTG AAA ACA TCC ACC TG 3'
	indireto	5' CCA TGC AGC TAT CAG TGA GG3'
<i>SDC4</i>	direto	5' CAG GGT CTG GGA GCC AAG T 3'
	indireto	5' GCA CAG TGC TGG ACA TTG ACA 3'

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio (1:30000). O tampão de corrida foi o TAE 1X (Tris-base 0,8M, 2mL de EDTA 40mM, acetato de sódio 0,26M, pH 8,0). O gel foi fotografado por uma câmera Kodak e a intensidade média das bandas, tanto do gene alvo quanto do gene calibrador, foram analisadas pelo 1D Image Analysis Software.

A partir dos resultados fornecidos pelo programa foram aplicados os seguintes cálculos:

$$\frac{MYCN - (\beta\text{-globina} + TP53)}{2}$$

para o estudo do oncogene *MYCN* e,

$$\frac{DDX1}{NAG} \quad e \quad \frac{NAG}{p53}$$

para o estudo dos genes *DDX1* e *NAG*

### 3.3.2 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

O estudo da amplificação dos genes *MYCN*, *DDX1* e *NAG* também foi realizado pela técnica de PCR quantitativo, a qual é baseada no monitoramento da fluorescência da amplificação de DNA ciclo a ciclo.

O número de cópias dos genes *MYCN*, *DDX1* e *NAG* foi determinado utilizando-se Platinum<sup>®</sup> SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen<sup>™</sup>, USA), um corante fluorescente intercalante de DNA que é captado pelo termociclador (Rotorgene<sup>™</sup> 3000, Corbett Research, Australia) a cada novo ciclo da reação de PCR e permite que o aparelho desenhe uma curva de amplificação para cada amostra.

O volume total de reação de 15 µL foi composto de: 15 ng de DNA genômico, 1X Platinum<sup>®</sup> SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen<sup>™</sup>, USA), 3mM de MgCl<sub>2</sub> e 7,5 pmol de cada iniciador para cada um dos genes estudados *MYCN*, *DDX1*, *NAG* e  $\beta$ -globina.

O protocolo de amplificação constituiu-se de 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 60°C ou 55°C e extensão a 72 °C por 30 segundos para o estudo dos genes *MYCN* e *DDX1*, respectivamente. O estudo do gene *NAG* foi realizado com desnaturação 95°C por 20 segundos e uma fase única de anelamento e extensão a 60°C por 60 segundos.

Os iniciadores utilizados na reação de qPCR foram os mesmos utilizados na reação de PCR semi-quantitativo, os quais estão listados na Tabela 3. Todas

as reações foram realizadas em termociclador (Rotorgene™ 3000, Corbett Research, Australia) e compostas de um controle negativo, linfócitos de doadores normais, e um controle de contaminação da reação ausente de material genético. O controle positivo, que se constituiu de uma linhagem celular de neuroblastoma (NB19), com aumento de número de cópias do oncogene *MYCN*, foi analisado apenas nos estudos deste gene.

A análise da amplificação gênica realizada pela PCR em Tempo Real foi analisada utilizando-se duas formas de quantificação, absoluta e relativa. Na quantificação relativa foi avaliada a relação do Ct “Threshold cycle” obtido na amostra dos pacientes em relação ao Ct de linfócitos de doadores voluntários normais. Na quantificação absoluta o número de cópias do gene de estudo é determinado baseando-se na curva de número de cópias padrão. Neste estudo construímos a curva a partir de clonagem em DNA de plasmídeo.

O Ct é o primeiro ciclo de amplificação, no qual o “amplicon” de DNA é detectado acima da linha basal. Desta forma, os possíveis fatores interferentes, associados aos estágios tardios da reação são minimizados.

A partir dos valores de Ct encontrados, foi calculado o valor do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak, 2001), onde:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{(1+E)^{-\Delta Ct \text{ do gene alvo}}}{(1+E)^{-\Delta Ct \text{ do gene controle}}}$$

com, **E**= eficiência da reação de PCR

**$\Delta Ct$  do gene alvo** = diferença entre o valor de Ct da amostra desconhecida e da amostra controle (Ct médio dos linfócitos normais) para este gene.

**$\Delta Ct$  do gene controle** = diferença entre o valor de Ct da amostra desconhecida e da amostra controle (Ct médio dos linfócitos normais) para este gene.

O cálculo do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  somente poderá ser usado se as eficiências de amplificação do gene alvo e do gene controle apresentarem valores muito próximos. De modo a comprovar a eficiência da reação, o gene alvo e o gene controle foram amplificados, para a mesma amostra, em diluições seriadas. Isto resultou em variações no valor do Ct visto que quanto mais diluída a amostra mais tardiamente aparece a amplificação. A partir dos valores de Ct de cada uma das diluições, o termociclador desenha uma reta, formada a partir dos valores do Ct e da concentração da amostra em cada uma das diluições. As reações que apresentaram inclinação da reta “slope” entre 3,1 e 3,9 foram consideradas dentro do padrão de eficiência aceitável.

Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de dissociação “melting”, a qual foi realizada para verificar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de formação de dímeros de primer ou qualquer outro produto inespecífico.

### **3.3.3 CLONAGEM**

O DNA de linfócitos de doadores voluntários foi extraído de sangue periférico e amplificado com os iniciadores dos genes *MYCN*, *DDX1*, *NAG* e  $\beta$ -*globina* para a obtenção do produto de PCR que foi utilizado como inserto.

A clonagem foi realizada seguindo-se o protocolo Blunt-ended PCR Cloning (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden).

A ligação do produto de PCR ao vetor procedeu segundo a descrição a seguir:

em um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL foi colocado 2  $\mu$ L do produto de PCR, 1  $\mu$ L de 10X tampão PK (proteínase K), 0,5  $\mu$ L de DTT 100mM e 1  $\mu$ L de PK enzyme mix e água milli Q autoclavada q.s.p. 10  $\mu$ L. A solução foi incubada por 40 minutos a 22°C, aquecido por 10 minutos a 75°C e resfriado por 2 minutos em banho de gelo.

Após este procedimento, foi adicionado aos 10  $\mu$ L iniciais, 1  $\mu$ L do vetor pMOSBlue (50 ng/ $\mu$ L) e 1  $\mu$ L de T4 DNA ligase 4 U, totalizando 12  $\mu$ L finais de reação.

Nesta etapa, a reação foi incubada a 22°C por uma noite e no dia seguinte procedemos à transformação da bactéria.

Antes de iniciar o procedimento de transformação preparamos duas placas de Petri, com meio de cultura Luria-Bertani (LB) (1g de triptona, 1g de extrato de levedura, 1g de NaCl e água Milli-Q q.s.p. 100 mL). Em uma das duas o meio LB foi acrescido de ampicilina 100  $\mu$ g/mL. A placa sem ampicilina foi preparada para verificar contaminação do meio de cultura e a placa com ampicilina para seleccionar o crescimento das bactérias que não houvessem sido transformadas.

O crescimento de colônias na placa com ampicilina e ausência de crescimento na placa sem ampicilina indicavam, respectivamente, que as bactérias que tinham crescido continham o vetor de interesse, o qual conferia à bactéria resistência à ampicilina e a esterilidade do meio.

Após preparar as placas, a reação de ligação que estava incubando a 22°C foi adicionada da bactéria, a qual só foi retirada do freezer à -80°C, onde estava armazenada, neste momento.

A solução contendo a bactéria foi deixada por 30 minutos em banho de gelo, 30 segundos a 42°C e de volta ao banho de gelo por mais 2 minutos. Foi acrescida de 80µL de S.O.C, e mantida sob agitação por 1 hora a 37°C. O plaqueamento foi realizado utilizando-se todo o volume da solução contendo a bactéria e foi incubado à 37° por uma noite sem agitação.

No dia seguinte pudemos observar o crescimento de colônias, as quais foram transferidas para meio de cultura LB líquido com 100µg/mL de ampicilina. A reação foi incubada a 37°C por mais uma noite e o crescimento da bactéria foi constatado devido à turvação do meio.

### **3.3.4 PURIFICAÇÃO DO DNA DE PLASMÍDEO**

Após a clonagem o DNA do plasmídeo foi purificado utilizando-se o S.N.A.P.<sup>TM</sup> Miniprep (Invitrogen<sup>TM</sup>, USA).

A purificação foi a partir da centrifugação o meio líquido LB que estava incubado à 37°C. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” obtido após a centrifugação acrescido de 150 µL de “Resuspension Buffer” e 150 µL de “Lysis Buffer”. Esta reação foi incubada por 3 minutos em temperatura ambiente.

A seguir, foi adicionado 150 µL de “Precipitation Salt” gelado e homogeneizado por inversão. A centrifugação foi realizada à temperatura ambiente, por 5 minutos a 14.000 x g em microcentrífuga (Centrifuge 5415C, eppendorf).

O sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5 mL estéril e o “pellet” gelatinoso desprezado após a centrifugação. Ao sobrenadante foi adicionado 600µL de Binding Buffer e homogeneizado por inversão. O volume total foi transferido para a parte superior da coluna e submetido à centrifugação em temperatura ambiente, por 30 segundos de 1.000 a 3.000 x g. O volume que ficou armazenado no tubo coletor foi descartado. Na parte superior da coluna foi adicionado 500 µL de “Wash Buffer”, e submetido à centrifugação em temperatura ambiente, por 30 segundos de 1.000 a 3.000 x g, o volume que ficou armazenado no tubo coletor foi descartado.

Nesta fase foi adicionado 900µL de “Final Wash” 1X e a coluna foi submetida à centrifugação em temperatura ambiente, por 30 segundos de 1.000 a 3.000 x g. O volume que ficou armazenado no tubo coletor foi descartado e a coluna foi submetida à centrifugação em velocidade máxima para secar a resina.

A coluna foi transferida para um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL estéril e na parte superior foi pipetado 60 µL de água Milli Q estéril. Após ficar incubada por 3 minutos em temperatura ambiente, a coluna foi submetida à centrifugação em velocidade máxima por 30 segundos. Nesta fase o DNA estava eluído na água milli-Q e a coluna foi descartada.

### **3.3.5 DIGESTÃO DO PLASMÍDEO**

A enzima escolhida para a digestão foi a enzima de restrição HIND III (GIBCO BRL) por não apresentar sítio de restrição na região do inserto.

A digestão foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

20 µL do DNA de plasmídeo foi acrescido de 20U da enzima de restrição, 1X o tampão da enzima REact<sup>®</sup> 2 (GIBCO BRL) e água Milli Q estéril q.s.p. 40 µL. A reação ficou por uma noite em banho à 37°C e no dia seguinte, foi acrescida de 1 µL de glicogênio, 1:10 do volume inicial de acetato de sódio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>) 3M e etanol gelado absoluto 2,5 vezes o volume inicial.

A reação permaneceu por 1 hora em freezer a -80°C, sendo submetida após este período à centrifugação por 15 minutos em microcentrífuga (Centrifuge 5415C, eppendorf) em velocidade máxima. O sobrenadante foi

desprezado e a reação permaneceu a temperatura ambiente até secar. O “pellet” foi ressuspendido em 30 µL de água Milli-Q estéril.

A reação de digestão foi submetida a um gel de agarose 1% para verificar a eficiência da enzima de restrição.

### **3.3.6 QUANTIFICAÇÃO DO DNA DO PLASMÍDEO**

Após o processo de digestão o DNA do plasmídeo foi quantificado utilizando espectrofotômetro GeneQuant DNA/RNA Calculator (Pharmacia, LKB Biotechnology, Sweden) nos comprimentos de onda 260 e 280nm. A concentração encontrada foi utilizada no cálculo de moléculas/µL conforme a fórmula descrita:

**$X_{\text{g/uL DNA}} / [\text{n}^\circ \text{ pares de base do plasmídeo} \times 660] \times 6,022 \times 10^{23} = Y$**   
**moléculas/µL.**

O DNA do plasmídeo foi mantido em freezer -20°C até o momento do processamento.

### **3.3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Quanto à análise estatística foi aplicado o teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Para estudar o efeito isolado das variáveis clínicas (idade e estágio) e as variáveis biológicas (*MYCN*, *DDX1* e *NAG*) sobre o prognóstico do neuroblastoma, foram determinadas as taxas de sobrevida livre de progressão. Considerando que o tempo de sobrevida, variável dependente ou de interesse,

é definida como o tempo transcorrido entre o início da observação, isto é o diagnóstico até que o evento ocorra. Foi considerada como evento a ocorrência de progressão da doença ou óbito.

Os dados foram considerados censurados na ocorrência de um dos seguintes fatos: término do presente estudo em dezembro de 2005, pacientes perdidos de observação ou óbito por outra causa. Os fatores prognósticos em estudo foram considerados como variáveis independentes. As curvas de sobrevida foram confeccionadas para cada variável independente através do método de Kaplan-Meier.

Foi aplicado o teste de log-rank para fazer uma comparação entre as curvas obtidas para categorias diferentes da mesma variável, ou seja, avaliamos se existia ou não diferença estatística entre as distribuições das curvas obtidas.

Para o estudo de diversos fatores relacionados ao tempo de ocorrência de eventos, foi ajustado o modelo de regressão de Cox multivariado. O nível de significância adotado foi de  $p=0,05$ .

## **4 RESULTADOS**

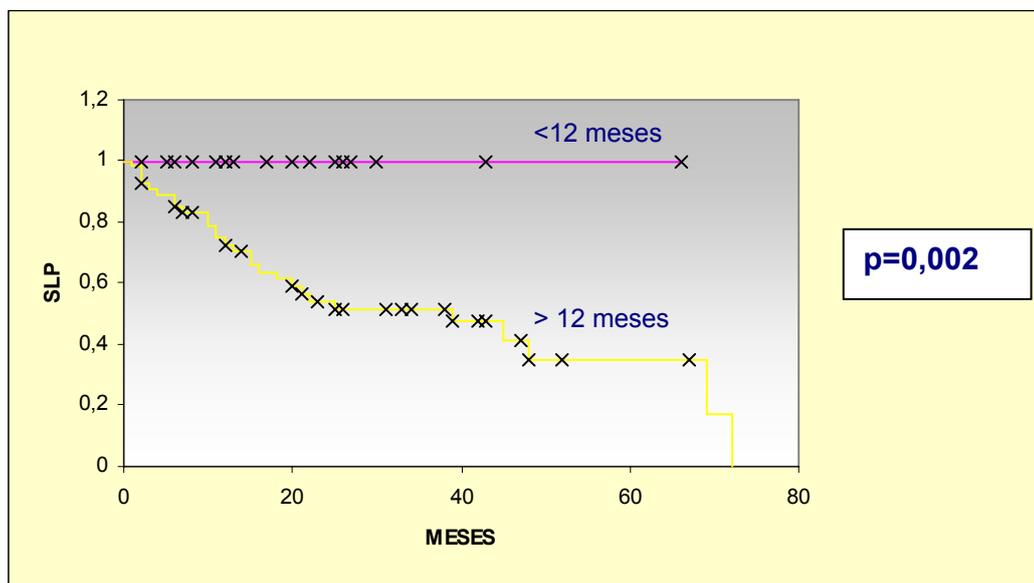
### **4.1 VARIÁVEIS CLÍNICAS**

Avaliamos setenta e quatro amostras quanto ao sexo, idade ao diagnóstico, evolução clínica e estadiamento, o qual foi classificado de acordo com o Sistema Internacional de Estadiamento para Neuroblastoma (INSS).

#### **4.1.1 IDADE AO DIAGNÓSTICO**

A mediana da idade dos pacientes ao diagnóstico foi de 22 meses, variando de 1 a 114 meses.

Dentre as 74 amostras estudadas, 20 crianças (27%) apresentavam idade inferior a 12 meses e 54 (73%) acima de 12 meses. A Figura 1 demonstra a curva de sobrevida dos pacientes estudados divididos de acordo com a idade ao diagnóstico.

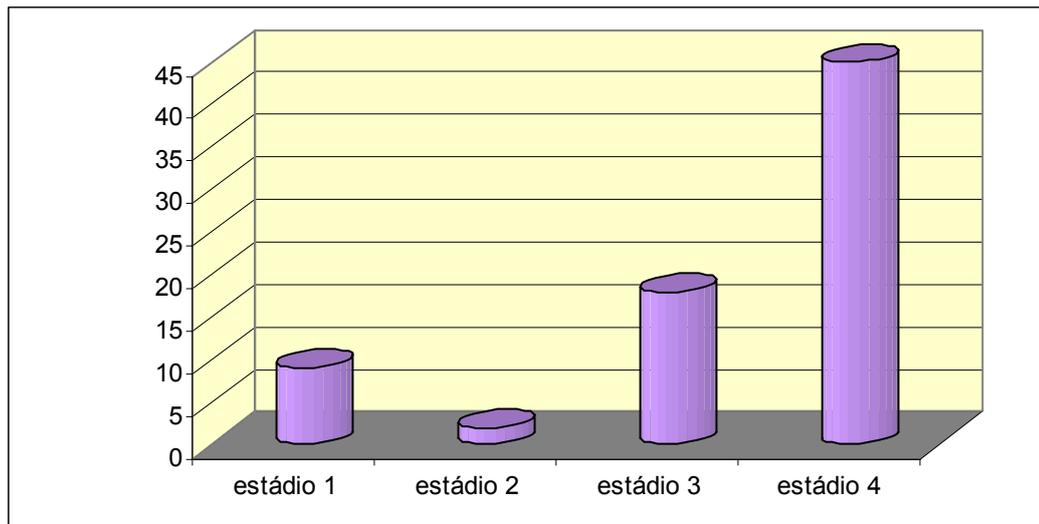


**Figura 1.** Curva de Kaplan-Meier para análise de sobrevida dos pacientes portadores de neuroblastoma divididos conforme a idade em menores ou maiores de 12 meses.

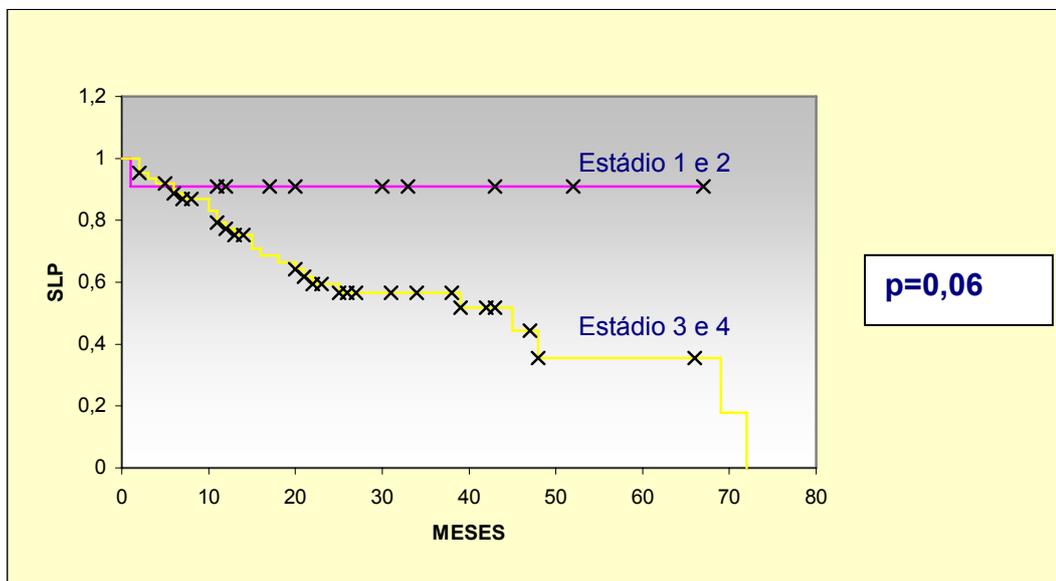
#### 4.1.2 ESTADIAMENTO (INSS)

Os pacientes estavam distribuídos em todos os estádios da doença, exceto no estágio 4S, sendo 9 pacientes (12,3%) classificados no estágio 1; 2 pacientes no estágio 2 (2,7%); 18 pacientes (24%) no estágio 3 e 45 pacientes (61%) no estágio 4. A classificação dos pacientes quanto ao estadiamento de acordo com o Sistema Internacional de Estadiamento para Neuroblastoma (INSS) está representada no gráfico 1:

**Gráfico 1** – Distribuição dos pacientes de acordo com a classificação do estadiamento (INSS)



Para a análise da sobrevida livre de progressão, a classificação do estadiamento foi dividida entre os estádios avançados da doença (estádios 3 e 4) e os estádios precoces (estádios 1 e 2). A Figura 2 demonstra a curva de Kaplan-Meier dos pacientes divididos de acordo com o estadiamento da doença.

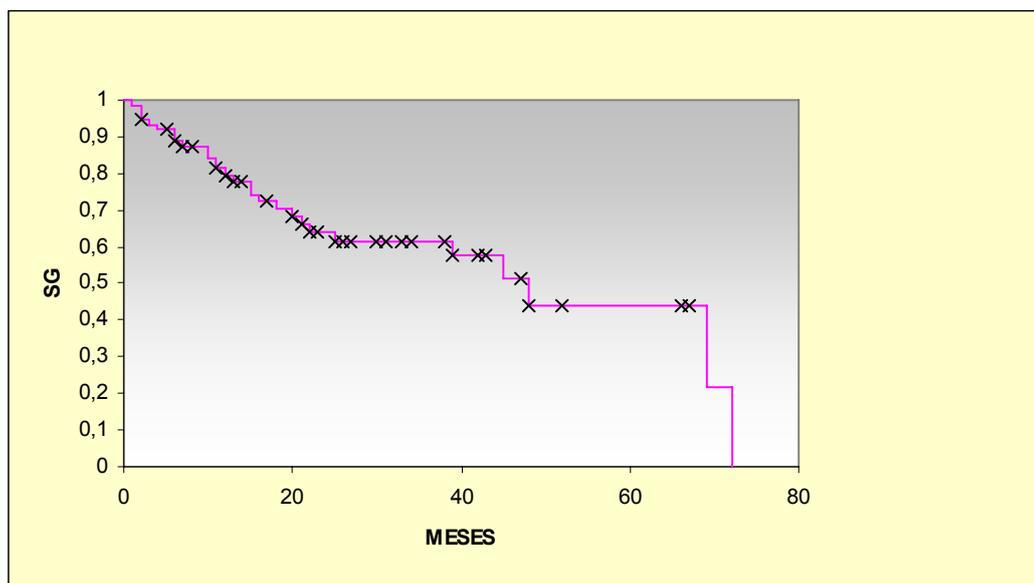


Fi

**gura 2.** Curva de Kaplan-Meier para análise de sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma divididos conforme os estádios não avançados (1, 2 e 4S) e avançados (3 e 4).

#### 4.1.3 SOBREVIDA GLOBAL

A sobrevida global livre de progressão dos 74 pacientes portadores de neuroblastoma, acompanhados neste estudo no período de jan/2004 até dez/2005, independente das variáveis clínicas e biológicas está representada na Figura 3.



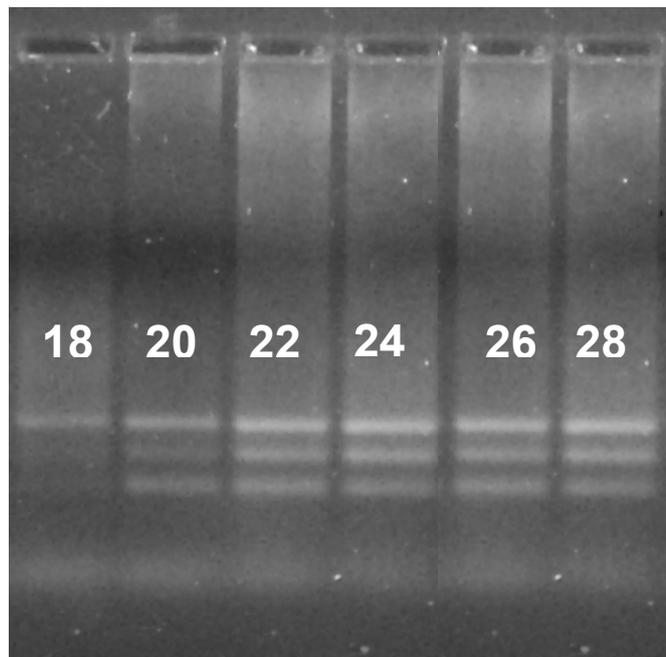
**Figura 3.** Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida global livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma.

## 4.2 ESTUDO DA AMPLIFICAÇÃO DO ONCOGENE *MYCN*

### 4.2.1 ANÁLISE DA INTENSIDADE DA BANDA EM GEL DE AGAROSE

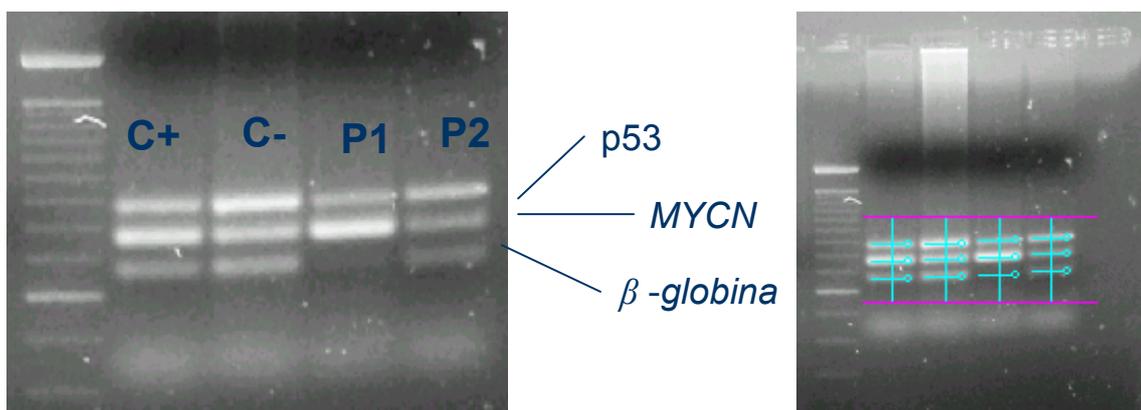
A fim de evitar que a PCR atingisse a fase de platô, na qual poderia haver equivalência do produto da reação, realizamos uma curva de ciclos e selecionamos o ciclo onde o produto de PCR para o gene *MYCN* e os genes internos *p53* e  *$\beta$ -globina*, apresentassem intensidade de bandas equivalentes. Desta forma, pudemos avaliar a intensidade das bandas ainda na fase exponencial da PCR.

A Figura 4 demonstra o início da amplificação dos três genes que foram amplificados (*p53*, *MYCN* e  *$\beta$ -globina*) por volta do vigésimo ciclo da PCR e a estabilização da reação que se dá após o vigésimo sexto ciclo da reação.



**Figura 4.** Visualização do produto de PCR aos 18, 20, 22, 24, 26 e 28 ciclos da reação.

A Figura 5 apresenta a visualização dos resultados da PCR semiquantitativa e a densitometria da intensidade das bandas obtidas após a reação.

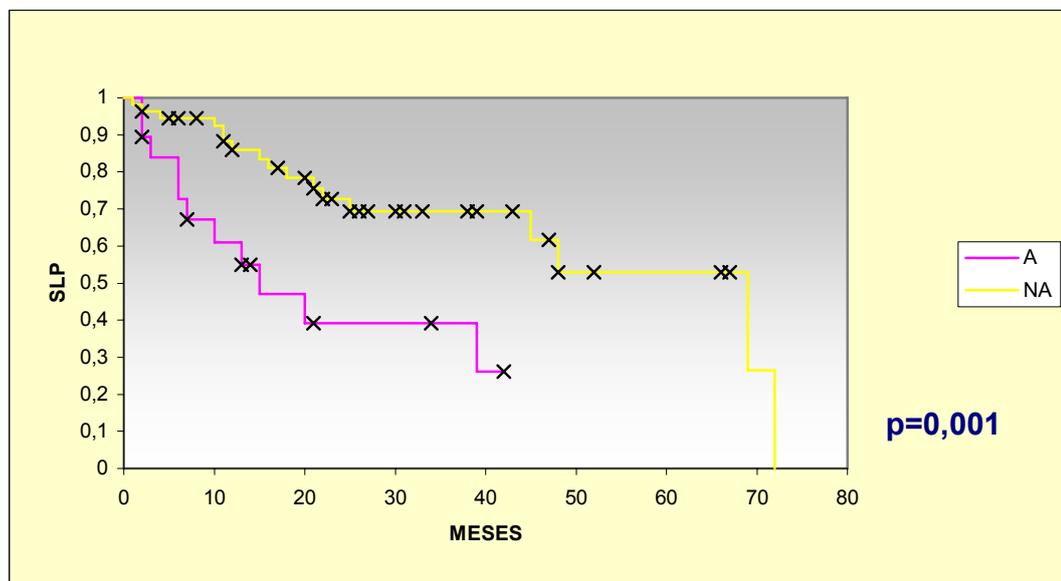


**Figura 5.** Amplificação do oncogene *MYCN* através da técnica de PCR. A imagem do gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo foi obtida no Sistema KodaK na presença de luz UV. (A) representação do controle positivo (C+) com intensidade de banda do *MYCN* maior que dos demais genes (*P53* e  $\beta$ -globina) e do linfócito normal que não apresenta amplificação do gene. P1 e P2 representam dois pacientes sendo P1 amplificado para *MYCN*. (B) representação do software que foi utilizado para quantificar a intensidade das bandas no gel.

Segundo a análise realizada em gel de agarose como descrito em Material e Métodos a amplificação foi determinada quando a relação do gene

*MYCN* pela soma dos genes calibradores foi maior que o valor obtido nas amostras de linfócitos de doadores normais ( $5,3 \pm 1,35$ ).

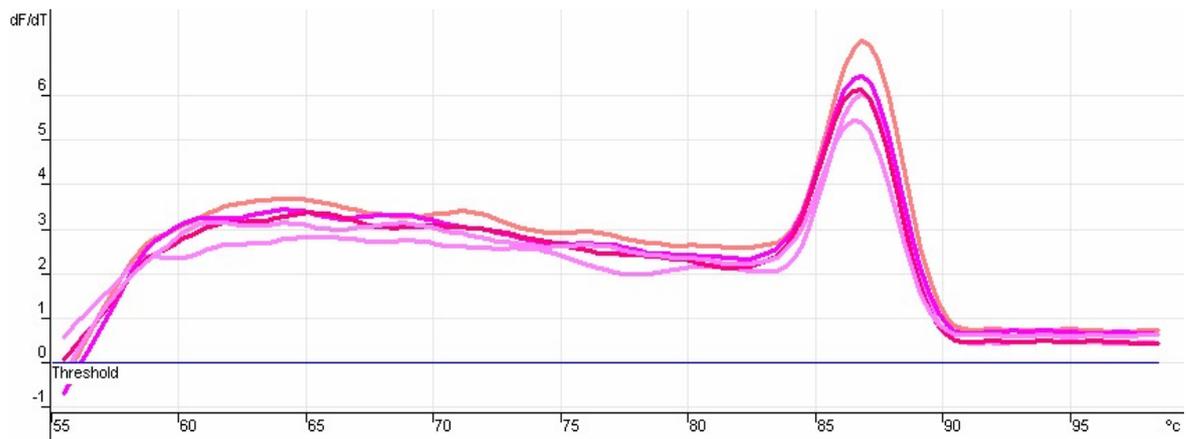
A Figura 6 demonstra as curvas de sobrevida livre de progressão dos pacientes que apresentavam amplificação do oncogene *MYCN* e dos pacientes com ausência deste fenômeno, quando os resultados foram obtidos através da análise em gel de agarose 2%.



**Figura 6.** Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação de *MYCN* através do gel. *MYCN* A = amostras com aumento do número de cópias do oncogene. *MYCN* NA = amostras com 2 cópias de *MYCN*.

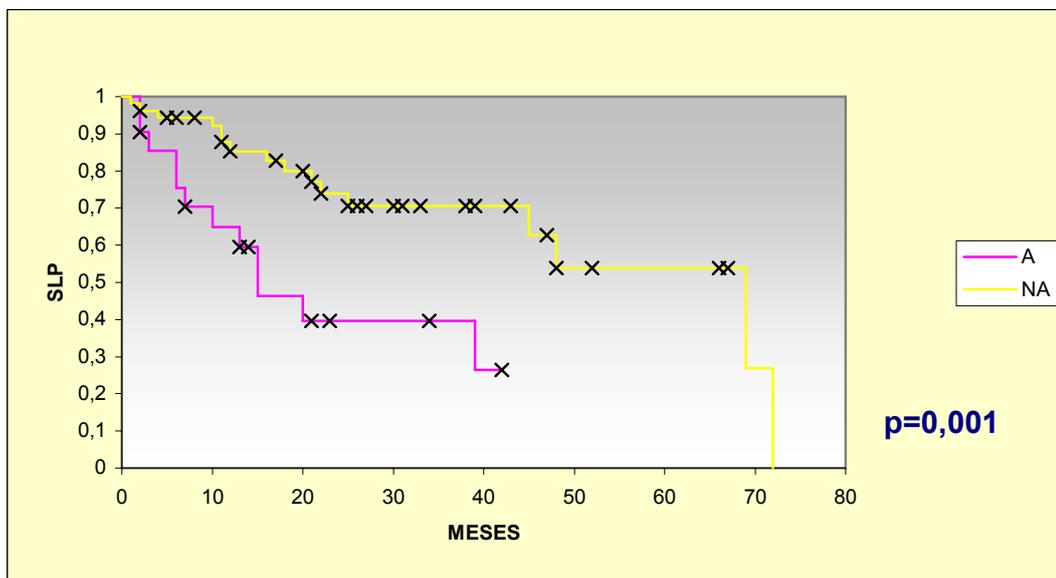
#### 4.2.2 PCR EM TEMPO REAL: QUANTIFICAÇÃO RELATIVA

A reação de PCR em Tempo Real foi realizada utilizando SYBR green I, um corante intercalante de DNA capaz de emitir fluorescência. Devido à baixa especificidade deste corante alguns critérios, como a análise do pico da curva de dissociação (Figura 7) foram, rigidamente, analisados na validação do ensaio. Assim, foram consideradas viáveis somente as amostras com pico único e dentro do eixo esperado na curva de dissociação.



**Figura 7.** Curva de dissociação realizada no estudo da amplificação do oncogene *MYCN*. Pico máximo de fluorescência entre 85-90 °C.

Foram considerados amplificados os pacientes que apresentavam valor de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  acima de  $2,27 \pm 0,10$  em relação aos linfócitos normais. A curva de sobrevida livre de progressão dos pacientes com presença ou ausência da amplificação de *MYCN* está representada na Figura 8.

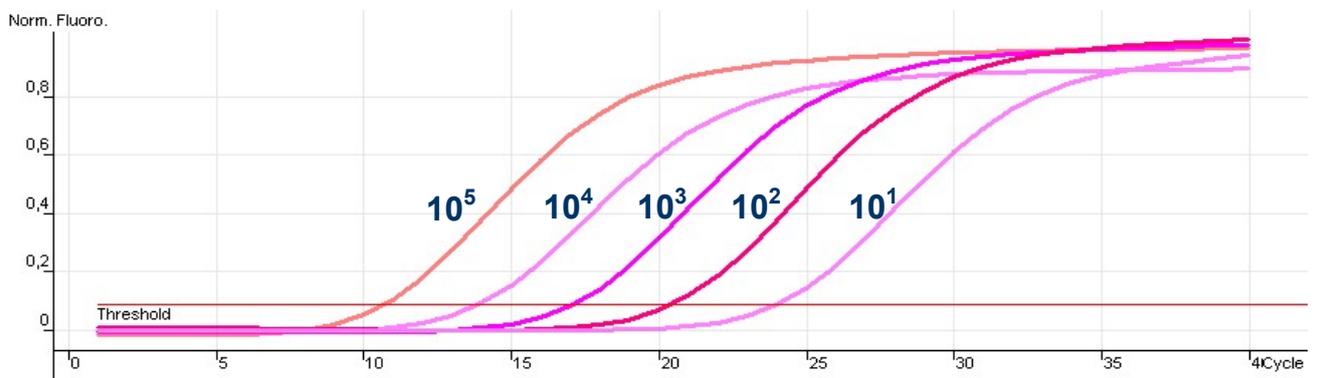


**Figura 8.** Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação do oncogene *MYCN* através da quantificação relativa. *MYCN* NA = amostras com 2 cópias de *MYCN*. *MYCN* A = amostras com aumento de número de cópias do oncogene.

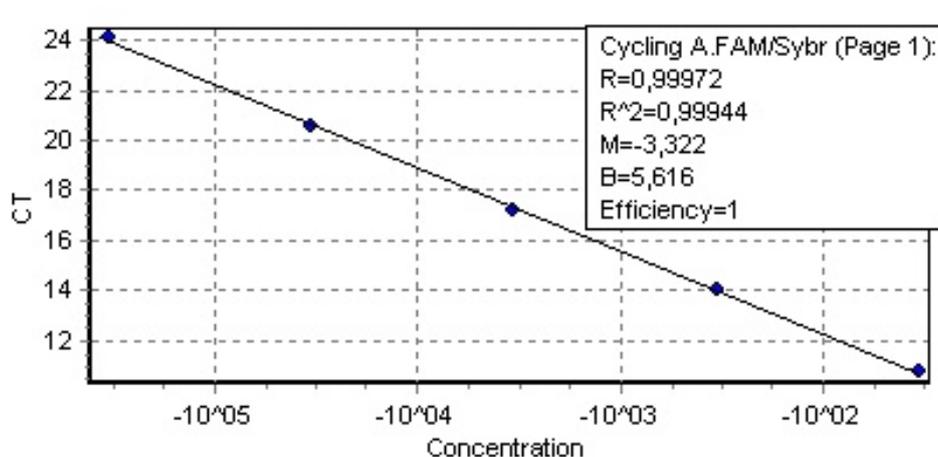
#### 4.2.3 PCR EM TEMPO REAL : QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA

Os resultados da PCR em Tempo Real também foram analisados através de uma curva padrão, construída com DNA de plasmídeo em diluições conhecidas. Para este tipo de análise a curva obedeceu alguns critérios para que o ensaio pudesse ser validado. Assim, foram eletivas para o estudo as amostras em que o ensaio tivesse curva com eficiência próximo de 100%, “slope” (inclinação da reta) próximo de 3,3 e “R” próximo de 1.

As figuras 9 e 10 demonstram os pontos com diluições de DNA de plasmídeo e a análise da reta formada por esses pontos que foi fornecida pelo termociclador a cada ensaio.

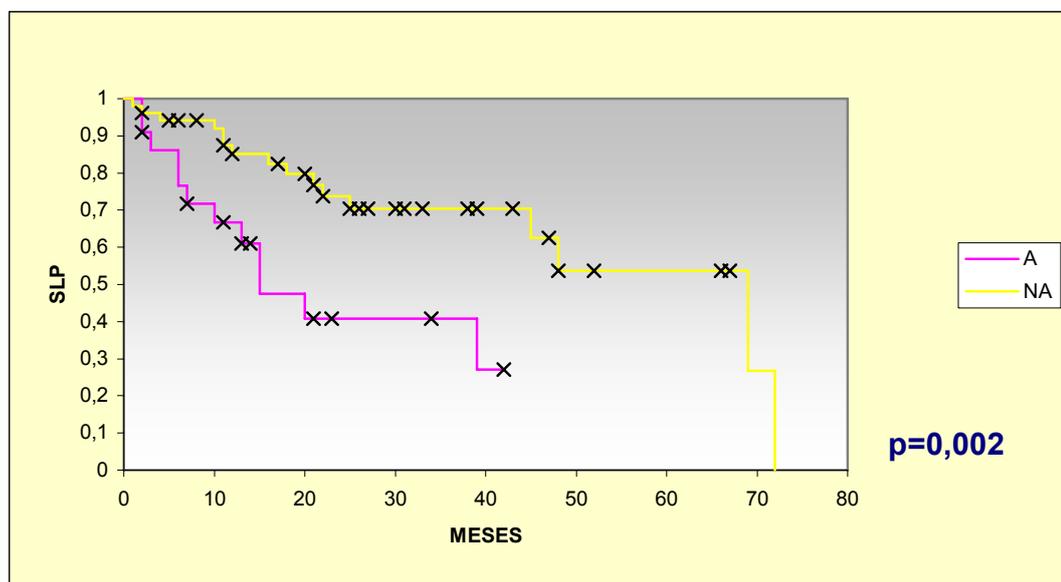


**Figura 9.** Curva de diluição seriada de DNA de plasmídeo clonado com o fragmento de interesse. Concentrações de 100.000 a 10 cópias.



**Figura 10.** Retas formadas pelos pontos da curva padrão. M representa o valor do “slope”.

A Figura 11 representa a sobrevida livre de progressão dos pacientes com presença ou ausência de amplificação do oncogene *MYCN*, quando a análise foi realizada pela quantificação absoluta.

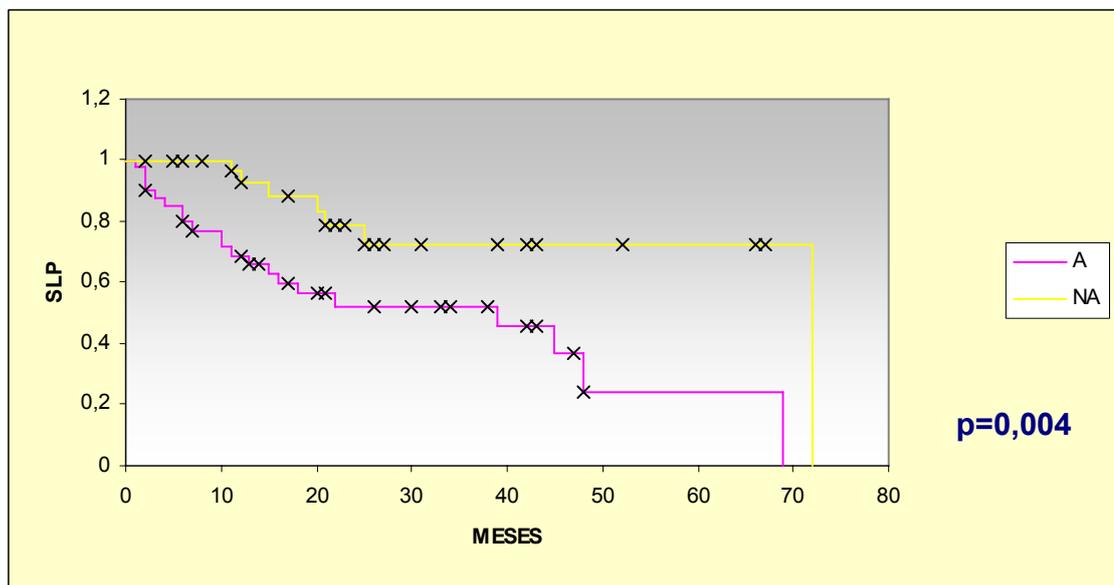


**Figura 11.** Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação de *MYCN* através da quantificação absoluta.

### 4.3 ESTUDO DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE *DDX1*

#### 4.3.1 ANÁLISE DA INTENSIDADE DA BANDA EM GEL DE AGAROSE

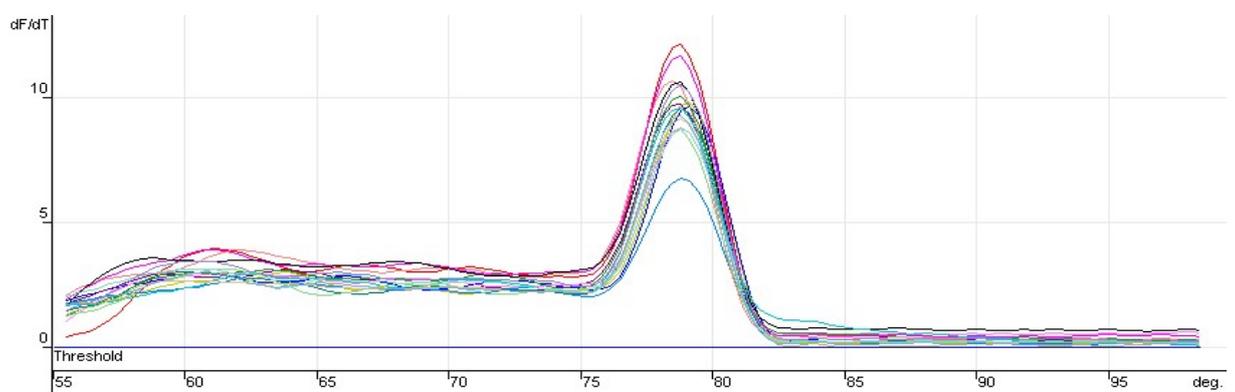
A curva de sobrevida livre de progressão realizada para a análise dos resultados de amplificação do gene *DDX1* em gel de agarose 2% está representada na Figura 12. Foram considerados amplificados os tumores com intensidade de banda acima do obtido na média mais desvio padrão dos linfócitos normais ( $0,89 \pm 0,02$ ).



**Figura 12.** Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação de *DDX1* através do gel de agarose. *DDX1* NA = amostras com 2 cópias do gene. *DDX1* A = amostras com aumento de número de cópias do gene.

#### 4.3.2 PCR EM TEMPO REAL : QUANTIFICAÇÃO RELATIVA

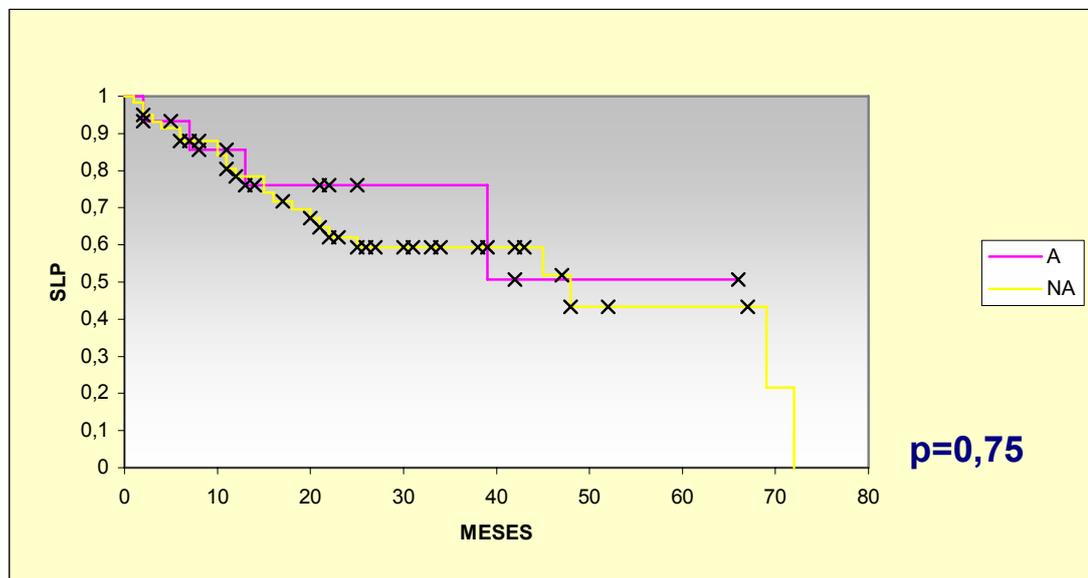
Os mesmos critérios adotados para o estudo do oncogene *MYCN* foram utilizados para o estudo do gene *DDX1*. A curva de dissociação realizada para o gene *DDX1* esta representada na figura 13.



**Figura 13.** Curva de dissociação realizada para o estudo do gene *DDX1*. Pico máximo de fluorescência entre 75-80 °C.

A curva de sobrevida livre de progressão dos pacientes com presença ou ausência da amplificação do gene *DDX1* baseada na análise relativa está representada na Figura 14. Foram considerados amplificados os pacientes que

apresentavam valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  acima do obtido na média mais desvio padrão ( $0,97\pm 0,04$ ) dos linfócitos normais.

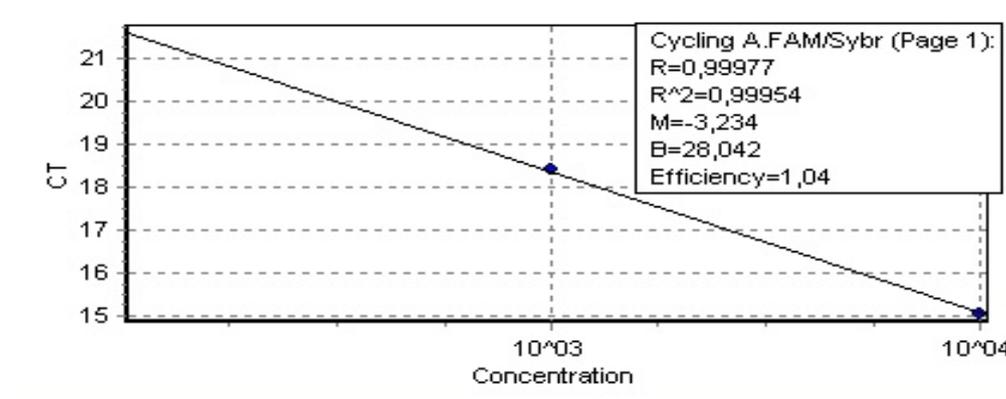


**Figura 14.** Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes portadores de neuroblastoma. Determinação da amplificação do gene *DDX1* através da quantificação relativa. *DDX1* NA = amostras com 2n. *DDX1* A = amostras com aumento de número de cópias do gene.

#### 4.3.3 PCR EM TEMPO REAL : QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA

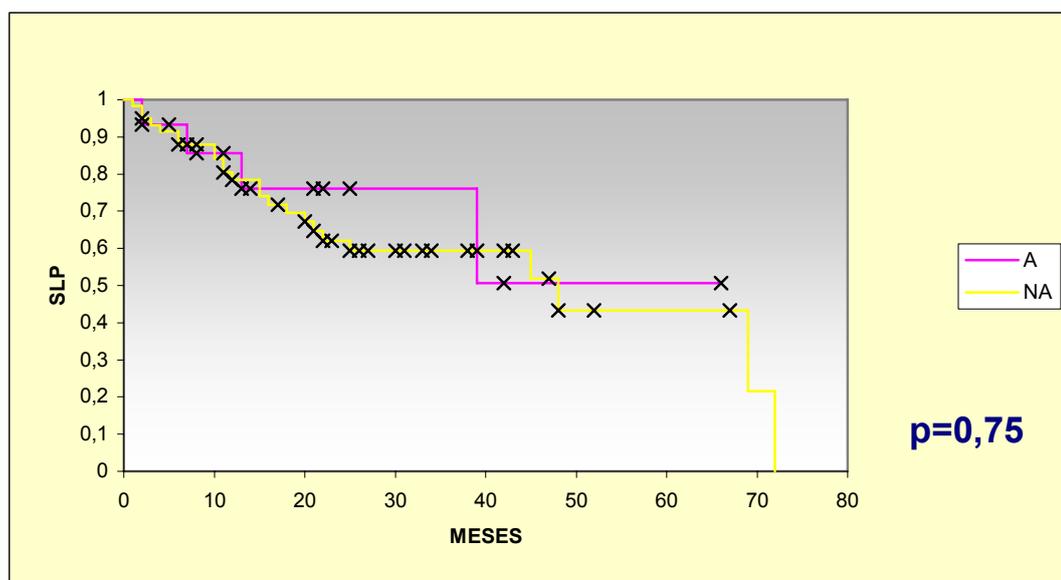
A figura 15 demonstra a eficiência da reação, através da amplificação dos pontos da curva padrão. A validação do ensaio foi baseada no valor de

eficiência que em todas as corridas esteve perto de 100%.



**Figura 15.** Retas formada pelos pontos da curva padrão. M representa o valor do “slope”.

A curva da sobrevida livre de progressão dos pacientes com presença ou ausência da amplificação de *DDX1* está representada na Figura 16. Foram considerados amplificados os pacientes que apresentavam número de cópias acima do obtido na média dos linfócitos normais ( $1,29 \pm 0,05$ ).



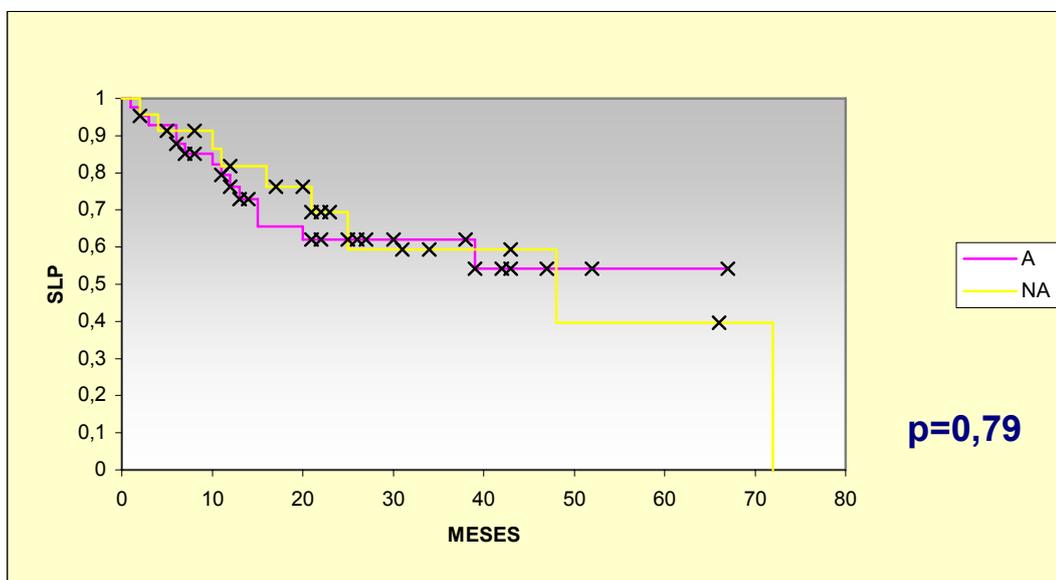
**Figura 16.** Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação de *DDX1* através da

quantificação absoluta. *DDX1* NA = amostras com 2 cópias do gene. *DDX1* A = amostras com aumento de número de cópias do gene.

#### **4.4 ESTUDO DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE *NAG***

##### **4.4.1 ANÁLISE DA INTENSIDADE DA BANDA EM GEL DE AGAROSE**

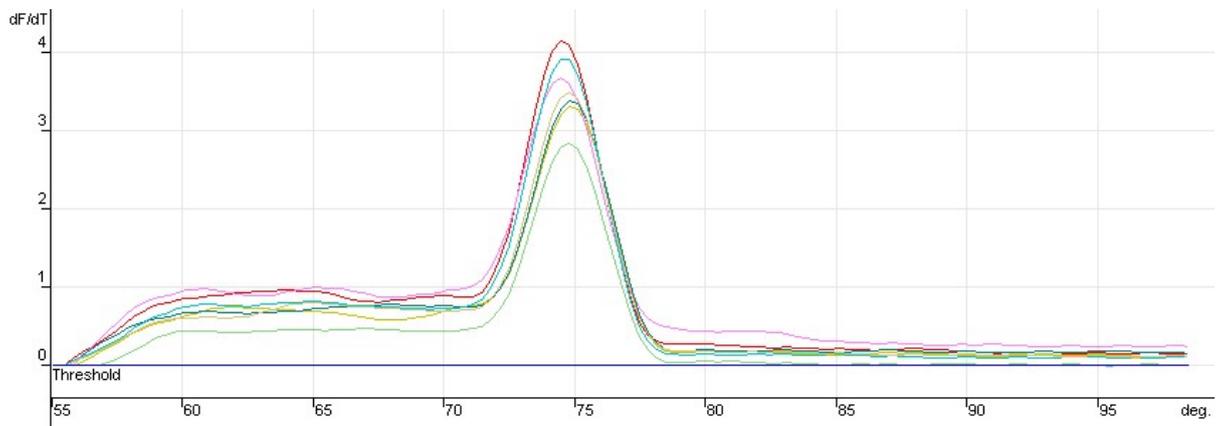
A curva de sobrevida livre de progressão realizada para a análise dos resultados de amplificação do gene *NAG* em gel de agarose 2% está representada na Figura 17. Foram considerados amplificados os tumores com intensidade de banda acima do obtido na média mais desvio padrão dos linfócitos normais ( $0,95 \pm 0,03$ ).



**Figura 17.** Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação de *NAG* através do gel de agarose. *NAG* NA = amostras com 2 cópias do gene. *NAG* A = amostras com aumento de número de cópias do gene.

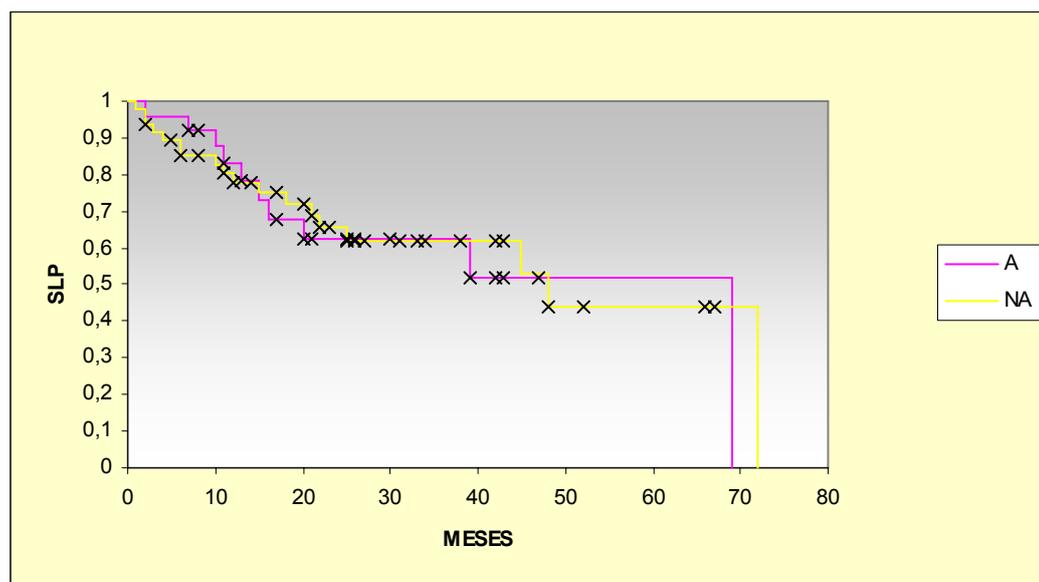
#### 4.4.2 PCR EM TEMPO REAL : QUANTIFICAÇÃO RELATIVA

A Figura 18 representa a curva de dissociação realizada para o estudo do gene *NAG* por quantificação relativa.



**Figura 18.** Curva de dissociação realizada para o estudo do *NAG*. Pico máximo de fluorescência próximo 75°C.

A curva de sobrevida livre de progressão dos pacientes portadores de neuroblastoma, realizada para o estudo do gene *NAG* pela quantificação relativa está representada na Figura 19. Foram considerados amplificados os pacientes que apresentavam valor de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  acima do obtido na média mais desvio padrão dos linfócitos normais ( $1,02 \pm 0,10$ ).

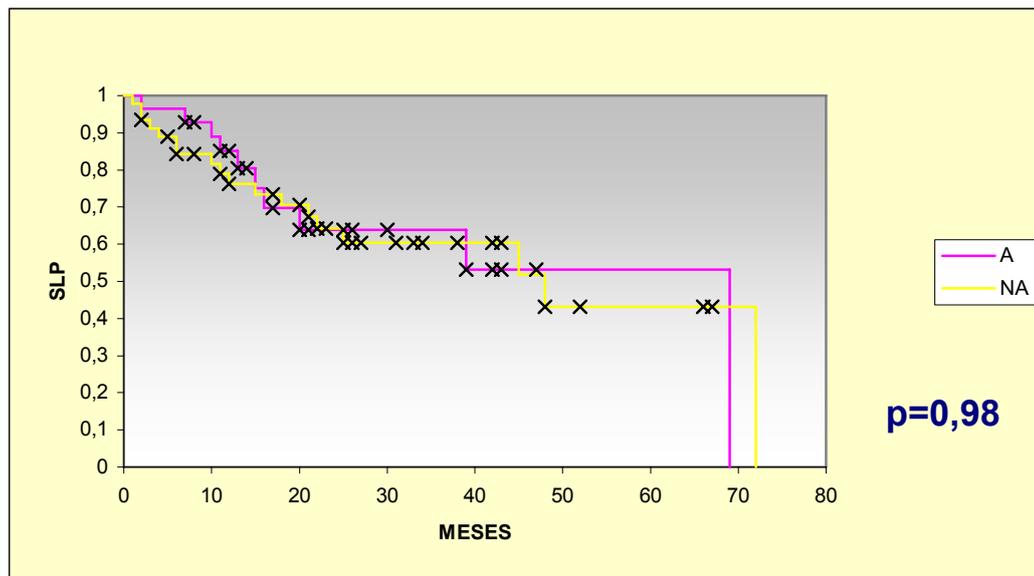
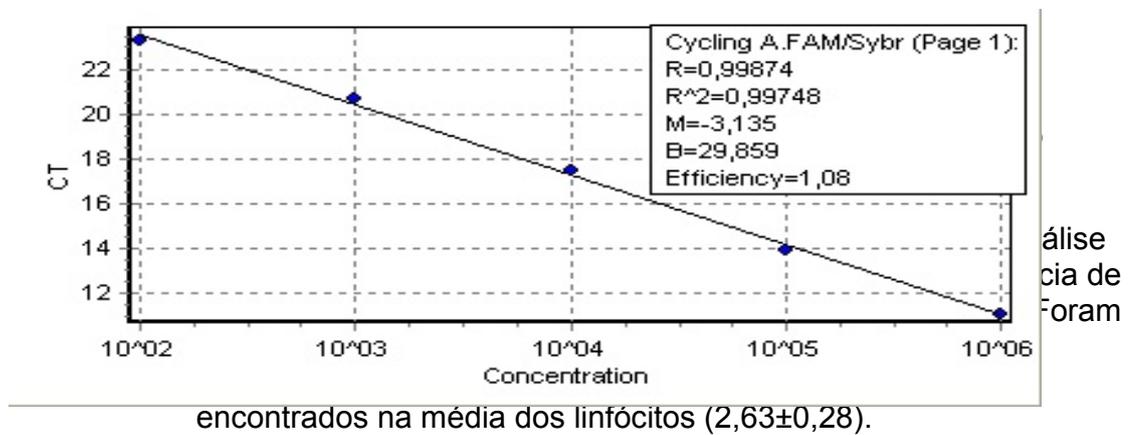


p=0,79

**Figura 19.** Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação de NAG através da quantificação relativa. NAG NA = amostras com 2 cópias do gene. NAG A = amostras com aumento de número de cópias do gene.

#### 4.4.3 PCR EM TEMPO REAL : QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA

A figura 20 demonstra a eficiência da reação, através da amplificação dos pontos da curva padrão.



**Figura 21.** Curva de Kaplan-Meier para análise da sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma. Determinação da amplificação de NAG através da

quantificação absoluta. *NAG NA* = amostras com 2 cópias do gene. *NAG A* = amostras com aumento de número de cópias do gene.

#### **4.5 COMPARAÇÃO ENTRE AS METODOLOGIAS ESTUDADAS**

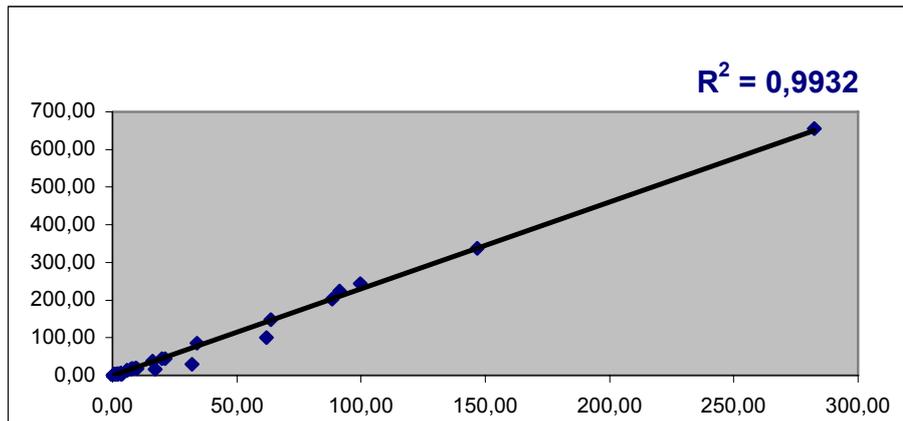
Neste estudo foram realizadas duas metodologias e três formas de análise diferentes para avaliar a amplificação gênica. A primeira metodologia aplicada foi a PCR semiquantitativa, cujos resultados foram analisados através da densitometria da intensidade das bandas em gel de agarose 2%. A segunda metodologia de escolha foi a PCR em Tempo Real, a qual foi analisada através da quantificação relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) e da análise baseada numa curva padrão, quantificação absoluta.

Comparando as formas de análise dos resultados, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantificação relativa e a absoluta que foram adotadas para a metodologia de PCR em Tempo Real.

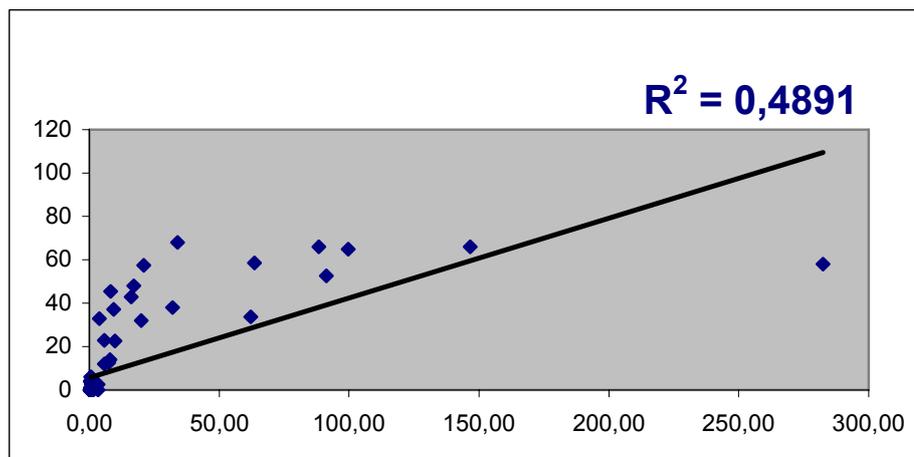
Em contra partida, quando comparamos a quantificação absoluta e relativa com a quantificação das bandas em gel de agarose observamos que não há relação nos resultados.

As figuras 22 a 24 demonstram a relação entre os métodos de quantificação utilizados: quantificação das bandas do gel de agarose,

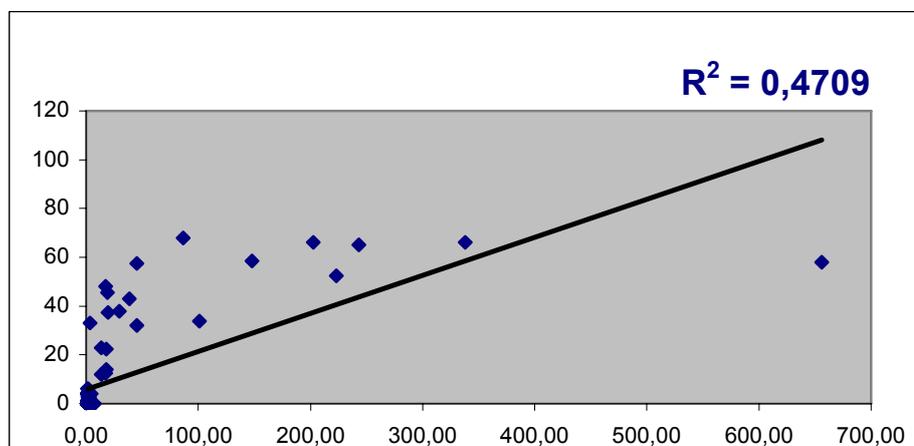
quantificação relativa e quantificação absoluta para o gene *MYCN*. Os mesmos resultados foram encontrados para os genes *DDX1* e *NAG*.



**Figura 22.** Comparação da quantificação relativa e absoluta da PCR em Tempo Real para o oncogene *MYCN*.



**Figura 23.** Comparação da quantificação relativa e o gel de agarose para o oncogene *MYCN*.



**Figura 24.** Comparação da quantificação absoluta e o gel de agarose para o oncogene *MYCN*.

#### 4.6 ANÁLISE MULTIVARIADA

A análise de sobrevida multivariada através do modelo de Cox permite uma avaliação da influência de todos os fatores simultaneamente no tempo de sobrevida. O modelo ajustado cujas estimativas encontram-se na tabela , apontou significância marginal para o fator biológico *MYCN* ( $p = 0,0699$ ).

A significância univariada (item 4.2.3 dos resultados) da presença de amplificação de *MYCN* foi confirmada neste modelo, indicando uma associação significativa entre este fator e o tempo de sobrevida. O risco estimado de óbito de um paciente com amplificação do oncogene *MYCN* é da ordem de 1,56 vezes maior (IC: 0,96 a 2,47) que o risco de um paciente que não apresentou amplificação, quando ambos estiverem nas mesmas categorias para as demais variáveis.

Os fatores biológicos amplificação de *DDX1* e *NAG* apresentaram resultados não significantes com relação ao tempo de sobrevida no modelo de

Cox, indicando não haver associação entre estes fatores e a sobrevida tanto isoladamente (itens 4.3.3 e 4.4.3 dos resultados respectivamente), quanto na presença de outros fatores.

**Tabela 4.** Relação entre risco relativo de óbito e fatores de prognóstico clínicos e biológicos

Variável	Risco Relativo	IC <sub>RR</sub> (95%)	p
Estádio	0,54	0,12 ; 1,22	0,16
Idade	0,0008	0 ; 0,59	0,00019
Amplificação de <i>MYCN</i>	1,56	0,96; 2,47	0,0699
Amplificação de <i>DDX1</i>	0,83	0,43 ; 1,47	0,54
Amplificação de <i>NAG</i>	0,96	0,03 ; 0,85	0,85

## 5 DISCUSSÃO

O neuroblastoma é uma neoplasia que desperta interesse no meio científico devido ao seu comportamento complexo, dado os diversos eventos genéticos que podem ocorrer nas células neoplásicas. A etiologia da doença permanece desconhecida e os fatores genéticos descritos até o momento, não foram capazes de sinalizar quais as possíveis causas da doença ou determinar o tipo e a intensidade mais apropriada de tratamento (De Preter, 2006).

Os marcadores biológicos anteriormente descritos, como índice de DNA, amplificação de *MYCN*, deleção do 1p, ganho do 17q e expressão de *TRKA*, já demonstraram ser importantes variáveis prognósticas. No entanto, outros

marcadores que classifiquem melhor os pacientes como baixo, intermediário ou alto grau de risco ainda necessitam ser identificados.

Mediante essas lacunas existentes na literatura nós procuramos além de aperfeiçoar a análise da amplificação do oncogene *MYCN*, o qual já é comprovadamente um poderoso indicador de prognóstico nos neuroblastomas, ainda investigar o papel de dois outros genes como marcadores de prognóstico nessa neoplasia.

O Laboratório de Biologia Tumoral do Serviço de Hematologia da Faculdade de Medicina do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo por ser um laboratório de referência na realização da análise da amplificação do *MYCN* por PCR, recebe amostras de tecido tumoral provenientes de diversos centros do país. Porém, nem todos os pacientes puderam ser acompanhados durante toda a evolução da doença e assim, tivemos que restringir a correlação dos resultados aos dados clínicos de 74 pacientes.

Dentre as variáveis clínicas analisadas, a idade ao diagnóstico mostrou ter influência na sobrevida livre de progressão nos pacientes com idade inferior a 12 meses. Há trabalhos mais recentes, (George, 2005; Schmidt, 2005) que aumentaram o limite de idade do grupo com prognóstico favorável para 18 meses, devido ao comportamento do tumor e a resposta ao tratamento nesses pacientes, ser mais compatível com o que se observa nos pacientes menores de 12 meses. Entretanto, optamos por manter o limite de corte em 12 meses, pois é o encontrado com maior frequência na literatura como determinante de

prognóstico favorável, além de não prejudicar a correlação de dados com os outros fatores prognósticos avaliados no nosso trabalho.

O estadiamento da doença foi classificado de acordo com o INSS e demonstrou que os nossos pacientes estavam predominantemente classificados nos estádios avançados da doença (estádio 3 e 4). Também obtivemos maior número de óbitos nesse grupo de pacientes, com 35,4% (23/65) das crianças estudadas. Nos estádios precoces, que compreenderam os estádios 1 e 2, observamos que apenas 8,3% (1/12) das crianças foram a óbito ( $p=0,06$ ). Assim, demonstramos que a classificação do estadiamento, bem como a idade exerce forte influência na sobrevida livre de progressão dos pacientes com neuroblastoma.

Além dos marcadores clínicos, os quais classificam os pacientes quanto ao prognósticos, também é importante considerar o papel dos marcadores biológicos na caracterização dos neuroblastomas. Dentre os marcadores biológicos, a amplificação do oncogene *MYCN* exerce um papel bastante relevante, por estar associada ao grupo de pacientes com prognóstico desfavorável (Schwab, 1983). A análise da amplificação do *MYCN* em pacientes com neuroblastoma auxilia a prever o grau de risco, a resposta ao tratamento, a sobrevida livre de progressão e o índice de mortalidade e morbidade global dos pacientes de forma mais acurada.

No entanto, a avaliação da amplificação do *MYCN* somente auxilia no prognóstico dos neuroblastomas se for realizada por uma metodologia precisa. Muitos métodos foram propostos para avaliar a amplificação gênica, dentre os

quais, podemos citar as técnicas de Southern blot, dot blot, hibridização in situ por fluorescência (FISH), PCR e PCR em Tempo Real.

Tanto a PCR quanto a PCR em Tempo Real mostraram ser mais vantajosas que os demais métodos por não utilizar material radioativo, não necessitar de grande quantidade de amostra para a análise e pela alta sensibilidade e especificidade destas técnicas.

A PCR convencional é uma metodologia de menor custo quando comparada à PCR em Tempo Real e por esta razão pode estar disponível mesmo em pequenos centros de saúde. A PCR em Tempo Real quantifica o produto da reação ainda na fase exponencial do ensaio e fornece resultados mais acurados ou fidedignos quanto a quantificação em relação a PCR convencional por dispensar a análise por eletroforese. Ainda que as vantagens da PCR em Tempo Real estejam bem claras, o alto custo do termociclador necessário para a realização desta técnica e o alto custo dos reagentes ainda são um entrave na definição desta metodologia como a melhor alternativa para se realizar estudos de biologia molecular (Hiyama, 1999; De Preter, 2002).

Devido às duas técnicas apresentarem pontos positivos e negativos, realizamos ambas e comparamos os resultados obtidos para avaliar qual seria o custo-benefício da aplicação de cada uma.

Assim, para a análise do oncogene *MYCN* através da PCR semiquantitativa, encontramos 29,7% dos pacientes com presença da amplificação. A presença da amplificação ocorreu somente nos estádios mais avançados da doença o que remete à característica de agressividade e rápida

progressão tumoral que está associada à presença da amplificação desse oncogene (Schwab, 2003; van Noesel, 2004). Analisando-se a curva de sobrevida livre de progressão, observamos que há diferença estatisticamente significativa no tempo de sobrevida do grupo de pacientes com presença da amplificação em relação ao grupo de pacientes com ausência de amplificação ( $p=0,001$ ).

Analisando os resultados obtidos pela PCR em Tempo Real para a amplificação do oncogene *MYCN*, obtivemos resultados compatíveis com os resultados da PCR semiquantitativa tanto pela quantificação absoluta quanto pela relativa. A amplificação do oncogene *MYCN* somente foi observada nos estádios mais avançados da doença e as curvas de sobrevida livre de progressão de ambas as análises mostraram diferença estatisticamente significativa na mediana do tempo de sobrevida dos pacientes com presença da amplificação em relação aos pacientes com ausência de amplificação.

Quanto à comparação das metodologias para a análise da amplificação do oncogene *MYCN*, pudemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantificação relativa e absoluta da PCR em Tempo Real e que não houve equivalência quando comparamos a PCR semiquantitativa à PCR em Tempo Real para ambas formas de quantificação.

As análises que foram realizadas para a avaliação de amplificação do oncogene *MYCN* também foram realizadas para avaliar a amplificação dos genes *DDX1* e *NAG* no mesmo grupo de pacientes e pelas três formas de

análise: PCR semiquantitativa e PCR em Tempo Real pela quantificação absoluta e relativa.

Analisando a amplificação do gene *DDX1* pela PCR semiquantitativa observamos que houve diferença estatisticamente significativa no tempo de sobrevivência dos pacientes com amplificação deste gene em relação aos pacientes com ausência da amplificação ( $p=0,004$ ). No entanto, este dado não foi confirmado quando analisamos as amostras na PCR em Tempo Real. Tanto pela quantificação absoluta quanto pela quantificação relativa não encontramos diferença estatisticamente significativa ( $p=0,75$ ).

Assim, pelos resultados da PCR semiquantitativa, a amplificação do gene *DDX1* exerceria papel importante na determinação do tempo de sobrevivência dos pacientes com neuroblastoma. Porém, devido aos problemas de sensibilidade desta técnica, algumas amostras com pequeno aumento no número de cópias podem ter sido consideradas como amplificadas. Ou seja, devido a acurácia dos resultados fornecidos pela PCR em Tempo Real e ao fato de que houve concordância nas duas formas de quantificação aplicadas, é mais provável que a amplificação do gene *DDX1* não tenha relevância no tempo de sobrevivência dos pacientes com neuroblastoma ou na determinação do prognóstico nesta doença.

Analisando os resultados da amplificação do gene *DDX1*, obtivemos equivalência entre as quantificações absoluta e relativa realizadas para analisar os resultados da PCR em Tempo Real e não houve equivalência quando

comparamos os resultados da PCR semiquantitativa com os resultados da PCR em Tempo Real para ambas formas de quantificação.

A análise da amplificação do gene *NAG* não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a sobrevida livre de progressão dos pacientes em nenhuma das duas PCR realizadas. Para a PCR semiquantitativa e para a quantificação relativa obtivemos valor de  $p=0,79$  e obtivemos  $p=0,98$  na quantificação absoluta.

Na comparação entre as metodologias, assim como já havia sido observado na análise dos outros genes estudados, a PCR semiquantitativa não se mostrou equivalente a nenhuma das formas de quantificação adotadas para a PCR em Tempo Real.

A reação de PCR semiquantitativa não permite apontar com acurácia um pequeno aumento de cópias de um gene devido à dificuldade de se quantificar a intensidade das bandas no gel de agarose. Este método mostrou-se mais confiável que apenas a avaliação visual da imagem do gel. Porém, pontos de variação do gel como espessura, preparo e tempo de análise após o término da eletroforese podem interferir na interpretação do software e prejudicar a análise do resultado. Assim, para um melhor aproveitamento dessa forma de análise é necessário minimizar esses interferentes e avaliar de forma criteriosa, se os números fornecidos pelo software vão de acordo com o que se avalia visualmente na imagem do gel.

A PCR em Tempo Real além de demonstrar acurácia e alta sensibilidade e especificidade, ainda possui a vantagem de fornecer resultados em menor tempo

que a PCR semiquantitativa. No entanto, o alto custo do aparelho, dos reagentes necessários para a sua realização e a dificuldade de padronização de novos protocolos são alguns dos inconvenientes da técnica.

Outro ponto de discussão a respeito da PCR em Tempo Real é a forma de análise dos resultados. A fim de solucionar este problema, vários métodos matemáticos foram desenvolvidos e estão sendo utilizados no meio científico. Neste trabalho optamos por quantificar nossos resultados tanto pelo método absoluto quanto pelo relativo (Livak, 2000).

Com a realização deste trabalho pudemos padronizar uma forma alternativa de avaliação da amplificação gênica que, dependendo da praticidade, do custo e da amostragem pode vir a substituir a metodologia de PCR semiquantitativa que estava sendo realizada até hoje no nosso laboratório.

Além disso, padronizamos um método de avaliar a amplificação de dois outros genes relacionados aos neuroblastomas, os genes *DDX1* e *NAG*, que com o avanço das pesquisas podem vir a se tornar definitivamente, genes relacionados ao prognóstico da doença e, poderão ser disponibilizados no nosso serviço como mais um parâmetro para avaliar o prognóstico nos neuroblastomas.

## **6 CONCLUSÕES**

- Acreditamos que a metodologia de PCR possa continuar sendo utilizada de forma semiquantitativa para estudo do gene *MYCN*. No entanto, nos estudos dos genes *DDX1* e *NAG* não obtivemos resultados tão bons pela técnica semiquantitativa.

- No estudo da amplificação gênica pela PCR em Tempo Real, após compararmos duas formas distintas de analisar os resultados, observamos que a quantificação absoluta é mais vantajosa por fornecer o número exato de cópias do gene que está sendo estudado.
- A quantificação relativa, ainda que forneça o resultado em relação a uma amostra controle, não deixa de ser uma boa alternativa de análise para estudos por PCR em Tempo Real, visto que esta se mostrou equivalente a quantificação absoluta e o gasto de reagentes é minimizado nesta forma de quantificação.
- Confirmamos o importante papel que a amplificação do oncogene *MYCN* exerce como marcador de prognóstico nos neuroblastomas.
- Porém, o mesmo não pôde ser afirmado a respeito dos genes *DDX1* e *NAG* em relação ao prognóstico dos neuroblastomas.

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Bernard, PS, Wittwer, CT. Real-Time PCR Technology for cancer diagnostics. *Clinical Chemistry*, 2002; 48: 1178-85.

Bernardi B. Why does neuroblastoma attract us so much? *Cancer Letters* 2005; 1-2.

Bown, N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol.* 2001; 54(12): 897-910.

Bown N, Cotterill S, Lastowska M. Gain of chromosome 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *New England J. Med.* 1999; 340: 1954-61.

Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PS. Biology and genetics of human neuroblastomas. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 1997; 19:93-101.

Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev Cancer* 2003; 3: 203-16.

Brossard J, Bernstein ML, Lemieux B. Neuroblastoma: an enigmatic disease. *British Medical Bulletin* 1996; 52:787-801.

Caron H, De Kraker JD. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *New England J. Med.* 1996; 334: 225-30.

Castleberry RP, Pritchard J, Ambros P. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG): a preliminary report. *European J. Cancer* 1997; 33: 2113-16.

Castleberry RP. Neuroblastoma. *Europe Journal of Cancer* 1997; 33:1430-38.

Coller HA, Grandori C, Tamayo P. Expression analysis with oligonucleotides micorarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci* 2000; 97: 3260-65.

De Preter K, Speleman F, Combaret V, Lunec J, Laureys G, Eussen BHJ, Francotte N. Quantification of *MYCN*, *DDX1* and *NAG* gene copy number in neuroblastoma using a real-time quantitative PCR assay. *Mod Pathol* 2002; 15:159-66.

De Preter K, *at al.* Human fetal neuroblast and neuroblastoma transcriptome analysis confirms neuroblast origin and highlights neuroblastoma candidate genes. *Genome biology* 2006; 7:1-34.

Frühwald, MC, O'Dorisio, MS, Rush LJ, Reiter, JL, Smiraglia, DJ, Wenger, G, Costello, JF, White PS, Krahe, R, Brodeur, GM, Plass, C. Gene amplification in PNETs/medulloblastomas: mapping of a novel amplified gene within the *MYCN* amplicon. *J Med Genet* 2000; 37: 501-9.

George RE, London WB, Cohn SL, Maris JM, Kretschmar C, Diller L, Brodeur GM, Castleberry RP, Look AT. Hyperdiploidy plus nonamplified *MYCN* confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: a pediatric oncology group study. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23:6466-72.

George, RE, Kenyon, RMcGuckin, AG, Kohl, N, Kogner, P, Christiansen, H, Pearson, ADJ, Lunec, J. Analysis of candidate gene co-amplification with *MYCN* in neuroblastoma. *European Journal of Cancer* 1997; 33: 2037-42.

Ginzinger, DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 2002; 30: 503-12.

Godbout, R, Packer, M, Bie, W. Overexpression of a DEAD Box Protein (*DDX1*) in neuroblastoma and retinoblastoma cell lines. *The journal of biological chemistry* 1998; 273: 21161-68.

Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, *et al.* Prediction of *MYCN* amplification in neuroblastoma using serum DNA and Real-Time quantitative polymerase chain reaction. *Journal of clinical oncology* 2005; 23: 5205-10.

Grandori C, Mac J, Siebelt F, Ayer DE, Eisenman RN. Myc-Max heterodimers activate a DEAD box gene and interact with multiple E box-related sites in vivo. *The Embo journal* 1996; 15(16): 4344-57.

Grosfeld JL, Rescoria FJ, West KW. Neuroblastoma in the first year of life: clinical and biologic factors influencing outcome. *Semin. Pediatric Surgery* 1993; 2: 37-46.

Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Fukuba I, Yamaoka H, Shay JW, Matsuura Y. Rapid Detection of *MYCN* Gene Amplification and Telomerase Expression in Neuroblastoma. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 601-9.

Israel MA. The evolution of clinical molecular genetics. *The American journal of pediatric hematology/oncology* 1986; 8:163-72.

Kaneko M, Nishiriha H, Mugishima H. Stratification of treatment of stage 4 neuroblastoma patients based on N-myc amplification status. *Med Pediatric Oncol* 1998; 31: 1-7.

Kaneko S, Ohira M, Nakamura Y, Isogai E, Nakagawara A, Kaneko M. Relationship of DDX1 and NAG gene amplification/overexpression to the prognosis of patients with *MYCN*-amplified neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncology* 2006.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.

Look AT, Hayes FA, Shuster JJ. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology* 1991; 9: 581-91.

Maris JM, Matthay KK. *Molecular Biology of Neuroblastoma* 1999; 17: 2264-79.

Maris JM, WEISS MJ, GUO C, *et al.* Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group Study. *Journal Cancer Research* 2000; 18: 1888-99.

Maris JM, WEISS MJ, MOSSE Y, *et al.* Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13. *Cancer Research* 2002; 62: 6651-58.

Michalek AM, Buck GM, Nasca PC, *et al.* Gravid health status, medication use, and risk of neuroblastoma. *Am J Epidemiology* 1996; 143:996-1001.

Mora, J, Gerald, WL. Origin of neuroblastic tumors: clues for future therapeutics. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2004;4:89-98.

Mosse YP, Greshock J, Weber BL, Maris JM. Measurement and relevance of neuroblastoma DNA copy number changes in the post -genome era. *Cancer Letters*, 2005:1-8.

Nikiforov MA, Kotenko J, Petrenko O, Beavis A, Valenick L, Lemischka I, Cole MD. Complementation of Myc-dependent cell proliferation by cDNA expression library screening. *Oncogene* 2000; 19: 4828-31.

PCR PRIMER A laboratory manual. Dieffenbach,CW; Dveksler, GS. CSHL press, 1995 USA.

Principles and Practice of Pediatric Oncology. 3.ed. Philadelphia, Pizzo, P. A. & Poplack, D. G., 1997; 761-798.

Riley, RD, Heney D, Jones, DR, Sutton, AJ, Lambert, PC, Abrams KR, Young, B, Wailoo, AJ, Burchill, SA. A Systematic Review of Molecular and Biological Tumor Markers in Neuroblastoma. *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 4-12.

Rubie H, Hartmann O, Michon J. N-myc gene amplification is a major prognostic factor in localized neuroblastoma: results of the French NBL 90 study. *Journal of Clinical Oncology* 1997; 15: 1171-82.

Ryan KM, Birnie GD. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem Journal* 1996; 314: 713-21.

Sawai S, Shimono A, Hanaoka K, Kondoh H. Embryonic lethality resulting from disruption of both N-myc alleles in mouse zygotes. *New Biol* 1991; 3: 861-69.

Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumor. *Nature* 1983; 245-48.

Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *The Lancet Oncology* 2003; 4:472-80.

Schwab, M. Molecular cytogenetics of human neuroblastoma. *Biochimica et biophysica acta* 1992; 1114:43-50.

Schwab, M. *MYCN* in neuronal tumours. *Cancer letters* 2004; 204: 179-87.

Scott D, Elsdon J, Pearson A, Lunec J. Genes co-amplified with *MYCN* in neuroblastoma: silent passengers or co-determinants of phenotype? *Cancer Letters* 2003; 197: 81-6.

Schmidt ML, Lal A, Seeger RC, Maris JM, Shimada H, *et al.* Favorable Prognosis for Patients 12 to 18 Months of age with stage 4 Nonamplified *MYCN* Neuroblastoma: A Children's Cancer Group Study. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23(27): 6474-80.

Scott, DK, Board, JR, LU, X, Pearson, ADJ, Kenyon, RM, Lunec, J. The neuroblastoma amplified gene, *NAG*: genomic structure and characterization of the 7.3 Kb transcript predominantly expressed in neuroblastoma. *Gene* 2003; 307: 1-11.

Spitz, R, Hero, B, Skowron, M, Ernestus, K, Berthold, F. *MYCN*-status in neuroblastoma: characteristics of tumors showing amplification, gain, and non-amplification. *European journal of cancer* 2004; 40:2753-59.

Squire, JA, Thorner, PS, Weitzman, S, Maggi, JD, Dirks, P, Doyle, J. Co-amplification of *MYCN* and a DEAD box gene (*DDX1*) in primary neuroblastoma. *Oncogene* 1995; 10: 1417-22.

Tanaka S, Tajiri T, Noguchi SI, *at al.* Clinical significance of a highly sensitive analysis for gene dosage and the expression level of MYCN in neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery* 2004; 39: 63-68.

Tonini GP, Romani M. Genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma. *Cancer letters* 2003; 197:69-73.

Valent A, Le Roux, G, Barrois, M, Terrier-Lacombe, MJ, Valteau-Couanet, D, Léon, B, Spengler, B, Lenoir, G, Bernard, J, Bemhein, A. *MYCN* gene overrepresentation detected in primary neuroblastoma tumour cells without amplification. *Journal of Pathology* 2002; 198:495-501.

van Noesel MM, Versteeg R. Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic *Danse Macabre*. *Gene* 2004; 325:1-15.

Vasudevan AS, Nuchtern JG, Shohet JM. Gene Profiling of High Risk Neuroblastoma. *World Journal of Surgery* 2005, 29: 317-24.

Weber A, Imisch P, Bregmann E *at al.* Coamplification of DDX1 correlates with an improved survival probability in children with MYCN-amplified human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2004, 22: 2681-2690.

Wilkins JRI, Hundley VD. Paternal occupation exposure to electromagnetic fields and neuroblastoma in offspring. *Am J Epidemiology* 1990; 131:995-1008.

Wimmer K, ZHU XX, Lamb BJ, Kuick R, Ambros PF, Kovar H, Thoraval D, Motyka S, Alberts JR, Hanash SM. Co-amplification of a novel gene, *NAG*, with the *MYCN* gene in neuroblastoma. *Oncogene* 1999; 18: 233-38.

Wirchow Hayes Smith. In: BENDIT I. Caracterização molecular dos neuroblastomas: Estudo do oncogene *MYCN*, do gene de resistência a múltiplas drogas *MDR1*, do antígeno nuclear de proliferação celular e do gene supressor de tumores *TP53*. São Paulo, 1997.