JAIRO CARTUM

Variáveis de prognóstico em crianças maiores de um ano portadoras de neuroblastoma disseminado.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Medicina

Programa de: Pediatria
Orientador: Prof. Dr. Vicente Odone Filho

SÃO PAULO
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cartum, Jairo

Variáveis de prognóstico em crianças maiores de um ano portadoras de neuroblastoma disseminado / Jairo Cartum. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.

Orientador: Vicente Odone Filho.

Descritores: 1.Neuroblastoma 2.Prognóstico 3.Criança

USP/FM/DBD-428/10

Aos meus queridos pais Paulina e Rubens, luzes sempre presentes em meu caminho, agradeço o estímulo e o carinho que tenho recebido.

À minha querida esposa Carol e filhos Nicole e Allan, que colore e alegam minha vida com muito amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Vicente Odone Filho, exemplo de ser humano, agradeço o prazer de tê-lo como meu orientador, mestre, amigo e também por todas as oportunidades, ensinamentos, conselhos, confiança que tem me dedicado.

Ao meu grande amigo Auro Del Giglio, pelo incentivo e auxílio constante, que tanto tem ajudado em minha vida pessoal e carreira profissional.

A querida amiga Lilian Cristófani, sempre presente em todos os momentos.

Ao Dr. Dráuzio Viegas, meu reconhecimento sincero ao “meu amigo-pai” e guia.

A Sra. Mariza Umetsu, pelo exemplo de delicadeza em tudo que faz.

Aos funcionários do ITACI, em especial aos colegas do SAME, pela valiosa ajuda no levantamento dos prontuários.

A Sra. Adriana Bezerra, secretária da pós-graduação, pela gentil colaboração em esclarecer minhas dúvidas.

Aos pacientes do Instituto da Criança que, de maneira indireta, possibilitaram a execução desse trabalho.

SUMÁRIO

Resumo
Abstract

1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	2
3. Objetivos.....	70
4. Casuística e Métodos.....	70
5. Análise estatística.....	72
6. Resultados.....	73
7. Discussão.....	90
8. Conclusões.....	112
9. Referências Bibliográficas.....	116

RESUMO

Cartum, J. **Variáveis de prognóstico em crianças maiores de um ano portadoras de neuroblastoma disseminado.** São Paulo, 2010, Tese - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Introdução: Os neuroblastomas apresentam grande diversidade de comportamento clínico, evoluindo desde remissão espontânea à rápida progressão e morte. Heterogeneidade clínica e biológica tem implicado em grande variedade de respostas terapêuticas, inclusive em crianças maiores de 1 ano e em estádios avançados. **Objetivo:** estudar quadro clínico, aspectos epidemiológicos, características laboratoriais, genéticas e histológicas em crianças maiores de 1 ano portadoras de neuroblastoma disseminado, correlacionando-os com a evolução clínica e tentando definir fatores de risco que possam influir na sobrevida e na possibilidade da indicação do transplante de medula óssea (TMO). **Casuística e Métodos:** as informações foram obtidas de 53 pacientes admitidos na Unidade de Oncologia (ITACI) do Instituto da Criança do HC-FMUSP no período de 1997 a 2007. Os pacientes foram estudados quanto aos seguintes fatores: sexo, idade, raça, estado nutricional, DHL, Hb, ferritina, VMA, características tumorais (tamanho, localização, metástases, histologia, *MYCN*), terapêutica utilizada e evolução clínica. Estudamos separadamente também os fatores preditivos para TMO. **Resultados:** devem ser destacados: 1) crianças submetidas à cirurgia retardada completa apresentam 5 vezes menor chance de óbito do que as demais; 2) pacientes submetidos a TMO apresentam maior sobrevida total e livre de eventos em relação ao grupo não submetido a essa modalidade terapêutica 3) a utilização de retinóides gera 14 vezes menor chance de óbito em relação ao grupo que não os utiliza. 4) surpreendentemente, pacientes com ferritina abaixo de 334 n/ug/l apresentam 8 vezes maior chance de óbito. **Conclusões:** Não identificamos parâmetros clínicos e laboratoriais, práticos e facilmente disponíveis, de prognóstico para subpopulações de neuroblastomas de prognóstico avançado, sendo o estudo de fatores de ordem molecular e biológicos essenciais, apesar das dificuldades em realizá-lo.

ABSTRACT

Cartum, J. **Prognostic variables in children older than one year with advanced neuroblastoma.** São Paulo, 2010, Thesis - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Introduction: Neuroblastomas (NB) have widely diverse clinical behavior, moving from spontaneous remission to progression and death. Clinical and biological heterogeneity factors determine different survival, even with children older than 1 year in advanced stages. **Objective:** to study the clinical presentation, epidemiology, laboratory findings, genetics and histopathologic characteristics in children older than 1 year with advanced neuroblastoma and their correlation with the survival. Also defining prognostic variables for bone marrow transplantation (BMT) indication. **Casuistic and Methods:** 53 selected medical records from patients older than 1 year with advanced NB admitted to the Instituto da Criança do HC-FMUSP from 1997 to 2007 were reviewed. The following risk factors were analyzed: age, sex, race, nutritional status, LDH, hemoglobin level, ferritin level, urinary VMA, tumor characteristics such as: site, histology, size, metastases, MYCN, treatment and clinical course. **Results:** it should be mentioned that: 1) possibility of death in children who underwent complete second look is 5 times lower than remaining ones; 2) patients who underwent BMT have better overall survival and event-free survival in comparison to the group not receiving this treatment modality. 3) the use of retinoids generates 14 times less chance of death in comparison to the group not receiving them. 4) patients whose ferritin level was below 334 n/ug/l had surprisingly 8 times more chances to die from diseases. **Conclusions:** no simple and easily obtainable prognostic variables in a subpopulation of patients with advanced stage neuroblastoma, suitable to be widely employed in a country as ours, were identified. The study of molecular and biologic factors remains essential for precise characterization of these patients.

1. INTRODUÇÃO

Os neuroblastomas (primeiramente descritos por Virchow, em 1864 e assim denominados por Wright, em 1910) são tumores sólidos originários do sistema nervoso simpático, virtualmente exclusivo da infância. Apesar dos grandes avanços terapêuticos e em técnicas de diagnóstico, esse tumor persiste como um grande desafio para os oncologistas pediátricos. Quando a doença é localizada, independentemente da idade do paciente, a cura pode ser atingida em quase 90% dos casos com emprego de diferentes modalidades terapêuticas, incluindo quimioterapia de intensidade modesta; por outro lado, nas situações de doença disseminada, o prognóstico é invariavelmente sombrio, sendo a idade um dos fatores críticos para o prognóstico¹. Crianças menores de um ano e meio de vida com doença metastática podem ser curadas com quimioterapia de intensidade moderada, enquanto crianças mais velhas não apresentam resposta semelhante, mesmo quando tratadas com esquemas terapêuticos de muitíssima maior agressividade². Poucos são os relatos referentes aos aspectos clínicos e laboratoriais gerais encontrados nos neuroblastomas disseminados ao diagnóstico em crianças maiores de um ano, que estariam associadas às diferentes respostas ao tratamento; como consequência, a identificação de grupo de pacientes com doença avançada mais propensa à falha terapêutica reside em seu estudo biológico, cuja complexidade é inacessível à maioria das instituições dedicadas ao câncer infantil em nosso país.

- 1) Assim sendo, centraremos neste estudo esforços quanto à análise de crianças com neuroblastoma disseminado (estádio 3 e 4) e idade superior a 1 ano ao diagnóstico. Em que pese à destacada relevância dos fatores extensão da moléstia e idade como intervenientes no prognóstico dessas crianças, o grupo não é homogêneo. O prognóstico ainda sombrio dos neuroblastomas avançados justifica todo esforço em

buscar identificar variáveis que auxiliem na compreensão dessas diferenças e que permitam melhor identificação dos pacientes que, em última instância, poderá ser traduzido em melhores resultados terapêuticos.

- 2) A melhor literatura mundial investe sobretudo na análise de determinantes de natureza biológica e molecular o que, na maioria das situações, representam objetivos inacessíveis à maioria das instituições de países com as características do Brasil. Daí nosso estudo revisional buscar, sobretudo, avaliar fatores de natureza clínica e laboratorial geral, fato amplamente justificável pelo acima referido.
- 3) Finalmente: a realização de transplantes autólogos de medula óssea, objetivando melhorar a sobrevida de pacientes oncológicos, tem sido cada vez mais utilizada em nosso país e decidimos extrapolar esse estudo também para pacientes submetidos a essa modalidade terapêutica, estudando eventuais fatores clínicos e laboratoriais que indicariam ou não tal tratamento, já que somente pacientes que conseguiriam alcançar remissão clínica ou pelo menos tendem a ela, teriam tal indicação. Todas as crianças (transplantadas ou não) foram necessariamente expostas a derivados de platina (reconhecidamente o grupo de drogas que exerceu maior impacto na sobrevida dos neuroblastomas disseminados), permitindo uma comparação uniforme de resultados entre ambos os grupos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Origem Celular

Os neuroblastomas são provenientes das simpatogônias – células indiferenciadas nervosas da crista neural, das quais se originam a medula da adrenal e todos os gânglios e plexos simpáticos. Sua ampla distribuição por todo o organismo contribui ao quadro clínico variável com que essas neoplasias se apresentam. Aliás, seu encontro em áreas nas quais nenhum tecido nervoso periférico reconhecidamente se situa, dependeria também das células da crista neural, migratórias, que não teriam completado a diferenciação de estruturas nervosas.

O encontro de tumores com mais de um aspecto histológico é compreensível, já que das células primitivas da crista neural também derivam células paraganglionares (cromafins e não cromafins) e células de Schwann, as quais podem originar neoplasias correspondentes.

2.2 Epidemiologia e Etiologia

Corresponde ao tumor sólido extracraniano mais comum da infância, representando 8 % a 10 % de todos os cânceres em crianças menores de 15 anos³. Entre os lactentes, corresponde a mais de 50% das neoplasias malignas. A incidência anual varia entre 7 a 12 casos por milhão de crianças até 15 anos, alcançando estimadamente 7,3 casos/milhão no Brasil⁴. Nos Estados Unidos (EUA) a frequência é maior entre crianças brancas (11,5 versus 8,5 em crianças negras)³, sendo a idade média ao diagnóstico nas crianças negras significativamente maior do que nas brancas (2,89 anos versus 2,26 anos, $p < 0,05$)^{4,5,6,7}. Tem discreta predominância no sexo masculino (1,15:1)⁶. Na Grã Bretanha, de acordo com dados coletados durante dois períodos (1971-1975 e 1986-1990), foi descrito um aumento de 26% na incidência ajustada por idade, para ambos os sexos⁷. Dados recentes descrevem um aumento de 0,4% da incidência de neuroblastoma, quase que exclusivamente nos primeiros dois anos de vida⁸. Os registros de Connecticut (EUA) e da Suécia registraram esse incremento somente no sexo feminino⁹. Detecção precoce da doença em

lactentes, através do rastreamento populacional dos metabólitos das catecolaminas na urina e detecção no pré-natal através de ultra-som, poderia explicar essa tendência, em que pese todas as questões existentes em relação ao contexto evolutivo da doença localizada, reconhecidamente com possibilidade de detecção precoce, e a evolução para a forma avançada¹⁰.

Geograficamente, são distribuídos por todo o planeta, com ocorrência não uniforme. Por exemplo, as maiores incidências na África são registradas em Bulawayo, Zimbabwe (8.0 por milhão de crianças até 15 anos) e as menores taxas no Nilo oriental e Uganda, na qual essencialmente não há casos registrados⁵. Na população judaica israelense observa-se alta taxa de prevalência⁵. Taxas de incidência baixas são verificadas na Ásia, incluindo Índia e China⁵. No Japão observa-se incidência maior em relação a outros países asiáticos, porém abaixo do nível ocidental⁵. Por sua vez, estudos realizados na Inglaterra, nas populações afro caribenhas, indianas e outras etnias asiáticas, além de estudos no Havaí com crianças japonesas, filipinas, chinesas e havaianas, não encontraram diferenças significativas de incidência de neuroblastoma, sugerindo não haver variações entre as várias raças⁸.

Certamente há que ser considerada nesta distribuição a variação dependente dos polimorfismos genéticos e epigenéticos, aguardando-se dos seus estudos de maior amplitude uma melhor apreciação de todo o seu contexto¹.

Sendo um tumor embrionário, via de regra manifesta-se precocemente. A grande maioria (75%) apresenta-se em crianças abaixo de 5 anos de idade, com idade média ao diagnóstico de 21 meses, variando de recém-nascidos a 22 anos¹¹. Alguns estudos sugerem haver 2 picos de incidência para a ocorrência de neuroblastoma: o primeiro ocorrendo antes de 1 ano de idade e o segundo entre 2 e 4 anos⁵. São bem conhecidos os relatos sobre o encontro em necropsias, de

¹ Envolvimento internacional do Departamento de Pediatria da FMUSP em estudos visando esta análise. Em curso.

pretensos focos microscópicos de neuroblastoma em glândulas adrenais com frequência variando desde 1 em 259 a 1 em 39 (conforme haja ou não exaustão de cortes) casos de lactentes menores de 3 meses falecidos de causas não-oncológicas. Como a incidência de neuroblastoma em crianças na população geral é bem menor, aventa-se a hipótese de que parte desses tumores *in situ* deva regredir espontaneamente; ou então, que verdadeiramente representem uma fase normal do desenvolvimento da adrenal, sem significado patológico^{12,13}.

A etiologia do neuroblastoma é desconhecida. Existem evidências de que possa haver uma predisposição genética para a doença, pois existe a descrição de casos familiares englobando irmãos, gêmeos monozigóticos, meio-irmãos, primos e parentes¹⁴. KNUDSON & STRONG¹⁵ propuseram que 20 a 25 % dos neuroblastomas sejam hereditários, de característica autossômica dominante, com penetrância de 63 % e determinados por uma mutação pré-zigótica (germinal) associada a um segundo evento pós zigótico (somático). Os restantes 75 a 80 % dos casos seriam não hereditários, com os dois eventos ocorrendo na fase pós zigótica. Os portadores da mutação germinal poderiam ou não desenvolver a neoplasia influenciados por fatores ambientais e, nesses casos, mais de um tumor primário pode ocorrer. Nos casos não hereditários, apenas um tumor estaria presente. O risco de ocorrência na prole de pacientes com herança familiar seria de 30% e nos casos esporádicos de 6%.

FOULKES & BUU¹⁶, através de um estudo retrospectivo realizado com 141 crianças portadoras de neuroblastoma, observaram incidência maior de anormalidades congênitas (principalmente cardiovasculares) em relação à população.

MICHALEK & BUCK¹⁷, em um estudo de casos controle, encontraram maior incidência de neuroblastomas na prole de mães que tiveram infecção vaginal durante a gestação (OR,2.2; 95%CI, 1.2-4.0). CINATI & VOGEL documentaram a infecção por citomegalovírus em células tumorais de um paciente

de três meses de idade com neuroblastoma 4S, cuja doença progrediu, com quatro anos, como estágio 4. Tais células tumorais *in vitro* eram menos sensíveis aos quimioterápicos (Etoposide e Cisplatina) do que as células normais e apresentavam expressão aumentada do oncogene *Bcl2*(14q34) e *Ki67*. FLAEGSTAD¹⁸ demonstrou a existência do antígeno T tumoral associado ao vírus BK em 16 das 18 amostras de neuroblastoma estudadas. Esse antígeno pode induzir instabilidade cromossômica com reordenamento gênico, ligando e inativando proteínas do *p53*, *Rb-1* e outros genes supressores tumorais.

MICHALEK & BUCK¹⁷, em 1996, descreveram uma relação em que a suplementação vitamínica (ácido fólico, vitaminas A, C e E) durante a gestação reduziu significativamente o risco de neuroblastoma na prole (OR, 0.5; 95% CI, 0.3-0.7). Mais recentemente, em 2002, OLSHAN & SMITH observaram uma diminuição de 30-40 % de incidência de neuroblastoma na prole de mães que fizeram uso de 0,4 mg de ácido fólico diário durante a gestação: 1º trimestre (OR, 0.7; 95% CI, 0.5-0.9) e 2º trimestre (OR, 0.6; 95% CI, 0.5-0.9)¹⁹. Também foi observado associação entre exposição a hormônios maternos usados durante a gravidez e maior risco para neuroblastoma¹⁷.

ROOS & OLSHAN²⁰, estudando 504 crianças portadoras de neuroblastomas, correlacionaram seu aparecimento a possível exposição paterna a hidrocarbonetos (óleo diesel, tiner, laca, aguarrás), pó de madeira e soldas. Não houve associação nesse trabalho entre exposição materna a agentes químicos e aparecimento de neuroblastoma na prole.

Em um estudo realizado na França no período de 2003-2004 com 191 casos de neuroblastoma, MUNZER encontrou associação entre mal formações congênitas e neuroblastoma em crianças menores de 1 ano (OR=16,8, 95% CI: 3,1-90). Tal associação não foi observada com crianças portadoras de neuroblastoma com idade superior a um ano (OR=1,0, 95% CI:0,3-2,9). Finalmente, não achou correlação entre neuroblastoma e tratamentos de

fertilização de nenhum tipo (estimulação com drogas, fertilização in vitro ou inseminação artificial - OR = 0.9, 95% CI: 0.4–2.0)²¹.

DE ROOS & OLSHAN também não observaram associação entre a exposição dos pais a campos eletromagnéticos e neuroblastoma nos descendentes²².

DANIELS publicou em 2001 dados que sugerem relação entre utilização de pesticidas domésticos e o aparecimento de neuroblastoma em crianças maiores de 1 ano²³.

BUCK, estudando fatores peri-natais associados com neuroblastoma, encontrou dados que sugerem que pré-termos (< 37 semanas de gestação) e pós-termos (> 42 semanas) apresentam menores taxas de incidência. Observou incidência elevada em crianças com anóxia neonatal e filhos de mães fumantes²⁴. Em um estudo conduzido pelo Children's Cancer Group e Pediatric Oncology Group com 393 casos de neuroblastoma maiores de seis meses e 376 controles, foi observado relação inversa entre amamentação materna e risco de neuroblastoma (OR, 0.6 ; IC 95, 0.5-0.9) que se acentua com a duração exclusiva do aleitamento materno: 0-3 meses (OR, 0.7; IC 95%, 0.4-1.0) e mais de 3 meses (OR, 0.5; IC 95%, 0.3-0.9)²⁵.

Algumas anomalias congênitas e hereditárias podem associar-se ao neuroblastoma, tais como: neurofibromatose²⁶, síndrome de Beckwith-Wiedemann^{27,28}, nisidioblastose²⁹, distrofia muscular³⁰ e a doença de Hirschsprung^{31,32}. Associações com as síndromes fetais por hidantoína³³ e por álcool^{34,35} também são descritas. A trissomia do 21, que aumenta o risco de leucemias e Síndromes mielodisplásicas nos primeiros anos de vida, diminui o risco do surgimento de neuroblastomas provavelmente devido a hipoplasia do sistema nervoso simpático, característica da Síndrome de Down³⁶.

De particular interesse institucional é a relação potencial existente entre fertilização *in vitro* e câncer em tenra idade, particularmente neuroblastomas, motivo de corrente investigação².

2.3 Patologia

Habitualmente, os neuroblastomas apresentam-se como massas sólidas, lobulares e com consistência macia. A superfície de corte é de cor vermelho-acinzentada e áreas de hemorragia e necrose podem ser visíveis à medida que o tumor cresce. A calcificação (fina e puntiforme) é freqüente³⁷.

Histologicamente, são tumores bastante celulares, divididos por septos fibrovasculares. As células são uniformes e arredondadas, os núcleos arredondados, hipercromáticos ou densamente pontilhados e com mitoses poucos exuberantes. Nas lesões características, as rosetas são formadas quando as células tumorais ocupam a periferia e fibrilas nervosas jovens crescem no centro de cada roseta. Na medula óssea, células metastáticas, com seu amplo citoplasma, também formam agrupamentos semelhantes, as pseudo-rosetas, sem material fibrilar central^{38,39}.

A diferenciação nos mais diversos graus é encontrada em muitos neuroblastomas. O tumor pode se diferenciar completamente para um ganglioneuroma, composto por células ganglionares diferenciadas, dispersas entre fibras nervosas, células de Schwann e tecido fibroso. Todos os graus intermediários de diferenciação entre neuroblastoma puro e o ganglioneuroma puro podem ser encontrados, sendo referidos como ganglioneuroblastomas. Ganglioneuromas e ganglioneuroblastomas podem se desenvolver, inclusive,

² Estudo em curso envolvendo aspectos epidemiológicos e epigenéticos, colaborativo – contexto formal da colaboração sendo elaborado - entre o Departamento de Pediatria da FMUSP e a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP.

através da maturação espontânea ou pós-tratamento de formas mais indiferenciadas, como primeiramente demonstrado por Cushing e Wolbach, em 1927^{38,39}.

LIEBHART estudou a histologia de 224 neuroblastomas e concluiu que os neuroblastomas bem diferenciados são mais prevalentes em crianças menores de 1 ano, os tumores indiferenciados em crianças de 1 a 5 anos e ganglioneuromas e ganglioneuroblastomas em crianças maiores de 5 anos⁴⁰.

O diagnóstico diferencial histológico é feito com outros tumores que têm como característica principal a presença de pequenas células com núcleo arredondado, hipercromáticos e de citoplasma escasso (“pequenas células redondas e indiferenciadas”) entre eles: rabdomiossarcomas, linfomas não-Hodgkin, tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET) e sarcomas de Ewing⁴¹.

Recursos imunohistoquímicos, permitindo a utilização de vários anticorpos na detecção de determinadas proteínas estruturais, produtos celulares e antígenos associados a membranas, investigados, por exemplo, em tecidos fixados, através da técnica de peroxidase-antiperoxidase (PAP), são particularmente úteis na diferenciação dessas moléstias (tabela 1)⁴¹.

Tabela 1: Diferenciação imunohistoquímica entre “tumores de pequenas células redondas e indiferenciadas” da infância⁴².

Neoplasia	Atividade imunohistoquímica					
	NSE	VIM	ACT	DES	CLA	β1MG
Neuroblastoma	+	-	-	-	-	-
Rabdomiossarcoma	+	-	+	+	-	-
Sarcoma Ewing	-	+	-	-	-	+-
PNET	+	+	-	-	-	+
LNH	-	-	-	-	+	-

Obs: NSE=enolase neurônio específica ; VIM=vimentina ; ACT=actina ; DES=desmina ; CLA= antígeno leucocitário comum ; β1MG=microglobulina ; LNH= linfoma não-Hodgkin

SHIMADA⁴³, em 1984, estudando fatores de prognóstico histopatológico em tumores neuroblásticos, propôs uma classificação que se correlacionava com a idade, dividindo os tumores em dois grupos, conforme a presença (estroma rico) ou ausência (estroma pobre) de estroma neuromatoso.

Subdivisões adicionais desses grupos foram elaboradas levando em consideração a diferenciação histológica e morfologia nuclear.

Assim sendo, a subclassificação conforme a morfologia celular quantifica o número de células em mitose ou cariorréxicas em 5000 células contadas (índice mitótico e de cariorrexix: MKI) da seguinte maneira: índice baixo (< 100), índice intermediário (100 a 200) e índice alto (>200).

Quanto aos tumores com estroma rico, correspondendo a 20 % dos tumores, são subclassificados em:

- A- Bem diferenciados: composto por tecido ganglioneuromatoso maduro dominante.
- B- Intermisto: tecido ganglioneuromatoso com ninhos de células neuroblásticas esparsos e variavelmente diferenciados.
- C- Nodulares: presença de uma ou mais poucas massas discretas de neuroblastomas de estroma pobre, contornados por matriz madura.

Já os tumores de estroma pobre são subclassificados em relação ao grau de diferenciação histológica em:

- A- Indiferenciados (composto quase integralmente por neuroblastos imaturos, com menos de 5 % de população diferenciada).
- B- Diferenciados (composto por uma mistura de células neuroblásticas de vários graus de maturidade, com mais de 5 % de população diferenciada).

Nos pacientes de estroma rico, os padrões difuso e nodular seriam determinantes de prognóstico, respectivamente melhor e pior (padrão nodular: sobrevida livre de eventos de 44,7 % vs 65 % padrão difuso, $P=0,0073$)⁴⁴. No segundo grupo, considerar-se-iam também a idade ao diagnóstico e o MKI.

Entretanto, esta classificação tem sua aplicação dificultada pelo grande número de variáveis, por exigir grandes amostras de tumor ao diagnóstico, além de quando comparada a variáveis de maior peso, como idade e estágio, perder seu impacto⁴⁵.

JOSHI^{46,47}, objetivando simplificar a classificação de Shimada, analisou retrospectivamente dados de anatomia patológica de 211 pacientes e classificou os pacientes baseando-se na presença ou não de calcificação e no índice de mitose observada em apenas 10 campos de grande aumento:

Grau 1- calcificação e baixo índice mitótico (≤ 10 mitoses/10 campos).

Grau 2- calcificação ou baixo índice mitótico.

Grau 3- ausência de calcificação e presença de alto índice mitótico.

Crianças pertencentes ao Grau 1 apresentam melhor prognóstico, independentemente da idade e estágio. A associação dos graus com a idade do paciente e estágio, permitiu conclusões semelhantes à classificação de Shimada.

Em 1999, o INPC (International Neuroblastoma Pathology Committee), composto por 6 patologistas, baseando-se nas classificações de Shimada e Joshi, propôs uma nova classificação para os neuroblastomas dividindo-os em 4 categorias^{48,49}. Considerava-se a diferenciação dos neuroblastos, o índice de multiplicação celular e a presença ou ausência do estroma de células Schwann, tendo como objetivo principal ser uma classificação de inquestionável relevância no prognóstico⁵⁰.

As 4 categorias e seus subtipos são descritos abaixo:

- 1) Neuroblastoma (indiferenciado, pobremente diferenciado, em diferenciação): estroma de células de Schwann pobre ;
- 2) Ganglioneuroblastoma intermediário: estroma de células de Shwann rico ;

- 3) Ganglioneuroma (maduro e em maturação) : estroma de células de Shwann dominante ;
- 4) Ganglioneuroblastoma nodular (rico, dominante e pobre) : estroma de células de Shwann composto.

A ultraestrutura desses tumores, visualizada por microscopia eletrônica, revela grânulos densos esparsos no citoplasma das células mais primitivas, relativamente abundantes nos processos celulares e neuríticos, nos quais microtúbulos e filamentos são encontrados. Junções intercelulares são freqüentes em todos os graus de diferenciação, mas os processos interdigitantes citoplasmáticos são mais freqüentes nos tumores ricos em neurofibrilas. Grânulos neurosecretores são encontrados nestas áreas do tumor. O glicogênio é encontrado em pequenas quantidades nas células primitivas e está ausente nas mais diferenciadas⁴¹.

2.4 Marcadores tumorais

Vários marcadores são associados à presença dos neuroblastomas, o que lhes confere acentuada importância na detecção de doença ativa e na constatação de seu controle, bem como valor indicador de prognóstico potencial.

Em 1959, demonstrou-se que os ganglioneuromas e os neuroblastomas são tumores que levam à excreção urinária elevada de catecolaminas e seus metabólitos: o ácido vanilmandélico (VMA), o ácido homovanílico (HVA) e o vanilacético (VLA). A excessiva produção de dopamina e 3,4 diidroxifenilalanina (DOPA) também foi descrita em pacientes com tumores de crista neural⁵¹. A representação esquemática do metabolismo das catecolaminas é apresentada na figura 1.

Figura 1: Metabolismo das catecolaminas⁵²

Níveis anormais de catecolaminas e seus metabólitos (VMA e HVA) são encontrados em mais de 95 % dos portadores de neuroblastomas (quando mais de uma substância é analisada) e sua excreção permanece aumentada, desde que persista doença ativa, servindo portanto para o controle da doença⁵³. Os poucos pacientes que verdadeiramente não têm sua excreção aumentada apresentam deficiência da enzima Tirosina-Hidroxilase. Observa-se que nos outros tumores derivados da crista neural, como os PNETs, raramente são observados níveis elevados desses metabólitos.

Os valores normais dos dois principais metabólitos - ácido vanil-mandélico (VMA) e ácido homovanílico (HVA) - diferem em adultos e crianças, aumentando com a idade^{54,55}. As duas principais técnicas de dosagem de catecolaminas e seus metabólitos envolvem a coleta de urina de 24 horas ou de amostras isoladas, relacionando-as com o nível de creatinina urinária. Apesar dos valores absolutos de VMA e HVA não terem significado de prognóstico, a relação entre seus níveis potencialmente o tem: assim quanto maior a relação VMA: HVA em pacientes com doença disseminada, melhor seria o prognóstico⁵⁶. A presença do ácido vanilacético, por sua vez, associa-se a prognóstico pior⁵⁷.

Enolase neuro-específica (NSE) e ferritina sérica, produzidas por células neuroblastomatosas, acham-se elevadas em respectivamente 95 % e 40% - 50% dos portadores de doença disseminada. Níveis sanguíneos elevados da enzima desidrogenase láctica (DHL), apesar de inespecífica em neuroblastomas, são freqüentemente presentes em doença avançada⁵⁸.

O NSE é uma isoenzima citoplasmática não específica de neuroblastomas, estando também presente em hemácias normais e em outras neoplasias como o carcinoma pulmonar de pequenas células, os rabdomiossarcomas e o sarcoma de Ewing⁵⁹. Seu valor enquanto prognóstico restringe-se a crianças menores de 1 ano de idade e com estádios avançados. Nível sérico acima de 100 ng/ml relaciona-se com prognóstico desfavorável, sendo também útil no acompanhamento evolutivo do paciente⁶⁰⁻⁶².

A ferritina sérica encontra-se com níveis séricos baixos em doença localizada, sendo de valor no prognóstico pelo menos em lactentes abaixo de 1 ano de vida⁶²⁻⁶⁴.

Outras substâncias encontradas em quantidade elevada nos pacientes com neuroblastoma são o gangliosídeo GD2 e inespecificamente o antígeno carcinoembrionário sérico e a cistationina urinária. Os gangliosídeos são

glicoesfingolípides que contém ácido siálico e estão presentes na membrana celular das células neuroblastomatosas, permitindo assim sua dosagem sérica. Raramente o gangliosídeo está presente em tumores mais diferenciados, como os ganglioneuromas^{65,66}.

2.5- Quadro clínico

O quadro clínico dos neuroblastomas é extremamente variado e depende, basicamente, das características do tumor primário, do comprometimento de estruturas circundantes e das metástases à distância⁶⁷.

Origina-se em qualquer parte do sistema nervoso simpático. Sua localização mais freqüente é o abdome: supra-renal (40%) e cadeia paraespinal (25%). Na cadeia simpática torácica desenvolvem-se 15 % dos casos, na região cervical 5 % e na pelve 5 %⁶⁸. Em cerca de 1,5 % dos pacientes, o tumor primário não é detectado ao diagnóstico⁶⁹, número esse que vem progressivamente diminuindo com a melhoria nos recursos de investigação imagenológicos. A localização preferencial do tumor primário varia de acordo com a idade do paciente, sendo que crianças menores de 1 ano têm maior incidência de tumores torácicos, quando comparadas às crianças maiores⁷⁰.

O aumento de volume abdominal por crescimento tumoral é um dos principais sintomas, com massas irregulares, dolorosas, e que freqüentemente ultrapassam a linha média. Extensas massas retroperitoneais podem levar a compressão de vasos, causando linfedema de membros inferiores ou hipertensão arterial em compressões da vasculatura renal⁷¹. Hemorragias tumorais podem determinar choque hipovolêmico.

Os tumores torácicos podem determinar compressões traqueais, brônquicas ou obstruções da veia cava superior. Infiltração através dos forames intervertebrais

podem determinar compressão intraespinal-extradural, com repercussões neurológicas conseqüentes. Heterocromia e síndrome de Horner (miose, ptose, enoftalmia) são associadas às formas cervicais e torácicas.

Sintomas inespecíficos como febre intermitente, emagrecimento, apatia e dores ósseas são freqüentes.

A síndrome de opsiomioclonus (Kinsbourne), que ocorre em 4 % dos pacientes, é caracterizada por uma encefalopatia cerebelar aguda com quadro de ataxia e movimentos oculares bruscos. Sua fisiopatologia está relacionada a distúrbios auto-imunes induzidas pela neoplasia. Esses pacientes tendem a apresentar neuroblastomas localizados com sinais de maturação, mas alterações neurológicas permanentes podem persistir mesmo após a remoção do tumor⁷².

Efeitos metabólicos secundários à produção de catecolaminas podem ocasionalmente ser observados, como hipertensão arterial, vermelhidão cutânea, sudorese, taquicardia e cefaléia. O neuroblastoma pode produzir uma substância denominada peptídeo intestinal vasoativo (VIP) que provoca uma diarreia secretora crônica com conseqüente hipocalcemia e desidratação (síndrome de Kerner-Morrison)⁷³.

As metástases, freqüentes ao diagnóstico, são observadas em 50% dos lactentes e 70 % das crianças maiores. Os sítios preferenciais são medula óssea (78%), ossos (69%), linfonodos (42 %), fígado (20 %), sistema nervoso central (7%) e pele (2%). Raramente há acometimento pulmonar, de baço e testículos.

As metástases ósseas mais freqüentes são as cranianas, as quais podem determinar deformidades exuberantes. Lesões orbitárias, com invasão de tecidos retrobulbares, podem determinar proptose ocular, edema periorbitário e equimoses, particularmente nas pálpebras superiores. São comuns os linfonodos enfartados, particularmente cervicais e supraclaviculares. No abdome, linfonodos

e fígado são preferencialmente atingidos. A síndrome de Pepper, que ocorre em lactentes jovens, é caracterizada por aumento excessivo do órgão levando a um quadro de icterícia, desconforto respiratório e coagulopatia de consumo intratumoral. Nódulos subcutâneos de coloração azulada são freqüentes no período neonatal e são descritas metástases placentárias em caso de neuroblastomas fetais.

2.6- Diagnóstico

A anamnese e o exame físico fazem sugerir a suspeita de neuroblastoma. Entretanto, a incidência dos sintomas altamente característicos do neuroblastoma é baixa: opsiomioclonus/ataxia (4%), diarréia intratável (3,1%), sintomas compressivos (2,6 %), síndrome de Horner (2%) e hipertensão arterial (0,2%).

A avaliação hematológica, com frequência, pode revelar níveis normais de hemoglobina, embora pacientes com intensa hemorragia intratumoral ou extensa infiltração da medula óssea, possa haver grave anemia. Plaquetose e leucocitose são com frequência encontrados.

Níveis séricos elevados de desidrogenase láctica, enolase neurônio específica e ferritina podem ser observados^{61,74}.

Entre os exames específicos para o diagnóstico, destaca-se a punção aspirativa e biópsia de medula óssea no mínimo em dois locais diferentes e a dosagem das catecolaminas urinárias e seus metabólitos. A excreção aumentada na urina das catecolaminas urinárias é detectada em mais de 95 % das vezes, sendo necessário um aumento de pelo menos três desvios-padrões sobre a média por miligrama de creatinina excretada para a devida valorização⁵³.

Radiografia de esqueleto poderá revelar áreas de lise óssea particularmente em crânio e em diáfises distais de fêmures e úmeros. Radiografias de tórax podem

acusar massas calcificadas em mediastino posterior. Avaliação radiológica e ultrassonográfica de abdome detectando massa abdominal finamente calcificada (em metade dos casos) que desloca ínfero-lateralmente o rim ipsilateral, preservando sua estrutura pielocalicial, é habitualmente verificada⁷⁵.

Tomografia axial computadorizada caracteriza com precisão tumores primários e metástases regionais. Em alguns casos, porém, há situações em que ainda prevalecem dúvidas em relação ao diagnóstico diferencial com outros tumores como nefroblastoma e hepatoblastomas. Tumores primários e metástases pequenas também podem passar indetectáveis pela tomografia. A ressonância nuclear magnética, apesar de ser o exame de escolha para avaliação de massas intraespinais, não se mostrou superior na investigação de neuroblastomas abdominais⁷⁵.

A cintilografia com Tecnécio-99m tem maior sensibilidade na detecção de metástases ósseas em relação a radiografias convencionais. Falsos-negativos podem ocorrer em lesões com pequena ou nenhuma formação óssea.

A cintilografia com meta-iodobenzilguanidina (MIBG) empregando ¹²³I (preferencial) ou ¹³¹I é útil na detecção de metástases generalizadas, visto ser a substância captada por tecidos que contém terminações nervosas. Há, entretanto, 10% de falso negativo^{54, 76-79}.

BRODEUR, em um artigo de revisão de literatura em relação ao métodos de diagnóstico para neuroblastoma⁸⁰ sugere, para avaliação de doença metastática, os seguintes exames: 1) mielograma em crista ilíaca posterior e biópsia de medula óssea com no mínimo 1 cm de medula, excluindo cartilagem; 2) a avaliação de comprometimento ósseo deve ser feito com cintilografia com MIBG (aplicável a todos os sítios da doença) e/ou com 99mTecnécio (caso a cintilografia com MIBG apresente resultado negativo ou não seja realizado); as lesões encontradas devem ser radiografadas; 3) linfonodos palpáveis devem ser clinicamente

examinados e histologicamente examinados. Gânglios não palpáveis devem ser avaliados por tomografia computadorizada com medidas tridimensionais ; 4) o abdome e o fígado devem ser avaliados por tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética. Ultra-Som não é exame indicado para medidas tridimensionais ; 5) o tórax deve ser examinado por radiografia simples pósterio-anterior e lateral. Tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética são indicadas caso o resultado da radiografia convencional seja positivo ou a doença abdominal estenda-se até o tórax.

Concluindo, o diagnóstico de neuroblastoma é firmado com a presença documentada de infiltrado neoplásico na punção aspirativa de medula óssea acompanhado de índices metabólitos (excreção de catecolaminas) conclusivos ou pela análise anátomo-patológica de fragmento tumoral obtido através da biópsia. A análise histopatológica deve incluir imunohistoquímica, microscopia eletrônica e análise citogenética.

2.7- Estadiamento

Os sistemas de estadiamento são resultado natural da necessidade de dividir, sistematicamente, as neoplasias malignas em grupos de maior ou menor gravidade e, a partir daí, individualizar o tratamento oferecido a cada um deles. Apesar do estadiamento ser tão importante no neuroblastoma, algumas outras características dessa neoplasia são notórias, como por exemplo a regressão espontânea em alguns casos e a forte influência da idade ao diagnóstico no prognóstico, independente do tratamento^{81,82}. Tais características tornam o clássico estadiamento tumor-nódulo-metástases (TNM) inadequado para a caracterização dessa neoplasia e, como resultado, vários sistemas de estadiamento foram propostos: James, Pinkel, Thurman, Pediatric Oncology Group (POG), derivado do sistema original de estadiamento de St. Jude Children's Research Hospital (SJCRH) e o de Evans e cols. (Children's Cancer Group

staging system - CCG). Todos foram baseados em experiências clínicas com a doença, tendo por isso significado de prognóstico quanto à sobrevida.

Um aspecto diferencial básico dos sistemas de estadiamento diz respeito à descrição pura e simples dos tumores do modo como se apresentam ou em função de sua possibilidade de ressecção.

Assim, em 1967, JAMES⁸³ sugeriu uma classificação baseada na extensão da doença e seu grau de ressecabilidade, baseando-se que a invasão óssea é equivalente à da medula óssea (tabela 2).

Tabela 2 – Estadiamento de James

I	localizado e ressecado
II	regional e não ressecado
III	generalizado, mas sem invasão de ossos e medula óssea
IV	generalizado e com invasão de ossos e medula óssea

Também em 1967, THURMAN⁸⁴ idealizou uma classificação que levava em consideração a extensão da doença, ressecabilidade do tumor e grau de diferenciação celular. Excluía em seu estadiamento todas as crianças menores de um ano de idade ao diagnóstico devido a grande variedade de respostas terapêuticas e a possibilidade de regressão espontânea.

O Estadiamento de THURMAN é descrito na tabela abaixo:

Tabela 3 – Estadiamento de Thurman

I	Localizado e totalmente ressecado
	A) Bem diferenciado
	B) Indiferenciado
II	Regional e não ressecado
	A) Bem diferenciado
	Indiferenciado
III	Generalizado, com invasão óssea

OBS: são excluídos dessa classificação todos as crianças menores de um ano ao diagnóstico

Um ano mais tarde, 1968, PINKEL⁸⁵ distinguiu os tumores totalmente ressecáveis dos parcialmente ressecados. Entretanto, não valorizou a invasão óssea em seu estadiamento (tabela 4).

Tabela 4 - Estadiamento de PINKEL

I	local e completamente ressecado
II	regional
	A) parcialmente ressecado
	B) irresssecável
III	generalizado
	A) sem invasão de medula óssea
	B) com invasão de medula óssea

OBS: os pacientes classificados como estágio I, que permanecem com catecolaminas elevadas por três meses após a ressecção do tumor, são reclassificados como II.

O sistema de Evans e D'Angio (CCG)⁸⁶ é exclusivamente clínico, baseado em métodos não invasivos e na avaliação pré-cirúrgica da extensão da doença. Tal sistema refere-se exclusivamente ao padrão de crescimento do tumor e não às possibilidades de removê-lo, sendo importante o fato de ultrapassar ou não a linha média, dado que relaciona o tamanho do tumor com o tamanho do doente.

No sistema de Pinkel⁸⁷ a ressecabilidade do tumor primário é considerada, o que não ocorre no sistema de Evans, e inclui avaliação microscópica de linfonodos e das margens de ressecção do tumor. Os nódulos analisados devem estar no mesmo local do tumor primário, mas dele separados. Na classificação de Evans, a pesquisa do envolvimento de linfonodos é recomendada, mas não mandatória e não se diferencia nódulos adjacentes daqueles separados da neoplasia. Em contraste, esse sistema separa nódulos ipsi de contralaterais, fato que diferencia o estágio II do III, e que não é levado em conta por Pinkel.

Na doença metastática, a maior diferença entre o sistema de Evans e Pinkel é que o primeiro define um grupo de crianças, geralmente lactentes, com doença disseminada restrita ao fígado, pele e medula óssea, isoladas ou em combinação, mas sem envolvimento ósseo. Tal grupo teria prognóstico favorável (75%), sendo denominado de IV-S⁸⁸. Os pacientes classificados como estágio IV apresentam apenas 7 % de sobrevida.

A tabela 5 descreve o estadiamento de Evans.

Tabela 5- Estadiamento de Evans (CCG)

I	tumor confinado ao órgão ou estrutura de origem.
II	tumor estendendo-se além do órgão ou estrutura de origem, mas não cruzando a linha média; gânglios regionais ipsilaterais podem estar comprometidos.
III	tumor estendendo-se além da linha média, gânglios regionais bilaterais podem estar comprometidos.
IV	doença metastática envolvendo esqueleto, tecidos moles, gânglios ou órgãos distantes.
IVS	estadiamento I ou II, mas com doença remota confinada a um ou mais sítios: fígado, pele ou medula óssea (sem evidências de doença óssea).

O sistema do Hospital St. Jude, derivado da proposição original de Pinkel, leva em consideração a intervenção sobre a neoplasia, e divide a doença metastática em exclusivamente extra-óssea (A) , lesão óssea única (B) e óssea generalizada e/ou medula óssea (C).

A tabela 6 descreve o sistema de estadiamento do Hospital St. Jude.

Tabela 6 -Estadiamento de St. Jude

I	tumor localizado completamente ressecado, sem invasão local.
II	tumor localizado ressecado, com restos microscópicos.
III	tumor localizado ressecado parcialmente ou não ressecado.
IIIA	doença metastática para fígado, gânglios, pele ou outros órgãos, mas sem envolvimento ósseo ou de medula óssea.
IIIB*	doença metastática pra fígado, gânglios, pele ou outros órgãos, com lesão única óssea. Não há envolvimento de medula óssea.
IIIC	doença generalizada em ossos e medula óssea ou apenas em medula óssea.

*De ocorrência quase virtual

O estadiamento do Pediatric Oncology Group, deriva imediatamente do sistema acima, mas reconhece a variedade IV-S do sistema de Evans e D'Angio, sendo descrito na tabela 7:

Tabela 7 - Estadiamento Pediatric Oncology Group (POG)

A	ressecção macroscópica completa, com ou sem doença residual. Linfonodos intracavitários não aderentes ao tumor, mas removidos necessitam estar histologicamente livres da neoplasia. Linfonodos aderentes a superfície tumoral ou dentro do tumor primário podem estar positivos. Fígado sem infiltração tumoral.
B	Ressecção macroscópica incompleta do tumor primário. Linfonodos e fígado livres da neoplasia.
C	Ressecção completa ou não do tumor primário. Linfonodos intracavitários não aderidos ao tumor primário estão histologicamente infiltrados pela doença. Fígado livre da neoplasia.
D	Doença disseminada para além de linfonodos intracavitários (linfonodos extracavitários, fígado, pele, medula óssea , ossos).
DS	Crianças menores de 1 ano em estadiamento IV-S, conforme Evans e D'Angio (tumores não ultrapassando linha média, com doença metastática para fígado, pele ou medula óssea, mas sem metástases ósseas).

A maior diferença entre os sistemas de estadiamento do CCG (Evans e D'Angio) e POG é referente aos pacientes com envolvimento de linfonodos ipsilaterais (estádio I e II no sistema CCG e C no POG) e em tumores que cruzam a linha média com linfonodos negativos (POG estágio A ou B e III no CCG).

Baseado em análises retrospectivas dos sistemas de Evans e Pinkel, modificações foram propostas na tentativa de uma melhor caracterização prognóstica. NINANE⁸⁹ avaliou 33 crianças com doença em estágio II de Evans e verificou que, em um grupo de 20 crianças sem envolvimento de linfonodos, nenhuma faleceu em consequência da neoplasia. Entretanto, 6 de 13 com linfonodos positivos morreram. Revendo estádios II e III, HAYES⁸⁷ encontrou 83 %

de sobrevida em pacientes sem envolvimento de linfonodos, comparados a 31 % no grupo com metástases nodais. A possibilidade de ressecção cirúrgica também é fator de prognóstico. Se os linfonodos não apresentarem envolvimento tumoral, mais de 90% das crianças com tumores totalmente ressecados sobreviverão.

Em 1987, foi proposto um sistema internacional de estadiamento para neuroblastomas (INSS) tendo como objetivo uniformizar os vários estadiamentos anteriores⁹⁰, sendo composto de critérios mínimos para o estabelecimento do diagnóstico, estadiamento adequado e quantificação de respostas. Esse sistema combina características do sistema POG e do CCG. A tabela 8 define esse sistema⁹¹.

O sistema de classificação de resposta é definido na tabela 9, sendo expresso em porcentagem de regressão de tamanho e extensão da neoplasia⁹⁰.

Tabela 8 : Sistema Internacional de Estadiamento para Neuroblastomas

1	tumor localizado, confinado à área de origem; ressecção macroscopicamente completa, com ou sem doença residual microscópica ; linfonodos ipsi e contralaterais identificados livres de comprometimento neoplásico.
2A	tumor unilateral com remoção macroscopicamente incompleta; linfonodos ipsi e contralaterais identificados livres de comprometimento neoplásico.
2B	tumor unilateral com remoção macroscopicamente completa ou incompleta; linfonodos ipsilaterais comprometidos; linfonodos contralaterais identificados livres de comprometimento neoplásico.
3	tumor infiltrando-se através da linha mediana, com ou sem envolvimento de linfonodos regionais; ou tumor unilateral com linfonodos contralaterais positivos; ou tumor mediano com envolvimento ganglionar bilateral.
4	metástases a linfonodos distantes, osso, medula óssea, fígado e outros órgãos (exceto como definidos como 4S).
4S	tumor primário localizado conforme definido para estádios 1 ou 2, com metástases hepáticas, pele e/ou medula óssea (infiltração $\leq 10\%$ de células neoplásicas).

Tabela 9: Critérios de Resposta Terapêutica para Neuroblastoma -INSS

CR	ausência de tumor primário, de metástases e catecolaminas urinárias normais.
VGPR	redução do tumor primário no mínimo de 90 % ; ausência de metástases novas e com melhora das iniciais, lesões ósseas estáveis ou melhoradas e catecolaminas urinárias diminuídas em mais de 90 % em relação ao diagnóstico.
PR	redução do tumor primário de 50% a 90 %; sem lesões novas; 50% a 90% de redução em todos os locais acometidos; uma amostra apenas de medula óssea comprometida ; lesões ósseas no mínimo estáveis e catecolaminas reduzidas de 50 a 90%.
MR	ausência de novas lesões; > 50 % redução das lesões anteriores com < 50 % de algumas ; < 25 % de aumento em qualquer lesão, exceto medula óssea.
NR	ausência de novas lesões ; < 25 % redução e < 25 % aumento em lesões pré-existentes.
PD	doença progressiva; aumento acima de 25 % nas lesões.

Obs : CR = remissão completa ; VGPR = resposta parcial muito boa ; PR = resposta parcial ; MR = resposta mista ; NR = ausência de resposta ; PD = doença progressiva

Em 1993, esses critérios foram revistos e algumas modificações propostas: considerar estágio 4S apenas os pacientes menores de 1 ano de idade e que apresentam infiltração de medula óssea de até 10% , sendo que os demais seriam classificados como estágio 4. Também se recomenda a inclusão de mapeamento com MIBG para melhor avaliação da extensão da doença ao diagnóstico e análise do *MYCN*, índice de DNA, *TrK-A* e estudo cromossômico com o objetivo da caracterização de grupos de risco⁹².

Em setembro de 2005, cinquenta e dois investigadores da Austrália, Nova Zelândia, China, Europa, Japão e América do Norte reuniram-se numa Conferência Internacional em Whistler, Canadá, onde foram avaliados os fatores prognósticos de 11.054 pacientes portadores de neuroblastoma tratados no período de 1974 a 2002. Foram discutidos critérios para um novo estadiamento: International Neuroblastoma Risk Group Staging System(INRGSS)⁹³.

O INRGSS baseia-se na avaliação no momento do diagnóstico (pré-cirúrgica e pré quimioterapia), já q o INSS é pós cirúrgico e dependente exclusivamente da ressecabilidade ou não do tumor (e portanto da experiência do cirurgião). Tal sistema objetiva, através de um estadiamento mais homogêneo, permitir de maneira mais fidedigna a comparação de resultados terapêuticos obtidos em diferentes regimes de tratamento⁹³. O INRGSS é baseado em dados radiológicos, sendo q a doença localizada é determinada pela ausência (L1) ou presença (L2) de fatores de risco cirúrgicos definidos pela imagem (IDRF)⁹⁴. Tais fatores estão associados a ressecabilidade do tumor e a possibilidade de existência de complicações cirúrgicas^{95,96}. No estágio 1 e 2, o tumor necessita ser ressecado; o estágio M é utilizado para doença disseminada e MS refere-se a doença limitada a pele, fígado e medula óssea, sem envolvimento cortical em crianças de 0 a 18 meses, com tumores primários L1ou L2⁹³. É recomendado também o estudo das variáveis biológicas do tumor (amplificação do *MYCN*, aberrações do 11q e ploidia), em adição a idade⁹⁷.

O sistema INRGSS e os fatores de risco cirúrgicos da região cervical-torácica e abdome/pelve estão esquematizados respectivamente nas tabelas 10, 11 abaixo:

Tabela 10: INRGSS-International Neuroblastoma Risk Group

L1 Tumor loco regional não envolvendo estruturas vitais (IDRF).
L2 Tumor loco regional envolvendo um ou mais estruturas vitais (IDRF).
M Doença metastática à distância (exceção MS).
Ms Doença metastática confinada a pele e/ou fígado e/ou medula óssea (em crianças menores de 18 meses com tumores L1/L2).

Tabela 11- IDRF – Fatores de risco definidos pela imagem

<p>Pescoço</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumor envolvendo carótida e/ou artéria vertebral e/ou veia jugular. • Tumor estendendo-se para a base do crânio. <p>Junção Tóraco-Cervical</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumor envolvendo plexo braquial. • Tumor envolvendo veias subclávias e/ou vertebral e/ou artéria carótida. • Tumor envolvendo a traquéia. <p>Tórax</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumor envolvendo a aorta e/ou seus grandes ramos. • Tumor comprimindo a traquéia e/ou brônquio principal. • Massa mediastino inferior, infiltrando junção costo-vertebral entre T9 e T12. • Derrame pleural com ou sem a presença de células malignas. <p>Tóraco-abdominal</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumor envolvendo a Aorta e/ou Cava. <p>Abdome/pelve</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumor infiltrando o sistema Porta Hepático. • Tumor infiltrando os ramos da artéria Mesentérica Superior, em sua emergência. • Tumor envolvendo as Celíacas e/ou artéria Mesentérica Superior. • Tumor invadindo um ou ambos pedículos renais. • Tumor envolvendo Aorta e/ou veia Cava. • Tumor envolvendo os vasos Ilíacos. • Tumor pélvico cruzando os nervos Ciáticos. • Ascite com ou sem a presença de células malignas. <p>Tumores “halteres” com sintomas de compressão da coluna espinhal</p> <ul style="list-style-type: none"> • Qualquer localização. <p>Envolvimento/infiltração de órgãos e estruturas adjacentes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pericárdio, diafragma, rim, fígado, bloco duodeno-pâncreas, mesentério e outros.

2.8-Fatores de Prognóstico

Os fatores de prognóstico são elementos passíveis de influenciar a evolução dos neuroblastomas. Salienta-se, entretanto, que a maioria das crianças com neuroblastoma, quais sejam, com idade acima de 1 ano ao diagnóstico e com doença disseminada (particularmente esqueleto e/ou medula óssea), apresentam chance de cura extremamente limitada, restringindo a avaliação de outras variáveis de prognóstico. Em pacientes acima de 1 ano com doença localizada irresssecável e doença regional (estádio 2 e 3 respectivamente- INSS), observa-se grande variedade de respostas terapêuticas em função das variáveis clínicas e biológicas. Crianças de qualquer idade com doença localizada ressecada (estádio 1-INSS) apresentam um bom prognóstico^{98,99}.

Tendo em vista as considerações acima, discutiremos a seguir os principais fatores de prognóstico passíveis de influenciar a evolução dos neuroblastomas.

2.8.1 – Extensão e localização da moléstia; idade ao diagnóstico

São as duas principais variáveis independentes de prognóstico, reconhecidas historicamente e nos protocolos atuais. BRESLOW, em 1971¹⁰⁰ demonstrou em 246 crianças analisadas, que o prognóstico era tanto mais reservado quanto maior fosse o grau de disseminação dos neuroblastomas, e que aqueles com idade igual ou inferior a 1 ano ao diagnóstico teriam melhores chances, independentemente do estágio que apresentassem. Pesquisadores do St Jude Children's Research Hospital demonstraram que a quimioterapia agressiva resultou em sobrevida de 2 anos em apenas 20 % das crianças acima de um ano com neuroblastoma 4-INSS¹⁰¹. Essas observações, já sugeridas em 1956, são também confirmadas em outras estatísticas^{102,103}.

Uma forma particular de apresentação favorável, ocorrendo em crianças abaixo de 1 ano de idade, é denominado como 4-S (INSS). Salienta-se, entretanto, que não representam uma forma uniforme quanto a sua agressividade e necessidade de intervenção terapêutica. As regressões espontâneas não são universais e marcadores normalmente identificados nas formas de pior prognóstico, como a amplificação do *MYCN* e a diploidia, podem ser encontrados em estádios 4-S de má evolução. Além disso, esses tumores podem apresentar-se com quadro clínico potencialmente letal, em consequência de complicações relacionadas em grande parte ao aumento excessivo do fígado (síndrome de Pepper), levando a um quadro de icterícia, desconforto respiratório e coagulopatia de consumo intratumoral. Nessas circunstâncias, quimioterapia de baixa dose e/ou radioterapia podem tornar-se necessárias¹⁰⁴⁻¹⁰⁷.

LONDON, mais recentemente, encontrou evidências que o “cutoff” entre 15 e 19 meses teria maior correlação com o prognóstico do que a idade de 12 meses. Retrospectivamente avaliou 3666 pacientes provenientes do Pediatric Oncology Group (POG) e do Children’s Cancer Group (CCG) e, utilizando a idade de corte de 460 dias, observou a sobrevida livre de eventos (4 anos) de 42% para maiores (n =1589) e de 82% para menores (n=2077) de 460 dias; $P < 0.001$ ¹⁰⁸.

Deve-se destacar a relevância do envolvimento de linfonodos regionais não intimamente aderidos ao tumor (estádio C do sistema POG) como fator de mau prognóstico: os dados disponíveis indicam que sua chance de cura não é estatisticamente diferente daqueles com doença amplamente disseminada, devendo as proposições terapêuticas abordar de modo análogo ambas as variedades^{89,109}.

A localização do tumor primário também tem influência: tumores retroperitoneais e particularmente de adrenais têm pior prognóstico, enquanto

os mediastinais têm melhor sobrevida¹¹⁰. Há, por sua vez, uma maior associação respectiva dessas apresentações com doença disseminada e localizada, o que talvez explique a relação apresentada.

2.8.2 – Marcadores tumorais

São de valor limitado quanto à influência sobre o prognóstico, em particular nas formas avançadas e em crianças de maior idade¹¹¹.

A relação entre excreção urinária de catecolaminas e seus metabólitos, particularmente ácido vanilmandélico (VMA) e ácido homovanílico (HVA), tem valor indicativo prognóstico. Embora a excreção isolada de VMA e HVA contribua para a estimativa de sobrevida em pacientes com doença localizada¹¹², é a relação entre a excreção de VMA e HVA, conforme seja maior ou menor que um, que respectivamente associa-se a maior ou menor chance de sobrevida¹¹³.

Níveis mais elevados de Enolase neuro-específica (NSE) são encontrados em crianças com doença avançada, correlacionando-se assim com o estadiamento e prognóstico desfavorável. Seus níveis normalizam-se após o desaparecimento do tumor. Em crianças estágio 4-S, os valores séricos de NSE são significativamente menores que no estágio 4⁶⁰.

Crianças com níveis normais de ferritina sérica apresentam prognóstico melhor comparativamente àquelas com níveis elevados⁶⁴. Apresentam normalização dos valores durante a remissão da doença e raramente é encontrada alterada em crianças com doença localizada e nos neuroblastomas estágio 4-S¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Os níveis de desidrogenase láctica (DHL) no soro dos pacientes ao diagnóstico também têm correlação com o prognóstico^{38,117,118}. Níveis

sanguíneos superiores a 1500 U/ml ou 2,7 vezes o limite superior da normalidade estão associados com doença mais agressiva¹¹⁹, refletindo rápida multiplicação celular e grandes massas.

Os gangliosídeos, particularmente o GD2, são encontrados nas membranas de células de neuroblastomas indiferenciados, representando possibilidade de diagnóstico e também de prognóstico^{120,121}. Níveis séricos baixos do gangliosídeo GT1b e GD1b correlacionam-se com evolução desfavorável¹²².

2.8.3- Histologia

Tumores com histologia bem diferenciada tem prognóstico favorável^{40,98,119,123}. A classificação de Shimada, conforme discutido, apresenta correlação com o prognóstico, desde que associada à idade do paciente¹²⁴.

O INPC (International Neuroblastoma Pathology Committee) distingue os neuroblastomas em dois grupos de prognóstico, associados também à idade. Na categoria dos neuroblastomas, o subgrupo com histologia favorável apresentava idade média de 0,43 anos, enquanto o subgrupo com prognóstico desfavorável tinha como idade média 2,99 anos⁵⁷:

-Histologia favorável: ganglioneuroma, neuroblastoma, ganglioneuroblastoma intermediário.

-Histologia desfavorável: neuroblastoma, ganglioneuroblastoma nodular.

2.8.4- Citogenética e Biologia Molecular

Estudos citogenéticos de material tumoral têm revelado alterações em cerca de 80 % dos casos de neuroblastomas^{66,125}. A mais freqüente delas é a deleção do braço curto do cromossomo 1, sendo a região distal à porção 1p32 a que com maior freqüência é perdida¹²⁶⁻¹²⁸. Essa deleção, observada em aproximadamente

75% dos casos de neuroblastomas, é interpretada como a perda de um gene, o gene supressor dos neuroblastomas, que impediria o desenvolvimento de tumores.¹²⁹⁻¹³² Embora interessante, tal correlação nunca foi confirmada, apesar de BRODEUR¹³³⁻¹³⁴ ter demonstrado que a introdução do segmento 1p em uma linhagem celular de neuroblastoma levou à diferenciação celular, parada de crescimento e morte celular. CARON¹³⁵ correlacionou a deleção 1p com prognóstico desfavorável (independente do estágio e idade). GEHRING¹³⁶, entretanto, acredita que tal correlação seja consequência da associação dessa alteração genética com a amplificação de *MYCN*. A associação entre alteração do 1p e a amplificação do *MYCN* provê condições para o desenvolvimento de neuroblastomas¹³⁶; todavia, embora tentadora, tal hipótese, nunca foi cartesianamente comprovada.

THOMPSON descreveu em 22 % de neuroblastomas primários a deleção no braço longo dos cromossomo 14, sugerindo a presença de um gene supressor, envolvido na iniciação e progressão dos neuroblastomas, nessa região cromossômica¹³⁷.

Outras anormalidades são vistas, como trissomia parcial do cromossomo 17 e deleção no braço longo do cromossomo 11; ambos parecendo estar associadas a um comportamento mais agressivo., situação observada mesmo em tumores sem amplificação de *MYCN*¹³⁸⁻¹⁴³. Foram descritas também deleções no braço longo dos cromossomos 13^{142,143}.

Existem evidências de que a amplificação do oncogene *MYCN* contribui para o comportamento agressivo das células neuroblastomatosas¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. O *MYC-N* pertence à família de oncogenes *myc*, localizada no cromossomo 2, originando um conjunto de proteínas denominado MYC, localizados no núcleo celular. É um eficiente fator de controle de crescimento e diferenciação celular. Sua amplificação é medida através do número de cópias do oncogene, sendo o limite até 4 cópias. Sua expressão é medida pela atividade do gene, sendo avaliada através da

quantificação de N-myc-RNA e de suas proteínas MYC. Normalmente é expresso em células de baixo grau de diferenciação, como células do rim, retina e neuroblastos. Alta expressão sem amplificação é observada em cérebro humano fetal, adrenal, retina, pulmão fetal, linhagens celulares de retinoblastoma e tumor de Wilms. A expressão de *MYCN* sem amplificação concomitante parece ser normal em certas células imaturas, o mesmo não ocorrendo em tecidos maduros¹⁴⁷⁻¹⁵⁰.

O grau de expressão de *MYCN*, por sua vez, tem relação controversa com o prognóstico. Dificulta a interpretação desses resultados a inclusão freqüente, na análise dos resultados, de pacientes com e sem amplificação. Tese apresentada (Borin, L) ao Departamento de Pediatria da FMUSP abordava esse tema em população exclusivamente sem amplificação, podendo os resultados apontar à tendência desfavorável de prognóstico em formas mais limitadas e ocorrendo em menor idade³.

A amplificação de *MYCN* foi demonstrada em células de neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma pulmonar de pequenas células e astrocitoma. Pode ser considerado como um marcador do tumor, pois o grau de amplificação parece ser constante durante toda a sua evolução, tanto no sítio primário quanto nas metástases^{151,152}.

BRODEUR, em um estudo realizado em 1988 com 450 amostras de neuroblastoma, revelou uma correlação entre a amplificação de *MYCN* e estádios avançados da doença¹⁵³. Em 307 neuroblastomas avançados, 95 ou 31% deles apresentavam amplificação de *MYCN*, porém pequena porcentagem era observada em pacientes com doença localizada: 6 em 109 pacientes com estádios I e II e nenhum em 12 ganglioneuromas. Alguns pacientes com doença localizada, mas com *MYCN* amplificado, apresentaram rápida progressão da

³ Estudo com análise inicial sendo revista, para publicação definitiva.

neoplasia e prognóstico tão ruim quanto aqueles com doença avançada. NAKAGAWARA, em 1990, observou evolução desfavorável em neuroblastomas estágio IV-S, tradicionalmente caracterizados como de boa evolução¹⁵⁴. Em 1997, o Neuroblastoma Study Group of the Société Française d'Oncologie Pédiatrique correlacionou a amplificação do *MYCN* como o fator de prognóstico mais importante em neuroblastomas localizados¹⁵⁵. Em resumo, a amplificação do *MYCN* pode resultar em uma perda de regulação intrínseca, a qual levaria à alteração do controle de crescimento e diferenciação celular, causando um comportamento biológico agressivo^{45, 156-160}.

A análise de conteúdo de DNA das células tumorais, através da citometria de fluxo, tem revelado uma associação entre o elevado conteúdo de DNA com estádios menos avançados da moléstia e melhor resposta à quimioterapia¹⁶¹⁻¹⁶⁴. O conteúdo de DNA nos permite discriminar dois tipos principais de neuroblastomas: diplóides (45 % de todos os tumores) e os triplóides (55% restantes)¹⁶¹. A imensa maioria dos exemplos de regressão e amadurecimento espontâneo concentra-se no grupo triplóide¹⁶⁵. Todavia, a vantagem conferida pela triploidia concentra-se fundamentalmente nas crianças menores de um ano e estádios avançados da moléstia, perdendo sua relevância naqueles maiores de dois anos¹⁶⁶. Nos lactentes, provavelmente, o ganho cromossômico é total, sem os rearranjos estruturais que costumam acompanhar as crianças de maior idade.

Associando-se os fatores descritos acima, poder-se-á dividir os neuroblastomas em três categorias genéticas, cada qual tentando sugerir uma perspectiva evolutiva¹⁵⁹:

- 1) Cariótipo triplóide, ausência de amplificação do *MYCN* e sem deleção do 1p: são geralmente pacientes com menos de um ano de idade, doença localizada e bom prognóstico.
- 2) Cariótipo diplóide, sem amplificação de *MYCN* e sem deleção de 1p: são geralmente pacientes mais velhos, com estádios mais

avanzados da moléstia, lentamente progressivos e freqüentemente fatais.

- 3) Cariótipos diplóides, com deleção de 1p e/ou amplificação de *MYCN*: são pacientes geralmente mais velhos, com estádios avanzados de doença e rapidamente progressivos.

Vários fatores neurotróficos estão envolvidos na regulação da maturação neuronal. Em 1993, três receptores de tirosino-quinase associados a esses fatores foram clonados, e sua respectiva principal associação identificada: *TrkA*/NGF (nerve growth factor), *TrkB*/BDNF (brain-derived neurotrophic factor) e *TrkC*/NT-3 (neurotrophin-3)¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

A expressão do *TrkA* está relacionada a diferenciações espontâneas *in-vivo* ou regressões clínicas. NAKAGAWARA estudou essa via e concluiu que todos os tumores com estádios limitados e ausência de amplificação de *MYCN*, revelaram altos níveis de *TrkA* e; com uma única exceção, todos os tumores com amplificação de *MYCN* revelaram níveis extremamente reduzidos ou indetectáveis de sua expressão^{167,168}.

A expressão de *TrkC*, de maneira similar à de *TrkA*, verifica-se predominantemente em tumores limitados e sem amplificação de *MYCN*¹⁷⁰; por sua vez, expressões elevadas de *TrkB* associam-se a neoplasias de péssimo prognóstico¹⁷¹⁻¹⁷².

BLACKWOOD, em 1991, descreveu um conjunto de proteínas intracelulares denominado Max e Mad, que interagem com *MYCN*, interferindo com sua amplificação¹⁷³. O modelo Myc-Max-Mad revela um papel central no Max, que forma complexos de transcrição em associação com N-Myc e complexos antagonistas da transcrição com Mad/Mnt. Esse modelo implica que Myc- Max e Mad/Mnt-Max existam em equilíbrio. Alteração no balanço celular podem fazer que

ocorra flutuações na expressão das proteínas ligadas ao Max, por exemplo, na sub regulação do Myc e na expressão do Mad, ao receberem sinais de ativação/desativação do ciclo celular ou sinais de indução p diferenciação.

Os genes associados ao fenômeno de resistência simultânea a múltiplos agentes quimioterápicos (provavelmente em função de aumento de seu efluxo do interior das células neoplásicas) são os gene da múltipla resistência a drogas (*MDR1*) e o gene da proteína relacionada à múltipla resistência a drogas (*MRP1*).

A P-glicoproteína (P-gp) é uma glicoproteína que atua como uma bomba ATP-dependente de efluxo de droga e que pode caracterizar a resistência tumoral a múltiplas drogas, sendo a expressão comum dos genes denominados *MDR* (multiple drug resistance genes). Estudando a influência dos níveis de P-gp na extensão da doença ao diagnóstico em 67 pacientes com neuroblastoma, CHAN¹⁷⁴ não a detectou nas amostras pré-tratamento de 2 pacientes com estágio I, 21 com estágio II e 8 com estágio IV-S, encontrando-a em 1 de 17 pacientes com estágio III (6 %) e em 12 de 19 com estágio IV (63 %). De 44 pacientes com neuroblastoma disseminado (estádios III, IV-S ou IV), 26 de 31 com P-gp negativa alcançaram a remissão completa com quimioterapia em comparação com 6 de 13 que eram positivos para Pgp (84% versus 46%). A autora concluiu que a expressão da P-gp antes do tratamento pode ser um fator preditivo de resposta terapêutica e que a utilização combinada de agentes quimiosensibilizantes capazes de reverter a atividade dessa proteína poderia promover maior sucesso terapêutico. LA QUAGLIA¹⁷⁵ demonstrou, em linhagens de células de neuroblastoma, que os níveis de P-gp podem aumentar após sua exposição a agentes quimioterápicos. DHOOGHE observou que esse aumento de P-gp ocorre principalmente nas células neoplásicas metastáticas (raramente no tumor primário)¹⁷⁶.

NORRIS correlacionou a expressão de MRP com estádios avançados de neuroblastomas e prognóstico limitado¹⁷⁷.

A atividade de telomerase revelou, em estudos preliminares, associação entre sua atividade e sobrevida de portadores de neuroblastoma. Pacientes com nenhuma atividade de telomerase apresentavam excelente prognóstico, enquanto que pacientes com elevada atividade (a maioria com amplificação de *MYCN*) revelaram um prognóstico sombrio¹⁷⁸.

Em relação ao prognóstico, o aumento das proteínas responsáveis pela apoptose apresenta resultados conflitantes; é o caso, por exemplo da família das proteínas Bcl-2¹⁷⁹. As caspases, por sua vez, evidenciam de que seu aumento esteja associado a características biológicas favoráveis e melhor prognóstico¹⁸⁰. KRAMER¹⁸¹ avaliou a proteína CD44 e concluiu estar relacionada a neuroblastomas de melhor prognóstico.

KORJA, em 2009, onde avaliou a expressão do Ácido Polisiálico(polySia) e seu carregador NCAM em 36 amostras tumorais de neuroblastoma e observou sua presença em pacientes com metástases ao diagnóstico e com doença avançada ($P= 0,047$), semelhante ao observado na literatura com outros tipos de tumores. Entretanto sua ausência em tumores avançados com *MYCN* não amplificado correlacionou-se com prognóstico desfavorável ($P= 0,0004$)¹⁸².

Um estudo coordenado por COHN analisou treze fatores potenciais de prognóstico num estudo de coorte com 8800 portadores de neuroblastoma diagnosticados entre 1990 e 2002 provenientes da América do Norte, Austrália (Children's Oncology Group), Europa (International Society of Pediatric Oncology Europe Neuroblastoma Group e German Pediatric Oncology and Haematology Group) e Japão⁹³.

Entre os resultados obtidos nesse estudo, destaca-se:

- Entre os pacientes estágio não 4, a categoria histológica (ganglioneuroma e ganglioneuroblastoma intermediário vs nodular e neuroblastoma) foi o fator prognóstico mais importante na sobrevida livre de eventos (EFS).

- Nos pacientes estágio não 4 portadores de ganglioneuroblastoma (GN) nodular e neuroblastoma (NB), o status do *MYCN* apresentou-se como principal fator prognóstico.

Tais resultados podem ser apreciados na figura 2 abaixo.

Figura 2: Análise global dos pacientes avaliados pelo INRG⁹³

OBS: NB=neuroblastoma; GNB=ganglioneuroblastoma; GN=ganglioneuroma

EFS: sobrevida livre de eventos; OS: sobrevida total

Entre os pacientes estágio 1, 2, 3 e 4S portadores de NB e GN nodular com *MYCN* não amplificado, obtiveram-se os seguintes resultados:

- Pacientes estágio 1 apresentaram sobrevida significativamente maior em relação a pacientes estágio 2, 3 e 4S.

- EFS em pacientes estágio 1 com cromossomo 1 normal foi estatisticamente significante maior em relação a pacientes com aberração no cromossomo 1; tal diferença, entretanto, não foi observada na sobrevida total (OS).

- Em pacientes estágio 2 e 3, a idade de 18 meses mostrou-se estatisticamente significante com EFS maior para crianças menores que um ano e meio. A aberração do 11q mostrou-se ter correlação com prognóstico pior em crianças menores de 18 meses com *MYC* não amplificado (EFS e OS). Para o mesmo grupo de pacientes com faixa etária maior que 18 meses, a aberração do 11q mostrou-se ser um fator de prognóstico importante, mas o grau de diferenciação também tem sua relevância, independente das alterações do 11q. Consequentemente, foi combinado em um único fator prognóstico pacientes com aberração do 11q e/ou tumores indiferenciados (ou pouco diferenciados) vs crianças com nenhum desses fatores.

- Em estádios 4S, a aberração do 11q mostrou-se o mais importante fator prognóstico. Entretanto, o número de pacientes nessa coorte é muito reduzido e estudos adicionais são necessários para avaliar seu impacto na sobrevida desse grupo.

Os resultados acima estão esquematizados na figura 3 abaixo⁹³.

Fig 3: Neuroblastoma e ganglioneuroblastoma nodular INSS 1,2,3, 4S⁹³

OBS:EFS=sobrevida livre de eventos; OS=sobrevida total

Amp: amplificado

Nos pacientes portadores de NB e GNB com *MYC* amplificado, estágio 1, 2, 3, 4S observou-se que a desidrogenase láctica (DHL) é o principal fator prognóstico. Destaca-se que 72% entre os 169 desses pacientes estágio 2,3 e 4S com DHL elevado pertenciam exclusivamente ao estágio 3. Em consequência da natureza não específica do DHL e do limitado número de pacientes nesse estudo, optou-se por não incluí-lo no sistema classificação de grupos de risco.

Os resultados acima estão esquematizados na figura abaixo.

Fig 4: Neuroblastoma e ganglioneuroblastoma nodular, INSS 1, 2, 3 e 4S⁹³

OBS: EFS=sobrevida livre de eventos; OS=sobrevida total;
DHL=desidrogenase láctica

Tal estudo também avaliou os pacientes com doença disseminada, isto é, estágio INSS 4 e obteve os seguintes resultados⁹³:

- A idade é o mais importante fator prognóstico para esse grupo de pacientes. Pacientes com idade inferior a 18 meses apresentaram sobrevivência total e livre de eventos significativamente maior em relação ao grupo com idade superior a 18 meses.

- Os níveis séricos de ferritina, apesar de se apresentarem como um índice prognóstico para pacientes maiores de 18 meses nesse presente estudo, não foram incluídos no sistema de classificação de risco, porque não adicionam informações relevantes já que a EFS e a OS foi baixa para ambos os grupos (<v> 92ng/ml).

- A amplificação do *MYCN* foi o principal fator de prognóstico desfavorável para crianças menores de 18 meses.

- A ploidia (índice de DNA) mostrou-se um fator prognóstico importante para crianças menores de 18 meses, estágio 4 com *MYCN* não amplificado: índice ≥ 1 com EFS de $85\% \pm 3\%$ vs. $71\% \pm 10\%$ para índice DNA menor que um.

Os resultados acima estão esquematizados na figura 5 abaixo.

Figura 5: INSS estágio 4⁹³

OBS: EFS= sobrevida livre de eventos; OS= sobrevida total

Amp: amplificado

Em resumo, concluiu-se que o estágio, idade, tipo histológico, grau de diferenciação tumoral, status do *MYCN*, status do cromossomo 11q e ploidia DNA geram impacto significativo na sobrevida. Dezesesseis grupos de risco foram identificados, utilizando letras de “A” a “R, considerando-se o EFS de 5 anos⁹³:

- Muito baixo (A, B, C); $> 85\%$ EFS; 28,2% dos pacientes.
- Baixo (D, E, F); $> 75\%$ a $\leq 85\%$ EFS; 26,8% dos pacientes.
- Intermediário (G, H, I, J); $> 50\%$ a $\leq 75\%$ EFS; 9% dos pacientes.
- Alto (K, N, O, P, Q, R); $< 50\%$ EFS; 36,1% dos pacientes.

A tabela 12 ilustra melhor os diversos grupos de risco INRG descritos acima.

Tabela 12: Consenso dos grupos de riscos INRG pré tratamento

INRG	Id	Histologia	Grau dif tu	MYCN	aberraç 11p	Ploidia	Grupo Risco
L1/2		GN GNB intermediário					A Muito Baixo
L1		Qualquer, exceto GN e GNB Intermediário		NA Amp			B Muito Baixo K Alto
L2	<18m	Qualquer, exceto GN e GNB intermediário		NA	Não Sim		D Baixo G Intermediário
			Em diferenc	NA	Não Sim		E Baixo
	≥ 18m	GNB nodular NB	Pouco diferenc Indiferenciado	NA			H Intermediário
				Amp			N Alto
M	<18 < 12m 12m a 18m < 18 m ≥ 18m			NA NA NA Amp		hiperdipl diplóide diplóide	F Baixo I Intermediário J Intermediário O Alto P Alto
					Não		C Muito Baixo
MS	< 18m			NA	Sim		Q Alto
	< 18m			Amp			R Alto

OBS: NB=neuroblastoma; GNB=ganglioneuroblastoma; GN=ganglioneuroma; Id=idade; Grau dif tu= grau diferenciação tumoral; aberraç=aberração; NA=não amplificado; Amp= amplificado; hiperdipl=hiperdiplóide; m=meses

A tabela 13 abaixo resume os fatores de prognóstico mais importante enumerados acima. O grupo favorável apresenta sobrevida de 3 anos acima de 90%; o grupo intermediário 30 a 50% de sobrevida e o grupo desfavorável menor que 20%.

Tabela 13: Fatores de prognóstico no Neuroblastoma

Fatores	Prognóstico		
	Favorável	Intermediário	Desfavorável
Idade (anos)	<1	1 - 2	> 2
Estádio (INSS)	1; 2 A; 4S	2B ; alguns 3	Alguns 3; 4
Tumor primário	mediastinal	pélvico, cervical	retroperitoneal
Ferritina	normal		aumentada
Enolase (ng/ml)	< 20	20-100	> 100
VMA/HVA	>1		<1
DHL (U/L)	< 1500		>1500
Cópias de <i>MYCN</i>	2	3-10	> 10
Ganho 17q	raro	comum	comum
11q14q LOH	raro	comum	raro
DNAi	triploidia	diploidia	diploidia
1pLOH	raro	incomum	comum
Expressão <i>TrkA</i>	alta	baixa/ausente	baixa/ausente
Expressão <i>TrkB</i>	baixa/ausente	baixa/ausente	alta
Expressão <i>TrkC</i>	alta	baixa/ausente	baixa/ausente
Expressão telomerase	ausente	baixa/ausente	alta
Histologia	GB intermediário Neuroblastoma Ganglioneuroma		GB nodular Neuroblastoma

OBS : GB = ganglioneuroblastoma DNAi = índice de DNA; LOH= perda de heterozigose (através da técnica de Southern blot, o polimorfismo de DNA entre os alelos é revelado; a perda desse polimorfismo é, portanto, indicativa da deleção de um desses alelos). São consideradas variáveis estatisticamente independentes os itens idade e estágio.

Apesar dos fatores de prognóstico referidos acima, apenas a idade e o estágio são variáveis independentemente universalmente comprovadas. Crianças de todos os estágios com mais de um ano apresentam prognóstico inferior em comparação a lactentes, com progressiva redução da sobrevida em estágios mais avançados. Didaticamente, baseando-se nesses dois fatores prognósticos podemos classificar o neuroblastoma em 3 grupos de prognóstico¹⁸³:

1) Pacientes que normalmente requerem apenas cirurgia e que ocasionalmente recebem tratamento adicional com quimioterapia de baixa dosagem. Compreende estágio 1,2 e 4S e corresponde a 23% dos pacientes e apresentam sobrevida de 85%.

2) Pacientes submetidos à quimioterapia convencional e ressecção cirúrgica do tumor primário. Compreendem pacientes estágio 3 e lactentes estágio 4 e correspondem a 23% dos pacientes com sobrevida de 60%.

3) Pacientes submetidos a vários tipos de tratamento com quimioterapia intensiva, cirurgia, transplante de medula óssea, ácido retinóico e outras modalidades inovadoras. Compreende pacientes maiores de um ano, estágio 4. Correspondem ao maior grupo com 54% e têm sobrevida de apenas 15 % a 25 %, podendo aumentar para 30 a 40% com o uso de retinóides.

Detalharemos abaixo aspectos referentes a terapêutica desses pacientes.

2.9 - Tratamento

O tratamento dos neuroblastomas reside, basicamente, na possibilidade da remoção cirúrgica completa, no uso de combinações quimioterápicas

agressivas e, acessoriamente, na radioterapia. Armas recentemente acrescentadas a esse arsenal incluem a utilização de Meta-Iodo-Benzil-Guanidina (MIBG), imunoterapia, agentes estimuladores da diferenciação celular, Desferoxamina e os transplantes de medula óssea (TMO-megaquimioterapia).

Embora o neuroblastoma seja estudado há mais de um século, os resultados terapêuticos seguem desfavoráveis para os pacientes com idade acima de um ano ao diagnóstico e doença avançada. Crianças com doença localizada podem ser curadas e lactentes com menos de um ano (atualmente, tem sido preconizado o corte de 18 meses¹⁰⁸, apesar da literatura ainda rotineiramente utilizar a idade de 12 meses) têm melhor sobrevida com abordagens terapêuticas pouco complexas. Os demais, apesar do uso de quimioterapia, radioterapia e cirurgia, raramente sobrevivem.

O tratamento deve ser programado de acordo com os fatores de prognóstico, sendo intensivo nas neoplasias agressivas, em função de nossos ainda maus resultados de maneira relativamente independente da toxicidade, e mais brando naquelas de evolução favorável.

2.9.1-Quimioterapia

O neuroblastoma é uma neoplasia quimiosensível e HAYES^{183,184} avaliou as características proliferativas do neuroblastoma usando células obtidas de punção de medula óssea de pacientes com doença avançada, construindo um programa com ciclofosfamida administrada por sete dias, seguida de adriamicina no oitavo dia. Esse foi o primeiro estudo desenhado a partir de uma combinação cinética de drogas cujos resultados, de fato, apresentavam nítida correlação clínica. Seus estudos sugerem que há apenas uma pequena porção de células em fase de proliferação dentro da população celular do

tumor. A existência de uma vasta população de células não proliferantes explicaria a ação limitada de agentes quimioterápicos.

Vários agentes quimioterápicos foram utilizados em pacientes com neuroblastoma. Nos anos 60, demonstrou-se sua sensibilidade à ciclofosfamida¹⁸⁵, variando sua eficácia de acordo com a dose empregada. Posteriormente, vincristina, doxorrubicina, melfalan, imidazol-carboxamida, peptichemio, teniposide, daunorrubicina e cis-platinum foram avaliados, mostrando eficácia como monoterapia em doses convencionais¹⁸⁶⁻¹⁹³. Estudos mais recentes mostraram que a ifosfamida e a carboplatina também são ativas¹⁹⁴⁻¹⁹⁶.

Dentre todas as drogas, os derivados da platina (o Cis-platinum e a Carboplatina) foram os responsáveis pela obtenção de melhores resultados terapêuticos no neuroblastoma, com até 80 % de resposta além das parciais duração, quando usado em combinação com outros agentes como as epipodofilotoxinas. A história terapêutica do neuroblastoma, assim, pode ser dividida nas eras pré e pós derivados da platina¹⁹⁷⁻²⁰⁰. A relevância é tamanha a ponto de evolutivamente podermos comparar os diferentes esquemas quimioterápicos como potencialmente análogos, desde que incluam derivados da platina.

Cirurgia e quimioterapia são curativas na maioria dos pacientes com doença localizada (total ou parcialmente ressecada) e nos lactentes com doença disseminada¹⁰⁵.

Nos pacientes 4S, sem fatores biológicos adversos, a abordagem cirúrgica difere da realizada em crianças mais velhas com doença avançada, pois tais tumores costumam apresentar regressão espontânea, não necessitando portanto da cirurgia. Entretanto, esses tumores podem expandir-se localmente

e causar complicações, devido compressões de vasos, nervos e espaço epidural. Além disso, hepatomegalia maciça, secundária a metástases hepáticas, podem gerar cirurgias de emergência objetivando aliviar a pressão intra-abdominal²⁰¹.

Em relação aos pacientes maiores de um ano ao diagnóstico e com doença avançada, a quimioterapia empregando vários agentes é útil para induzir remissões completas ou parciais na maioria deles. Entretanto, em sua maioria, não é curativa e a melhor opção terapêutica para esses doentes é ainda desconhecida. Utilizando os vários esquemas terapêuticos conhecidos, consegue-se um maior número de remissões completas e de duração mais prolongada, porém, a sobrevida final segue inalterada com a taxa aproximada de 10 %²⁰²⁻²¹⁰.

Nos últimos vinte anos novas drogas apareceram, como os inibidores da topoisomerase I (Camptotecina e derivados hidrossolúveis) que têm se revelado agentes extremamente promissores para o tratamento de inúmeras formas de câncer. Duas dessas drogas, Irinotecan e o Topotecan tem sido estudadas em pediatria, tendo demonstrado atividade satisfatória nos neuroblastomas. A mielossupressão é o determinante básico no limite da dose do Topotecan e vários esquemas terapêuticos que o incluem tem sido propostos²¹¹⁻²¹³.

Estudos fase I e II permitem a utilização de janela terapêutica com a associação entre Topotecan e Ciclofosfamida. A experiência preliminar dessa combinação em recidivas pós transplante autólogo de medula óssea mostrou-se ser bem tolerada e passível de induzir respostas completas prolongadas, propiciando o emprego dessa combinação como terapia inicial, precedendo um esquema quimioterápico de potencial bem definido⁴.

⁴ Como no atual programa preconizado pelo Grupo Cooperativo Brasileiro de Tratamento de Neuroblastomas (Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica, NEURO-IX-2000)

2.9.2-Megaquimioterapia

A dose é um determinante importante na eficácia dos quimioterápicos, traduzindo-se em maiores taxas de remissão e cura nas neoplasias quimiosensíveis, pois impediria o surgimento de resistência. De um modo geral, a curva dose-resposta para quase todas as drogas é determinada pelos limites entre o efeito tóxico e o terapêutico. Muitas drogas exibem uma relação logarítmica entre a destruição celular e a dose até um certo ponto, quando se atinge um platô. A partir daí, pequenas mudanças na dose podem causar grandes mudanças na resposta, permitindo-se ultrapassar a resistência celular^{214,215}. Nesses princípios que se baseia a utilização da megaquimioterapia em neoplasias quimiosensíveis, mas não curáveis com doses convencionais. Os agentes alquilantes são bons exemplos de drogas com tal capacidade²¹⁶. O transplante de medula óssea oferece a possibilidade de intensificação do esquema quimioterápico para drogas cujo fator tóxico limitante é a mielossupressão.

Alentadores progressos na terapêutica de neuroblastoma foram obtidos por MATTAY²¹⁷ et al, em 1999, ao avaliar crianças portadoras de neuroblastoma avançado que foram uniformemente induzidas e divididas aleatoriamente nos seguintes grupos: 1) transplante autólogo de medula óssea (TAMO), com depleção *in vitro* de células neoplásicas, e condicionamento incluindo radioterapia corpórea total vs 3 ciclos adicionais de quimioterapia intensiva, e: 2) a todas as crianças completando o uso de regimes citotóxicos com distribuição aleatória entre ácido 13-*cis*-retinóico (isotretinoína) durante 6 meses vs nenhuma droga suplementar. Os resultados favoreceram o emprego do tratamento mieloablativo + uso de isotretinoína, alcançando $46 \pm 6\%$ de sobrevida livre de progressão neste subgrupo (resultado significativamente diferente dos demais subgrupos).

O seguimento clínico de 8 anos dos pacientes acima corroboraram essas hipóteses. Observou-se sobrevida livre de eventos (EFS) para período de 5 anos de $30\% \pm 4\%$ versus $19\% \pm 3\%$ para pacientes submetidos a TAMO, em relação a utilização apenas de terapêutica com quimioterapia intensiva ($P=0,04$). Em relação ao uso ou não da isotretinoína (cis-RA), na segunda randomização, EFS de 5 anos de $42\% \pm 5\%$ versus $31\% \pm 5\%$ respectivamente (dados não significativos). A sobrevida total de 5 anos para os diversos grupos foi de $59\% \pm 8\%$ (TAMO+ cis-RA), $41\% \pm 7\%$ (apenas TAMO), $38\% \pm 7\%$ (QT intensiva + cis-RA) e $36\% \pm 7\%$ para apenas QT. MATTAY²¹⁸ em 2009, concluiu assim os benefícios da sobrevida total e livre de eventos do transplante de medula óssea, em relação a quimioterapia intensiva e do ácido 13-*cis*-retinóico.

Dois outros estudos^{219,220} demonstraram um significativo aumento da sobrevida livre de eventos para pacientes submetidos a TMO, em relação a quimioterapia convencional. BERTHOLD acompanhou 295 pacientes portadores de neuroblastoma de alto risco (pacientes estágio 4 e pacientes maiores de um ano em estágio 1,2, 3 ou 4S e com *MYC* amplificado) e os randomizou em dois grupos: TAMO ou quimioterapia oral de manutenção com Ciclofosfamida. A sobrevida livre de eventos para 3 anos foi de 47% vs 31% ($p=0,0221$) com TMO e com QT respectivamente. Não foi significativo em relação a sobrevida total: 62% vs 53% ($p=0,0875$). O segundo estudo foi realizado com 167 crianças com neuroblastoma avançado. Houve diferença significativa na sobrevida livre de eventos de 5 anos ($P=0,01$) nos 48 pacientes maiores de 1 ano, estágio 4 ($33\% \times 17\%$).

Nenhum desses estudos, entretanto, constatou aumento significativo na sobrevida total, apesar da comparação ter sido feita em um dos estudos com quimioterapia oral de baixa dosagem²¹⁹ e no outro sem a utilização de tratamento complementar²²⁰.

Além disso, nessa análise, apenas os pacientes que apresentaram doença não progressiva, após o ciclo indutório, foram submetidos a TMO. Assim, 30% dos pacientes (160 dos 539 elegíveis) não puderam usufruir do benefício desse procedimento e ficaram fora dessa análise, em relação à evolução clínica²¹⁷.

2.9.3- MIBG

O Meta-iodo benzilguanidina (MIBG) pode ser utilizado de maneira também terapêutica²²¹. Nos tumores derivados da crista neural, ele é ativamente capturado via membrana celular e retido em grânulos secretórios citoplasmáticos, gerando uma elevada relação entre concentrações em tecido tumoral/não tumoral. A droga, associada a ^{131}I ou ^{123}I , vem sendo utilizada nessas neoplasias com finalidade de diagnóstico e terapêutica (nesse caso o ^{131}I). A captação específica de traçadores acoplados a agentes antineoplásicos, radioativos ou não, pode empregar outros veículos e, nesse sentido, ensaios preliminares empregando emulsões lipídicas livres de proteínas (LDE), acopladas à droga Carmustine, foram reportados entre nós²²².

Nesse sentido, duas linhas de investigação desenvolvem-se atualmente no Departamento de Pediatria da FMUSP, a primeira empregando MIBG acoplado a I^{131} , terapeuticamente, como modalidade de seleção celular (*"purging"*) *in vivo*, pré-coleta de células-tronco para transplantes autólogos de medula óssea. Já os ensaios pediátricos realizados colaborativamente entre o Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da FMUSP (Maranhão, R, Investigador Principal) e o Departamento de Pediatria da FMUSP, não revelaram resultados alentadores⁵.

2.9.4- Moduladores de genes de múltipla resistência a drogas

⁵ Ambos, publicações em preparo.

A resistência à quimioterapia é um problema comum na prática oncológica, denominado de resistência a múltiplas drogas (MDR). Vários mecanismos podem conferir resistência à célula neoplásica. O mais conhecido é o relacionado ao gene *MDRG1* (multidrug resistance gene). Esse gene codifica uma glicoproteína chamada Pgp 170, que age como uma bomba de efluxo ATP dependente, expulsando o quimioterápico das células, diminuindo assim sua concentração intracelular²²³. Vários estudos mostram correlação entre aumento da expressão da Pgp e pior prognóstico. Assim, muitos esforços vêm sendo feitos para modular a resistência a drogas¹⁷⁴.

MACHADO, avaliando o Verapamil como modulador de resistência a drogas em pacientes portadores de neuroblastoma avançado, encontrou taxa de resposta (remissão completa, resposta parcial, resposta parcial muito boa), após esquema indutório, de 71% e sobrevida livre de eventos e total de respectivamente 21,6% e 28,8%, num intervalo de 3 anos e 9 meses de observação. Também concluiu que os níveis de modulação de MDR são possíveis de serem atingidos em crianças submetidas a quimioterapia, através da infusão concomitante de Verapamil, com mínimos efeitos colaterais²²⁴.

2.9.5 - Atuação sobre substratos de crescimento

Uma estratégia que chegou a ser implantada em alguns programas de tratamento, aproveitava a necessidade obrigatória da presença de Fe para o crescimento das células neuroblastomatosas, e incluía agentes quelantes (deferroxamina) com o intuito de depletá-las desse agente essencial. As dificuldades de emprego regular de deferroxamina nesses pacientes foi o principal obstáculo a seu uso em maior escala. O novo programa cooperativo⁶ para o tratamento de neuroblastomas a ser proposto junto à Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica pretende estudar, aleatoriamente, o uso de

⁶ Coordenador: Odone Filho, V.

quelantes orais de Fe, em estratégia similar àquela empregada há mais de três décadas.

A terapia antiangiogênica tem demonstrado atividade em alguns modelos animais de neuroblastoma. Além disso, o conceito de terapia metronômica, (baseada na administração contínua de baixa dosagem de quimioterapia com objetivo de bloquear a proliferação das células endoteliais normais que estão em fase de crescimento rápido por estimulação tumoral) foi demonstrado em modelo animal de neuroblastoma²²⁵. Tem sido publicadas várias estratégias de terapêutica antiangiogênica em animais portadores de neuroblastomas, em associação ao uso de inibidores da tirosina quinase (como o Sunitinibe) (particularmente à demonstração de genes que a expressam), com inibição potente do crescimento tumoral e bloqueio de receptores tanto da célula tumoral, como da endotelial²²⁵.

2.9.6-Agentes Estimuladores da Diferenciação celular

Dimetilsulfóxido (DMSO) , AMP cíclico e ácido retinóico são substâncias capazes de induzir a diferenciação celular de neuroblastomas *in vitro*, com concomitante redução na proliferação celular e no nível de *MYCN*. Seu mecanismo básico de ação é ao nível de receptores celulares, com conseqüente alteração do DNA²²⁶⁻²⁷.

O ácido retinóico é um derivado da vitamina A e KHAN determinou sua dose máxima tolerada e farmacocinética em pacientes após TMO em crianças com neuroblastoma de alto risco, conseguindo atingir concentrações efetivas *in vitro*²²⁶⁻²⁷.

O 13-ácido- retinóico foi utilizado no protocolo do Children's Cancer Group de forma aleatória, conforme referido anteriormente, por 6 meses. O grupo

sorteado para recebê-lo apresentou melhor sobrevida livre de eventos em 5 anos²¹⁸.

2.9.7- Imunomodulação

Citocina, vacinas, anticorpos e terapêutica celular têm sido utilizados também como alternativa para pacientes com resistência a terapêutica convencional. O potencial dos tratamentos imunoterápicos na eliminação de doença residual mínima é há longo tempo conhecido em várias neoplasias humanas. Os ensaios com imunoterapia ativa dependem do retorno da imunocompetência do indivíduo e empregam anticorpos tumor-específicos, administrados com GM-CSF ou IL-2 e produtos de fusão de anticorpos com citocinas²²⁸. Como exemplo, tem-se obtido controle prolongado em crianças maiores de um ano com neuroblastoma estágio 4 com o emprego do anticorpo monoclonal anti-G_{d2} 3F8²²⁹, após quimioterapia agressiva e sem o emprego de mieloablação. Detalharemos abaixo as principais abordagens de imunoterapia.

2.9.7A- Citocinas

Interleucina 12 (IL-12) é um potente ativador de células NK e linfócitos T, ambas com participação na imunidade antitumoral²³⁰. Também promove o desenvolvimento da imunidade humoral através da estimulação das células CD4+. Seu papel na imunomodulação do neuroblastoma tem sido bastante estudado. SIAPATI²³¹, analisando células de neuroblastoma, concluiu que a IL-12 apresenta robusta resposta antitumoral, através da mediação de células CD4+ e CD8. Além disso, a combinação da IL-12 e a IL-2 potencializou o efeito antitumoral: 91% de inibição na associação vs 63% com IL-12 isolada²³¹. REDLINGER²³² propôs um mecanismo pela qual a IL-12 induz uma vigorosa resposta das células NK, levando a lise da célula tumoral. LINUMA²³³, em outro estudo, associou IL12 com a IL18, apresentando

amplificação da resposta do interferon-gama (sem metástases hepáticas em ratos com a associação e 50% de invasão hepática em ratos inoculados apenas com a IL12). Esses estudos indicam que a IL-12 apresenta um potente efeito antitumoral e que a associação com outras citocinas potencializa esse efeito, podendo ser utilizada para o tratamento das neoplasias. Entretanto, a combinação ideal de citocinas ainda não foi determinada.

2.9.7B- Vacinas

A imunização ativa tem a vantagem de desenvolver uma resposta imune duradoura antitumoral. Entretanto, há vários desafios para o desenvolvimento de uma vacina para neuroblastoma. Pacientes com tumores avançados tendem a ser imunocomprometidos em consequência da quimioterapia intensiva utilizada. Além disso, as células tumorais apresentam expressão baixa dos complexos de histocompatibilidade classe 1 (MHC) e beta2microglobulina, que são essenciais para a resposta imune T celular. Também secretam hormônios que causam imunossupressão, como o FasL, IL-10, TGF β , VEGF e gangliosídeos, que levam ao predomínio das células T helper Th2, promovendo a tolerância imunológica²³⁴⁻²³⁶. Entretanto, dados promissores pré-clínicos e resultados encorajadores em adultos geraram estudos Fase I em crianças. HUEBENER criou uma vacina, de utilização oral, direcionada para a enzima Tirosina-Hidroxilase (altamente expressa em neuroblastomas) com a utilização do transportador *Salmonella typhimurium*, que estimulava os receptores T. A administração dessa vacina diminuiu o crescimento tumoral e preveniu metástases para o fígado. A resposta imune foi específica para células de neuroblastomas e não houve infiltração na medula da adrenal, órgão com elevados níveis dessa enzima. Tal fato foi atribuído a falta de sinais inflamatórios na adrenal, para gerar a migração de células T para esse órgão²³⁷. GEIGER aplicou vacinas dendríticas em quinze pacientes com diferentes tipos de tumores sólidos. Nesse estudo, as células dendríticas eram colhidas por leucoferese e então cultivadas na presença de Fator

Estimulante de Colônia de Granulócito-Macrófago (GMCSF) e IL-4 objetivando aumentar a população celular. Essas células eram expostas aos antígenos das células da neoplasia. Os pacientes toleraram bem a aplicação da vacina e o maior efeito colateral foi a reação local: um dos pacientes teve resposta parcial e os outros cinco apresentaram doença estável. Em relação aos três pacientes de neuroblastoma do estudo, dois apresentaram doença estável após a vacinação²³⁸. CARUSO também desenvolveu estudo Fase I expondo células dendríticas ao RNA tumoral, mas não obteve melhora clínica²³⁹. BOWMAN, vacinando com células dendríticas cultivadas com IL-2, verificou poucos efeitos colaterais e três dos dez pacientes apresentaram resposta clínica a vacina (outros três que fizeram associação com etoposide oral tiveram resposta também). Esses estudos demonstram a possibilidade de utilização de vacinas em crianças com tumores sólidos. Tais vacinas são bem toleradas, mas não apresentam ainda resultados favoráveis significativos na sobrevida do neuroblastoma²⁴⁰.

O emprego dessas vacinas apresenta uma enorme dificuldade investigacional no que tange a sua utilização conforme os critérios clássicos de investigação. Isso porquê seu teoricamente maior benefício situa-se em pacientes com doença residual limitada, o que não é certamente o caso nas aplicações em estudos fase I, empregando pacientes refratários ou irresponsivos. Por sua vez, a paucidade de resultados em crianças com neuroblastoma avançado obriga ao emprego precoce de novas tentativas, excluídos apenas possíveis fenômenos tóxicos de maior intensidade. Assim, resultados preliminares revelando respostas transitórias e discretas em crianças submetidas a vacinas anti-tumorais com células dendríticas de apresentação antigênica alogênicas, sem toxicidade apreciável, verificadas em programa colaborativo entre o Instituto de Ciências Biológicas da USP (Barbutio, JA) e o Departamento de Pediatria da FMUSP, levou a sua utilização em primeira instância proposta para o novo programa colaborativo

em neuroblastomas a ser iniciado pela Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica⁷.

2.9.7C- Anticorpos Monoclonais

A maioria das drogas anti-neoplásicas cursam com toxicidade limitante por atuarem em vias metabólicas fundamentais para a célula tumoral e compartilhadas também por células sadias. Consequentemente, tem-se buscado o desenvolvimento de opções terapêuticas dirigidas especificamente às células neoplásicas, como os anticorpos monoclonais direcionados a antígenos expressos pelo tumor.

Os anticorpos monoclonais para antígenos tumorais específicos têm sido utilizados no tratamento de tumores, devido prolongada meia vida, baixa toxicidade e alta afinidade e especificidade. O efeito antitumoral do anticorpo pode ser ou não mediado pelo sistema imune. Mecanismos mediados pelo sistema imune incluem citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC); citotoxicidade mediada por complemento e a habilidade do anticorpo monoclonal alterar o ambiente das citocinas ou gerar a intensificação da resposta anti-tumoral. Efeitos não mediados pelo sistema imune correspondem ao bloqueio dos sinais de sobrevivência celular e também por associação a toxinas que destroem o tumor²⁴¹⁻²⁴². Em neuroblastomas, a terapia potencial é dirigida contra GD2, q é uniformemente expresso em suas células. Sua função não é completamente entendida, mas parece ter um papel importante na fixação das células tumorais na matriz protéica extracelular. A expressão de GD2 é encontrada em célula de sistema nervoso central, nervos periféricos, melanócitos, no estroma de alguns outros tecidos normais e na polpa branca do baço. Devido a relativa seletividade na expressão, combinada com sua presença na superfície celular, GD2 tem sido

⁷ Odone Filho, V, Coordenador.

um atrativo alvo para a terapia imune específica²⁴³⁻²⁴⁴ Vários anticorpos anti-GD2 tem sido desenvolvidos nas últimas duas décadas e os principais serão descritos abaixo:

-3F8 é um anticorpo murino monoclonal anti GD2 desenvolvido por Cheung. In vitro, estudos sugerem que a atividade anti-tumoral desse anticorpo é mediada pelo complemento, linfócitos, neutrófilos e monócitos. Em estudos fase I e II respostas modestas antitumorais foram observadas. Toxicidades observadas foram hipertensão (dose limitante), dor severa, febre e urticária²⁴⁵. Trinta e quatro pacientes foram tratados com 3F8 por mais de 4 ciclos, baseado no status da doença e níveis de anticorpos anti 3F8. Dos treze pacientes que ficaram livres da doença (seguimento de 40 a 130 meses), onze tinham doença confirmada antes do tratamento com 3F8. Tal resultado sugere benefício na terapêutica com 3F8²⁴⁶.

-14G2a também é um anticorpo murino monoclonal anti GD2. Em um estudo fase I, toxicidade observada incluiu dor, diarreia, hiponatremia, parestesia, hipotensão e reações alérgicas (febre, dispnéia, hipóxia, exantema). Resposta tumoral limitada, semelhante a 3F8, foi observada²⁴⁷.

-Ch14.18 corresponde a um anticorpo na qual a região Fc de um IgG1 se funde com a porção Fab do anticorpo murino 14G2a²⁴⁸. Em um estudo fase I com 9 crianças (idade de 2 a 10 anos) que receberam doses de 50mg/m² de ch14.18 por 5 dias, observou-se - como efeito colateral maior -a dor. Outros efeitos foram: febre, urticária, prurido, exantema. Duas crianças, que fizeram também uso de radioterapia, tiveram atrofia de nervo óptico, que reverteu após 6 meses. Dois dos participantes tiveram resposta total; dois com resposta parcial e um resposta mínima²⁴⁹. YU utilizou doses superiores desse anticorpo (200 mg², estudo fase I) em 10 pacientes portadores de neuroblastoma e um com osteossarcoma. Os principais efeitos colaterais observados foram: dor (severa em 5 pacientes), taquicardia, hipertensão, febre

e urticária. Dos dez pacientes elegíveis para avaliação de resposta, um apresentou resposta parcial, três respostas mistas e um doença estável²⁵⁰.

No estudo realizado pelo Cooperative German Neuroblastoma NB90 e NB97 para pacientes portadores de neuroblastoma avançado, ch14.18 foi administrado em pacientes na fase de manutenção. Dos 330 pacientes avaliáveis para esse estudo, 166 receberam o anticorpo ($20 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$, 5 dias, a cada 2 meses num total de 6 cursos), 99 quimioterapia de baixa dosagem por um ano e 65 nenhuma terapia, após tratamento inicial. Apesar de não ter sido observada diferença significativa na sobrevida livre de eventos entre os três grupos, houve diferença na sobrevida total de 3 anos: $68,5 \pm 3,9\%$ (ch14.18); $56,6 \pm 5\%$ (terapia de manutenção) e $46,8 \pm 6,2\%$ (sem nenhuma terapia)²⁵¹.

Em um estudo do COG, fase I, foi administrado ch.14.18 com GM-CSF, após transplante autólogo de medula óssea, em 19 pacientes com neuroblastoma. A dose utilizada foi de $40 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ por 4 dias com GM-CSF ($250 \text{ } \mu\text{g/m}^2/\text{dia}$), iniciada três dias antes e continuada por três dias após. Dez dos 19 pacientes apresentaram doença progressiva, com um seguimento médio de 40 meses.

As imunocitocinas (fusão da terminação Fc do anticorpo monoclonal com a citocina) foram desenvolvidas objetivando aumentar a eficiência do anticorpo, minimizando os efeitos colaterais. O anticorpo, ao ligar-se ao tumor, carrega as altas concentrações de citocina e gera um ambiente favorável para atrair células do sistema imune, que destroem o tumor.

Estudos Fase I com hu14.18-IL2 foram conduzidos pelo COG em crianças (27 com neuroblastoma e uma com melanoma). Toxicidade observada foi de febre, calafrios, prurido, hiperglicemia, hipopotassemia e neuropatia. Não foi observado nenhum tipo de resposta clínica nesse estudo²⁵². SHUSTERMAN

desenvolveu estudo fase II objetivando testar o hu14.18-IL2 em pacientes com neuroblastoma. Trinta e nove pacientes receberam 12 mg/m² hu14.18-IL2 por três dias consecutivos a cada 28 dias e foram avaliados através de doença mensurável com critérios radiológicos ($n=12$) ou MIBG ou histologia de medula óssea ($n=23$). Nenhuma resposta foi observada nos pacientes com critérios radiológicos; no segundo grupo cinco pacientes tiveram uma resposta completa, sugerindo um benefício dessa terapêutica em doença residual mínima. Os efeitos colaterais foram reversíveis (dor, exantema, reações alérgicas, febre e hepatite trans-infecciosa). Dois pacientes necessitaram de dopamina e um necessitou suporte ventilatório devido hipóxia²⁵³.

2.9.7D -Terapêutica celular

Na década de 80, transplantes alogênicos de medula óssea em pacientes com neuroblastoma foram executados sem sucesso, devido alta taxa de mortalidade associada a reação hospedeiro versus enxerto (GvHD). Entretanto, estudos posteriores feitos em adultos demonstraram a presença de reação de hospedeiro vs tumor também (GvT). Tal fato gerou novo interesse na terapia celular para pacientes portadores de neuroblastoma, especialmente devido ao desenvolvimento do suporte clínico avançado e também na observação que pode ocorrer GvT, na ausência de transplante alogênico (há antígenos exclusivos do tumor ou maior expressão de um antígeno no tumor, em relação a um tecido normal).

Dois estudos da metade da década de 90 sugeriram que o transplante alogênico (ALHSCT) não é superior ao transplante autólogo (AUHSCT), que é a modalidade atualmente mais utilizada. LADENSTEIN estudou 17 pacientes portadores de neuroblastoma avançado submetidos a ALHSCT e 34 a AUHSCT correlacionando com a sobrevida e concluiu não haver diferença significativa na sobrevida livre de eventos: 35% versus 41%, em dois anos. Somente nove dos pacientes submetidos a ALHSCT apresentaram GvHD (7

com grau I/II e 2 com grau IV). Os autores especularam que a ausência de GvHD em crianças jovens seja o maior obstáculo para se obter a GvT em ALHSCT²⁵⁴. MATTHAY, no mesmo ano, avaliou 56 pacientes portadores de neuroblastoma avançado, que receberam terapia de indução semelhante e transplante medula óssea (ALHSCT: 20; AUHSCT: 36) com irradiação corpórea total. Quatro pacientes submetidos a ALHSCT apresentaram morte secundária ao tratamento, enquanto três pacientes que foram tratados com AUHSCT tiveram óbito pelo mesmo motivo. A taxa de recidiva entre os pacientes tratados com ALHSCT foi de 69% comparados com 46% dos pacientes AUHST ($P=0,14$). A sobrevida livre de eventos de 4 anos após TMO foi de 25% para o grupo ALHSCT e 49 % para pacientes AUHST ($P= 0,051$). A sobrevida total foi similar para ambos grupos²⁵⁵.

Os transplantes haploidênticos, com um doador com características análogas em apenas um dos haplótipos do HLA, tem sido também estudados em neuroblastomas resistentes, com resultados promissores. INUOE reportou o caso de um menino de cinco anos que recebeu um transplante CD34 haploidêntico de seu pai, como parte de um tratamento de neuroblastoma refratário avançado. A criança apresentava, após transplante, doença residual em linfonodos para-aórticos e múltiplas metástases ósseas. Ele desenvolveu GvHD I, mas não apresentou sintomas de GvHD crônica ou outra complicação. Toda doença residual desapareceu completamente e o paciente ficou livre da doença por três anos, sugerindo efeito da reação tumor versus hospedeiro²⁵⁶. LANG estudou 6 pacientes com doença avançada portadores de neuroblastoma e sarcoma de Ewing, que após AUHSCT, receberam CD3/CD19 depletados de hospedeiros haploidênticos. Não houve mortalidade relacionada ao transplante e a sobrevida média foi de seis meses, apesar de tais dados serem de interpretação limitada, devido ao pequeno número de pacientes com doença muito avançada. A análise da função de células NK mostrou-se estável contra K56, enquanto a atividade contra células de neuroblastoma foi baixa²⁵⁷. Mais recentemente, YOSHIDA reportou o caso de

um menino de sete anos com neuroblastoma recidivado em medula óssea, que recebeu infusão de linfócito CD4 (+) seguido de transplante haploidênticos de sua mãe. A doença apresentou resposta clínica transitória, com redução do tumor e diminuição dos níveis de neuroenolase. A resposta foi associada com o surgimento de febre alta constante e aumento dos linfócitos T circulantes²⁵⁸.

2.10-Detecção precoce da doença ou “*screening*”

Fundamenta-se no conceito de que os pacientes com neuroblastoma diagnosticado no primeiro ano de vida e com doença localizada têm excelente prognóstico. Desse modo, o diagnóstico da neoplasia nessas condições seria a situação ideal. Os neuroblastomas são produtores de catecolaminas, cujos metabólitos são detectáveis na urina em mais de 95% dos pacientes. Através do método de cromatografia a gás, é possível detectar a presença desses metabólitos na urina, obtida de lactentes aos 6 meses de idade, permitindo o rastreamento da doença em grandes massas populacionais²⁵⁹.

Em 1973, SAWADA²⁶⁰ iniciou na cidade de Kyoto (Japão) um programa de rastreamento em lactentes de 6 meses de idade. Avaliando 282.000 lactentes, diagnosticou 16 casos pré-sintomas e outras 6 crianças desenvolveram neuroblastoma 14 a 29 meses após um teste negativo. Concluiu haver uma melhoria da sobrevida global dos pacientes com neuroblastoma, menos doença metastática e aumento na incidência da doença.

Em Sapporo, NISHI²⁶¹ demonstrou diminuição na mortalidade por neuroblastoma após a implantação do rastreamento, mas a incidência da neoplasia manteve-se inalterada, exceto na faixa de 1 a 4 anos, na qual foi menor.

Em Saitama, não ocorreu redução da incidência e dos tumores avançados. Os tumores detectados por rastreamento tinham características biológicas menos agressivas que aqueles cujo diagnóstico é clínico²⁶².

O Quebec Neuroblastoma Screening Project avaliou de maio 89 a abril de 1994, 476.654 lactentes de 3 semanas a 6 meses de idade em uma área canadense onde foi feito o rastreamento e comparou com outras populações semelhantes nascidas no mesmo período e não submetidas ao rastreamento. Concluiu que o rastreamento não reduz a mortalidade²⁶³.

Conclusão semelhante foi obtida pelo German Neuroblastoma Screening Project. Entre julho de 1994 e outubro de 1999, 1.475.773 crianças com 1 ano de idade foram submetidas ao rastreamento pra neuroblastoma. Não houve redução da mortalidade em relação ao grupo não rastreado; houve número semelhante de crianças com doença estágio 4 e aumento da incidência de crianças com neuroblastoma²⁶⁴.

YAMAMOTO observou que esse aumento na incidência de neuroblastomas nos vários rastreamentos seriam consequência de tumores que espontaneamente regrediriam, sem necessidade de tratamento²⁶⁵.

Em resumo, não há evidências concretas de que a detecção precoce de neuroblastomas diminua a ocorrência de formas avançadas em maior idade, justamente o desejado objetivo maior desta intervenção, em função do péssimo prognóstico dessas formas. Esse dado, adicionalmente, favorece a interpretação de que os neuroblastomas não progridam evolutivamente, de modo necessário, de um estágio a outro mais avançado: cada forma surgiria como tal, já ao momento da apresentação. Isso é corroborado, igualmente, por crianças cujo “*screening*” havia sido negativo, e que em maior idade vieram a desenvolver formas avançadas de neuroblastoma.

2. OBJETIVOS

Fundamentados na necessidade de reconhecermos elementos de prognóstico que possam depender, fundamentalmente, da análise clínica dos pacientes, respeitando as dificuldades existentes em países como o nosso para o emprego indiscriminado de técnicas laboratoriais sofisticadas e custosas, os seguintes objetivos analíticos foram estabelecidos:

- 1) Estudar quadro clínico, aspectos epidemiológicos e características laboratoriais, genéticas, histológicas de neuroblastomas disseminados em crianças maiores de um ano, submetidas ou não à transplante de medula óssea.
- 2) Relacionar a evolução clínica com as variáveis referidas acima, tentando definir fatores de risco que possam influir na sobrevida .
- 3) Definir fatores preditivos para a indicação de transplante de medula óssea em pacientes portadores de neuroblastoma avançado.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

Esse estudo engloba os pacientes maiores de um ano admitidos no Instituto de Tratamento do Câncer Infantil do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (ITACI) com diagnóstico de neuroblastoma disseminado (estádio 3 e 4 - classificação INSS), no período de 1 de janeiro de 1997 a 1 de dezembro de 2007. Incluímos assim todos os pacientes com seguimento clínico de mais de dois anos, submetidos a quimioterapia com derivados de platina e com previsão de transplante de medula óssea, ao apresentarem boa resposta terapêutica inicial.

Acompanhamento da evolução clínica desses pacientes e levantamento de prontuários, com a análise dos seguintes fatores prognósticos analisados abaixo:

3.1- Características clínicas:

- *Estadiamento*: conforme o Estadiamento Internacional para Neuroblastomas (INSS) previamente descrito;
- *Sexo*: (masculino/feminino);
- *Raça*: (branco/pardo/negro/indígena);
- *Idade*: idade no momento do diagnóstico;
- *Duração de sinais e sintomas* atribuíveis à moléstia.
- *Estado nutricional*: conforme os critérios de Waterlow (crianças de 2 a 10 anos) e Gomez (crianças menores de 2 anos)²⁶⁶. Essa classificação é a utilizada oficialmente pela Sociedade Brasileira de Pediatria.

3.2- Características laboratoriais ao diagnóstico:

- Ácido Vanilmandélico urinário (VMA),
- Ferritina sérica,
- Desidrogenase láctica (DHL)
- Hemoglobina sanguínea (reflexo de cronicidade e agressividade da doença, apesar de todas suas limitações em associá-la exclusivamente à moléstia básica).

3.3 – Características da neoplasia:

- *Dimensões do tumor primário*: calculado através do produto dos três maiores diâmetros tumorais obtidos através do exame de Tomografia Computadorizada.
- *Localização do tumor primário* (cervical/torácico/abdominal não adrenal/supra-renal/pélvico/outras localizações/desconhecido).

- *Localização e sítios das metástases*
- *Classificação histológica de Shimada*: (favorável/desfavorável).
- *Variáveis genéticas*: presença ou não de amplificação do *MYCN*

3.4 – Características da terapêutica e evolução:

- *Aspectos terapêuticos*: (cirurgia/quimioterapia/radioterapia/ transplante de medula óssea, MIBG terapêutico, outras).
- *Ressecabilidade* do tumor primário através da cirurgia realizada no momento do diagnóstico ou retardada (biópsia/subtotal/total).
- *Remissão* (remissão completa/ remissão parcial/ sem remissão, aqui sendo incluídas também progressão de doença).
- *Recidivas*

Os fatores de prognóstico serão avaliados em relação a três parâmetros: índice de óbitos, sobrevida total e sobrevida livre de eventos.

4. METODOLOGIA DA ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente realizamos uma análise descritiva dos dados. Para as variáveis quantitativas, esta análise foi feita através do cálculo de médias e desvio-padrão. Para as variáveis qualitativas, calculamos frequências absolutas e percentuais.

As expectativas de sobrevida total e livre de eventos foram avaliadas através da curva de sobrevida de Kaplan-Meier. Esse método permite a construção de curvas com as estimativas das probabilidades de sobrevivência em função do tempo de observação²⁶⁷. Após confeccionarmos curvas de sobrevida total e livre de eventos, separadamente fizemos o mesmo para cada variável com a finalidade de avaliar a influência de cada uma delas no resultado.

Utilizamos como pontos de corte nas curvas de sobrevida a medida da mediana. Tal escolha é consequência da observação de pontos “outliers” nas mensurações realizadas que podem influir no valor da média.

No estudo multivariado dos fatores em relação ao tempo de sobrevida foi ajustado o Modelo de Regressão de Cox com processo de seleção de variáveis stepwise. Nesse modelo, a importância de cada variável é medida, considerando todos os efeitos, isto é, o efeito calculado para uma variável é corrigido pela influência de outras variáveis²⁶⁷.

Todos os testes foram realizados admitindo-se o nível de significância de 5 %.

5. RESULTADOS

No período de 1 de janeiro de 1997 a 1 de dezembro de 2007, foram admitidos na Unidade de Onco-Hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 160 pacientes portadores de neuroblastoma. Cinquenta e três crianças, que apresentavam doença disseminada (estádio 3,4 INSS), idade superior a um ano ao diagnóstico e sem tratamento prévio, tiveram a evolução devidamente documentada e representaram a população alvo desse estudo. A tabela 14 descreve os vinte e três pacientes submetidos a transplante de medula óssea (TMO) e a tabela 15 os trinta pacientes não submetidos à TMO admitidos nesse estudo.

Tabela 14- Pacientes maiores de um ano admitidos no ICR-HC com neuroblastoma estágio 3 e 4 (INSS), submetidos a TMO

	nome	D. diag.	S,C,I	Localização	Estad.	Cirurgia Inicial	Second Look	Protocolo	Evolução	ST
1	A.F.P	13/05/03	M,B,53	SR	4	Bx	RC	NB2000	óbito	20m
2	A.S.S.	22/10/03	F,P,26	SR	4	MO	RC	NB2000	VSD	
3	C.S	13/07/01	M,P,28	SR	4	MO	RC	NB2000	óbito	29m
4	F.A.C.G.	11/11/03	M,P,25	ABD	4	RC	RC	NB2000	óbito	26m(sep)
5	F.M.C.G.	05/10/00	F,B,66	MEDIAST	4	MO	NF	NB2000	VSD	
6	F.R.V	09/08/05	M,B,15	ABD	4	RC	NF	NB2000	VSD	
7	G.M. L.	30/10/02	M,B,36	SR	4	Bx	RC	NB2000	óbito	48m
8	J. M.S.	26/02/07	F,B,71	ABD	4	Bx	RI	NB2000	VSD	
9	J.S.R.	30/05/05	F,B,87	SR	4	Bx	RC	NB2000	VCD	
10	J.A.S.M.	30/03/99	M,B,67	MEDIAST	4	MO	RC	VIII97	óbito	50m
11	J.G.L.F.	19/01/04	F,B,18	SR	4	RI	RC	NB2000	VSD	
12	J.L.M.N.	02/02/07	F,B,21	SR	4	RC	NF	NB2000	VSD	
13	K.B.O.	19/02/04	M,P,13	SR	3	RC	NF	NB2000	VSD	
14	L.I.S.F.	24/05/06	F,B,57	MEDIAST	4	Bx	RC	NB2000	óbito	39m
15	L.N.B.	10/01/01	F,A,32	OUTROS	4	Bx	RI	VIII97	óbito	37m
16	L.O.	13/07/98	F,B,36	SR	4	Bx	RI	VIII97	óbito	25m (sep)
17	L.M.R.R.	01/06/02	M,B,56	SR	4	MO	RI	NB2000	óbito	35m
18	M.R.B.	05/03/04	F,B,72	SR	4	Bx	RC	NB2000	óbito	68 M
19	P.K.B.M.	30/07/99	F,B,76	SR	4	Bx	RC	VIII97	óbito	27m
20	V.R.M.	12/01/07	M,B,43	ABD	4	MO	RI	NB2000	VCD	
21	V.J.C.	1/8/2002	M,B,33	SR	4	MO	RC	NB2000	VSD	
22	V.C.B.	16/1/2002	F,P,36	SR	4	Bx	RC	NB2000	óbito	65m (LMA)
23	Y.S.S.	19/12/2001	F,B,21	ABD	4	RI	RC	NB2000	óbito	31m (sep)

D.diag=data do diagnóstico; I=idade ao diagnóstico (em meses); S=sexo; C=cor; F=feminino; M=masculino; B=branco; P=pardo; A=amarelo; ABD: abdominal; SR=supra-renal; MEDIAST=mediastino; Estad.=estádio; RI=resssecção incompleta; RC=resssecção macroscópica completa do tumor; Bx=biópsia VSD =vivo sem doença; VCD=vivo com doença; S.T.= tempo sobrevida total; NB2000=Protocolo Neuro-IX-2000; VIII97= Protocolo NeuroVIII-1997; m=mês; sep=septicemia

Tabela 15- Pacientes maiores de um ano admitidos no ICR-HC com neuroblastoma estágio 3 e 4 (INSS), não submetidos a TMO.

nº	nome	D. diag	S,C,I	Localização	Estad	Cirurgia	Second	Protocolo	Evolução	ST
						Inicial	Look			
1	A.P.S	17/03/85	M,B,188	MEDIAST	4	Bx	RI	VIII97	óbito	7 m sep
2	A.L.S.	10/04/96	F,B,31	ABD	4	Bx	NF	VIII97	óbito	12m sep
3	A.C.R.	23/09/92	F,P,63	SR	4	Bx	NF	VIII97	óbito	16m
4	C.C.D.	29/01/97	F,P,66	ABD	3	Bx	RC	NB2000	VSD	
5	C.M.T.L.	16/06/97	F,B,50	ABD	4	Bx	NF	VIII97	óbito	0,5m sep
6	C.R.S.	19/01/01	F,P,18	MEDIAST	4	RC	RC	NB2000	VSD	
7	D.S.B.	05/01/94	F,A,53	SR	4	Bx	NF	VIII97	óbito	8m sep
8	E.N.L.	19/10/97	F,P,29	SR	4	Bx	NF	VIII97	óbito	11 m
9	F.P.S.	13/09/99	M,B,33	SR	4	Bx	RI	VIII97	óbito	10 m
10	M.G.C.S.	10/01/01	F,B,26	ABD	3	RI	RI	NB2000	VSD	
11	G.S.P.	18/11/02	F,B,83	SR	4	Bx	NF	NB2000	óbito	7 m
12	G.M.C.F.	04/05/00	M,B,88	SR	4	Bx	RI	NB2000	óbito	18m
13	J.O.S.	23/06/95	M,P,33	SR	3	RC	NF	VIII97	VSD	
14	K.A.S.S.	21/05/98	M,B,13	PELVE	4	MO	RC	VIII97	VSD	
15	L.M.S.	20/03/96	M,B,44	SR	4	MO	RC	VIII97	óbito	23m
16	L.V.B.R.S.	20/11/95	M,B,32	SR	3	Bx	RI	VIII97	óbito	7 m
17	L.R.F.	15/05/99	F,B,24	SR	4	Bx	NF	NB2000	óbito	13 sep
18	L.B.D.S	09/12/03	F,P,19	SR	4	Bx	RI	NB2000	óbito	26 m
19	L.B.S.	20/02/01	M,P,78	ABD	4	Bx	RI	NB2000	VCD	
20	L.S.P.	27/05/97	M,P,20	SR	4	Bx	NF	VIII97	óbito	15m
21	M.L.R.	18/09/93	F,B,78	SR	4	Bx	NF	VIII97	óbito	14m
22	M.C.V.	03/11/95	M,P,32	SR	4	Bx	NF	VIII97	óbito	3m sep
23	M.O.S.	26/04/95	F,B,43	SR	4	Bx	NF	VIII97	óbito	7 m
24	M.V.L.B.	06/02/97	M,B,22	SR	3	Bx	NF	VIII97	óbito	1m sep
25	N.B.A.	10/07/00	F,B,59	SR	4	Bx	NF	NB2000	óbito	13 m
26	R.G.	04/02/87	M,B,172	SR	4	RI	RC	VIII97	óbito	100m
27	R.F.M.	28/09/92	M,B,53	ABD	4	MO	NF	VIII97	óbito	3 m
28	V.L.P.G.	16/12/03	M,B,31	SR	4	Bx	RI	NB2000	óbito	25m
29	V.S.L	25/05/97	M,B,61	SR	4	Bx	NF	NB2000	óbito	6m
30	Y.B.S	13/05/96	F,B,64	PELVE	4	Bx	RI	VIII97	óbito	24 m

D.diag=data do diagnóstico; I=idade ao diagnóstico (em meses); S=sexo; C=cor; F=feminino; M=masculino; B=branco; P=pardo; A=amarelo; ABD: abdominal; SR=supra-renal; MEDIAST=mediastino; Estad.=estádio; RI=ressecção incompleta; RC=ressecção macroscópica completa do tumor; NF= não feito; Bx=biópsia; VSD=vivo sem doença; VCD=vivo com doença;

S.T.= tempo sobrevida total; NB2000=Protocolo Neuro-IX-2000; VIII97= Protocolo NeuroVIII-1997; sep=septicemia; m=mês.

Segue abaixo a análise descritiva dos dados.

6.1) Caracterização clínica ao diagnóstico

6.1a) *Estadiamento*

Quarenta e sete pacientes (88,7%) encontravam-se em estágio 4 e seis (11,3%) em estágio 3, conforme classificação INSS.

6.1b) *Sexo*

Vinte e oito (52,8 %) pacientes pertencentes ao sexo feminino e vinte e cinco (47,2%) ao masculino.

6.1c) *Cor*

Trinta e sete (69,8%) brancos, quatorze (26,4%) pardos e dois (3,8%) amarelos.

6.1d) *Idade ao diagnóstico*

A idade média ao diagnóstico foi de 49 ± 34 meses. Idade com variação mínima de 13 meses e máxima de 188 meses. Mediana de 36 meses.

A figura 6 reflete a distribuição etária ao diagnóstico.

Figura 6- Distribuição de pacientes com neuroblastoma avançado segundo a idade (em anos) ao diagnóstico.

6.1e) *Tempo de sinais e sintomas atribuíveis à doença*

O tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de $2,2 \pm 1,5$ meses e variação de 5 dias a 7 meses.

6.1f) *Estado nutricional*

Trinta e quatro (64,1%) crianças eutróficas, dezessete (32,1%) com desnutrição proteico-calórica e dois (3,8%) obesos.

6.2) **Caracterização laboratorial ao diagnóstico**

6.2a) *Ácido Vanilmandélico (VMA)*

A dosagem urinária do metabólito da catecolamina VMA foi obtida em 50 pacientes. A média obtida foi de $29,8 \pm 31,2$ mg/g; mediana: 21,5 mg/g. Valor máximo obtido: 183 mg/g de creatinina.

6.2b) *Ferritina sérica*

Os níveis séricos de ferritina foram avaliados em 37 pacientes. Média: $392,4 \pm 320,5$ n/ug/l. Mediana: 334 n/ug/l.

6.2c) *Desidrogenase láctica (DHL)*

As dosagens séricas de DHL, avaliadas em todos pacientes, variaram de 178 U/L a 8799 U/L. Média calculada foi de 1765 ± 1965 U/L; mediana: 1028 U/L.

6.2d) *Hemoglobina sérica*

Os níveis séricos em 51 pacientes variaram de 5,4 a 13,1 g/dL. O valor médio calculado foi de $9,0 \pm 1,9$ g/dL. Mediana: 8,6 g/dL.

6.3- Caracterização do tumor ao diagnóstico

6.3a) *Dimensões do tumor primário*

Obtivemos, através de tomografia computadorizada, o produto dos três maiores diâmetros tumorais, ao diagnóstico, em 50 crianças. As medidas variaram de 20 cm^3 a 5148 cm^3 . Média de $571,2 \pm 876,8 \text{ cm}^3$. Mediana: 269 cm^3 .

6.3b) *Localização do tumor primário*

Trinta e quatro pacientes (64,1%) apresentavam tumor de origem supra-renal, sendo 20 do lado esquerdo e 14 do lado direito. Os tumores de outras localizações originavam-se: 5 (9,4%) do mediastino, 11 (20,8%) do abdômen 2 (3,8%) da pelve e 1 (1,9%) em região nasofaríngea.

6.3c) *Shimada*

Vinte e oito (62,2%) pacientes com prognóstico desfavorável em relação aos critérios de Shimada e dezessete (37,8%) favorável, no universo de 45 pacientes estudados.

Não foi possível avaliar os critérios de Shimada em oito pacientes.

6.3d) *MYCN*

Em 40 pacientes, observamos 13 (32,5%) amplificações.

6.3e) *Metástases*

Trinta e três (62,3%) apresentaram metástase em linfonodos ao diagnóstico (11 ipsilateral e 22 contralateral). Quarenta e dois (79,2%) em ossos. Trinta (56,6%) na Medula óssea e três (5,7%) no fígado.

6.4- Características da terapêutica e evolução

6.4a) *Cirurgia inicial*

Seis (11,3%) pacientes submetidos à ressecção completa, quatro (7,5%) a ressecções incompletas, trinta e três (62,3%) à biópsias devido ao grande tamanho do tumor, e dez (18,9%) à biópsia de medula óssea.

6.4b) “*Second look*” (“*cirurgia retardada*”)

Trinta e três pacientes (62,3%) foram submetidos a “*second look*”. Quatorze (42,4%) com ressecção incompleta e dezenove (57,6%) com ressecção completa.

6.4c) *Terapêutica*

Trinta (56,6%) pacientes foram submetidos quimioterapia com NB2000 e vinte e três (43,4%) a NeuroVIII 97.

Em trinta e três (62,3%) pacientes esta terapêutica foi complementada com radioterapia e/ou MIBG e/ou Ácido Retinóico.

6.4d) *Transplante de Medula óssea (TMO)*

Vinte e três (43,4%) pacientes foram submetidos à TMO.

6.4e) *Evolução clínica*

Trinta e sete (69,8%) crianças evoluíram para óbito. Destas, vinte e seis pela doença e onze por intercorrências (10 por sepsis).

A realização de transplantes autólogos de medula óssea objetiva melhorar a sobrevida de pacientes oncológicos, mas somente pacientes que conseguem entrar em remissão clínica, teriam tal indicação. Reconhecer os fatores que levam a um paciente apresentar boa resposta inicial terapêutica, indicando o transplante é de extrema importância para a abordagem do paciente com neuroblastoma disseminado. Assim, descreveremos nas tabelas abaixo as características individualizadas comparativas entre pacientes submetidos ou não a transplante de medula óssea (TMO).

Tabela 16- Características clínicas dos pacientes maiores de um ano com neuroblastoma disseminado, conforme a terapêutica com ou sem TMO.

Características	Resultados pacientes com TMO				Resultados pacientes sem TMO			
	%	Média/DP	Mediana	N	%	Média/D P	Mediana	N
Idade do diagn. (m)		43,0/22,1 (13/87)	36	23		53,5/40,4 (13/188)	43,5	30
Duração sintomas (m)		2,18/1,54 (0,25/7,00)	2	23		2,29/1,57 (0,16/7)	2	30
Estádio clínico (INSS)								
	%			N	%			N
3	4,35			1	16,67			5
4	95,65			22	83,33			25
Total	100,0			23	100			30
Cor								
branca	73,91			17	66,7			20
não branca	26,09			6	33,3			10
Total	100			23	100			30
Sexo								
	%			N	%			N
masculin	43,48			10	50			15
feminino	56,52			13	50			15
Total	100			23	100			30
Estado nutricional								
	%			N	%			N
eutrófico	69,56			16	60			18
Obes.	8,7			2	0			0
DPC	21,74			5	40			12
Total	100			23	100			30

DP=desvio padrão; m=meses; diagn= diagnóstico; DPC=desnutrição protéico-calórica.;
masculin= masculino

Tabela 17- Características laboratoriais dos pacientes maiores de um ano com neuroblastoma disseminado, com ou sem TMO.

Característica	Pacientes com TMO				Pacientes sem TMO			
	N	%	Média/DP (limite)	Mediana	N	%	Média/DP	Mediana
VMA(mg/g/Cr)			22,6/14,9 (2,34/59,00)	20,85			35,5/38,9 (1,2/183,0)	23,1
<9	5	22,7			5	17,9		
>9	17	77,3			23	82,1		
Total	22	100,0			28	100,0		
DHL (U/l)			1403/2039 (235/7927)	865			2043/1893 (178/8799)	1401
<480	6	26,1			2	6,7		
>480	17	73,9			28	93,3		
Total	23	100			30	100		
Ferritina(n/ug/l)			441,4/316,6 (49/1304)	392			320,5/323,2 (3/1077)	226
<140	4	18,2			6	40		
>140	18	81,8			9	60		
Total	22	100			15	100		
Hb (g/dL)			9,14/1,79 (6,6/13,1)	8,75			8,86/2,01 (5,4/12,6)	8,5
>11,0	4	17,4			6	21,4		
<11,0	19	82,6			22	78,6		
Total	23	100			28	100		

DP= Desvio-padrão; Cr=Creatinina; DHL= Desidrogenase láctica;

Hb= Hemoglobina sérica; VMA= Ácido Vanil-Mandélico

Tabela 18- Características tumorais dos pacientes com ou sem TMO

Características	pacientes com TMO			pacientes sem TMO		
	%	Média/DP Mediana	N	%	Média/DP Mediana	N
Dimensões do tu		331,4/300,7 (20-1120) 197	23		775,5/1131 (28-5148) 364	27
Localização do tu	%		N	%		N
abdominais adrenais	60,9		14	66,6		20
abdominais	21,7		5	20		6
mediastino	13		3	6,7		2
pelve	0		0	6,7		2
outros	4,4		1	0		0
Total	100		23	100		30
Meta ganglionares	%		N	%		N
ipsilateral	21,7		5	20		6
contralateral	47,9		11	36,7		11
desconhecido	8,7		2	3,3		1
não comprometido	21,7		5	40		12
Total	100		23	100		30
Meta ósseas	%		N	%		N
Sim	91,3		21	83,3		25
Não	8,7		2	16,7		5
Total	100		23	100		30
Metástases ósseas por seguimento						
apendicular	69,6		16	50		15
coluna	43,5		10	20		6
crânio	73,9		17	33,3		10
bacia	26,1		6	30		9
arco costal	30,4		7	26,7		8
Meta Medula óssea	%		N	%		N
Sim	60,9		14	53,3		16
Não	39,1		9	46,7		14
Total	100		23	100		30
Meta Fígado	%		N	%		N
Sim	0		0	10		3
Não	100		23	90		27
Total	100		23	100		30

Tabela 19- Características microscópicas tumorais dos pacientes maiores de um ano portadores de neuroblastoma disseminado, conforme a terapêutica com ou sem TMO.

Características Microscópicas	TMO		Sem TMO	
	%	N	%	N
<hr/>				
Shimada	%	N	%	N
favorável	47,4	9	30,8	8
desfavorável	52,6	10	69,2	18
Total	100	19	100	26
<hr/>				
MYCN	%	N	%	N
amplificado	23,5	4	39,1	9
não amplificado	76,5	13	60,9	14
Total	100	17	100	23
<hr/>				

Tabela 20- Características terapêuticas dos pacientes maiores de um ano portadores de neuroblastoma disseminado, conforme a terapêutica com ou sem TMO.

	Pacientes com TMO		Sem TMO	
Características	N	%	N	%
Quimioterapia				
NeuroVIII97	4	17,4	19	63,3
Neuro2000	19	82,6	11	36,7
Total	23	100,0	30	100
Cirurgia inicial				
biópsia MO	7	30,4	3	10
biópsia Tumor	10	43,5	23	76,6
ressecção completa	4	17,4	2	6,7
Ressec. incompleta	2	8,7	2	6,7
Total	23	100,0	30	100
Segunda cirurgia				
ressecção completa	14	60,9	5	16,7
ressec incompleta	5	21,7	9	30
não realizada	4	17,4	16	53,3
Total	23	100,0	30	100

Ressec=ressecção MO=medula óssea

Sabendo-se que, apenas pacientes que entram em remissão clínica são elegíveis para TMO, enumeraremos abaixo as características que estatisticamente diferenciam ambos grupos:

- Pacientes submetidos a TMO diferem em relação as metástases ósseas, observando-se maior percentagem de casos com metástases no crânio do que o grupo sem TMO ($P=0,003$) e também associação tendenciosa de maior percentagem de metástases em coluna, em relação ao outro grupo ($P=0,065$).
- Pacientes submetidos a TMO apresentam associação tendenciosa ($P=0,082$) de menor percentagem de biópsias tumorais, na abordagem inicial do tumor, em relação ao grupo não submetido a TMO.
- O grupo de pacientes de TMO diferem em relação a cirurgia de “*second look*”. O grupo sem TMO apresenta maior percentagem de casos não realizados e a população submetida a TMO apresenta maior percentagem de casos com ressecção completa ($P=0,003$).
- Os grupos submetidos a TMO diferem em relação ao DHL, ao apresentar valor significativamente menor ($P=0,0201$), quando comparado ao grupo sem TMO.
- Os grupos também diferem em relação ao tipo de tratamento. Crianças tratadas com TMO apresentam número significante maior de casos matriculados no Protocolo Neuro2000. O outro grupo dos não transplantados, por sua vez, maior número de matrículas no Neuro VIII97 ($P=0,001$). Também se observa maior exposição a radioterapia ($P=0,001$) e Ácido Retinóico ($P=0,001$) no grupo dos transplantados.

A tabela 21 resume as informações referidas acima.

Tabela 21- Análise univariada de fatores prognósticos entre (com e sem TMO).

Análise univariada comparativa entre pacientes com e sem TMO			
N			
<u>Características clínicas</u>	Qui quadrado/ Z	p	teste
Idade diagnóstico		0,5778	Mann-Whitney
Estadiamento		0,217	Fisher's E Test
Duração dos sintomas		0,8692	Mann-Whitney
Raça		0,773	Fisher's E Test
Sexo	0,222	0,637	
Estado nutricional		0,148	Fisher's E Test
<u>Características do tumor</u>	Qui quadrado/ Z	p	teste
Tamanho do tumor		0,1582	Mann-Whitney
Localização tumor		0,620	Fisher's E Test
Shimada		0,521	Fisher's E Test
MYCN		0,568	Fisher's E Test
<u>Metástases</u>			
Metástases ganglionares		0,513	Fisher's E Test
Meta MO	0,301	0,583	
Meta Fígado		0,249	Fisher's E Test
<u>Metástases ósseas</u>	Qui quadrado/ Z	p	teste
Meta óssea			
Crânio	9	0,003	
Coluna	3	0,065	
Apendic.	2,053	0,152	
Arco costal	0,091	0,763	
Bacia	0,098	0,754	
<u>Características laboratoriais</u>	Qui quadrado/ Z	p	teste
DHL		0,020	Mann-Whitney
Hb		0,6884	Mann-Whitney
Ferritina		0,1335	Mann-Whitney
VMA		0,395	Mann-Whitney
<u>Características terapêuticas</u>			
Cirurgia inicial		0,082	Fisher's E Test
Second look	11,889	0,003	
Quimioterapia	11,187	0,00	
Ácido Retinóico	25,599	0,001	
Radioterapia	10,545	0,001	

A comparação entre os grupos submetidos ou não a TMO , em relação ao óbito, nos leva as seguintes análises estatísticas:

- Há associação tendenciosa ($P=0,060$) de maior percentagem de óbitos entre pacientes estágio 4 (INSS), em relação ao 3.
- Há associação tendenciosa ($P=0,082$) de maior percentagem de óbitos entre pacientes com valores mais elevados de DHL.
- Os grupos de óbitos apresentam diferenças estatisticamente significantes em relação ao tipo de abordagem cirúrgica inicial. O grupo óbito apresenta maior percentagem de pacientes submetidos inicialmente à biópsia tumoral e o grupo “não óbito” maior percentagem de pacientes submetidos a biópsias de medula óssea e ressecções tumoral. ($P < 0,001$).
- Os grupos de óbito diferem em relação aos níveis de ferritina sérica.. O grupo de óbito apresenta valores de ferritina significativamente menores do que o grupo não óbito ($P=0,031$).
- Observa-se maior número de paciente com óbito no Grupo que fez uso do Protocolo NeuroVIII97, em relação a terapêutica com Neuro IX2000 ($P=0,003$). A utilização do Ácido Retinóico também gerou percentagem significativamente menor de óbitos ($P=0,042$), em relação ao grupo que não fez uso.

A tabela 22 abaixo esquematiza os dados ilustrados acima.

Tabela 22-Análise univariada de óbito entre pacientes submetidos ou não a TMO

Análise univariada de óbito		
N	p	teste
Características clínicas		
Idade diagnóstico	0,112	Mann-Whitney
Estadiamento	0,060	qui-quadrado
Duração dos sintomas	0,390	Mann-Whitney
Raça	0,372	Fisher's E Test
Sexo	0,743	qui-quadrado
Estado nutricional	0,482	Fisher's E Test
Características do tumor		
Tamanho	0,288	Mann-Whitney
Localização	0,291	Fisher's E Test
Metástases ganglionares	0,134	Fisher's E Test
Metástases medula óssea	0,973	qui-quadrado
Metástase fígado	0,545	Fisher's E Test
Meta óssea		
Arco Costal	1,000	Fisher's E Test
Apendicular	0,152	qui-quadrado
Crânio	0,928	qui-quadrado
Coluna	0,748	qui-quadrado
Bacia	1,000	Fisher's E Test
Shimada	0,333	Fisher's E Test
MYCN	0,574	Fisher's E Test
Características laboratoriais		
DHL	0,0882	Mann-Whitney
Hb	0,3908	Mann-Whitney
Ferritina	0,0310	Mann-Whitney
VMA	0,5462	Mann-Whitney
Características da terapêutica		
Cirurgia inicial	<0,0001	Fisher's E Test
Second look	0,715	qui-quadrado
Ácido Retinóico	0,042	qui-quadrado
Protocolo	0,003	qui-quadrado

6. DISCUSSÃO

A identificação de fatores de prognóstico em oncologia pediátrica é importante para o projeto e análise dos ensaios terapêuticos, em que os pacientes são classificados em grupos de risco e tratados de acordo com o seu estado de risco.

A literatura mundial tem publicado vários artigos referentes a fatores de prognóstico em neuroblastomas, sobretudo em crianças maiores de um ano com doença disseminada, cujo prognóstico ainda é sombrio. A relevância da extensão da moléstia e da idade como fatores de prognóstico é notável, sendo verdadeiramente os dois únicos fatores independentes reconhecidos nos neuroblastomas. Por essa razão, as tentativas de caracterização da relevância de outros elementos ficam de fato prejudicadas. Além disso, a grande maioria dos estudos mundiais focam em fatores de prognóstico de ordem biológica, cuja complexidade é inacessível à maioria das instituições brasileiras: assim, na análise de 134 pacientes com neuroblastoma consecutivamente admitidos ao ITACI, com ou sem tratamento prévio, de qualquer estágio, a partir do início de 2000, 47/122 (38,5%), tiveram amplificação de *MYCN* analisada, sendo que no grupo de pacientes encaminhados à instituição pós-alguma forma de manuseio inicial, apenas 9% haviam sido submetidos a tal análise⁸.

Partindo desse princípio, fizemos esse estudo revisional buscando, sobretudo, avaliar fatores de natureza clínica e laboratorial geral, fato amplamente justificável pelo acima referido.

⁸ Dados fornecidos pelo SAME, ITACI / ICr.

Vale ressaltar que, devido ao tamanho limitado de nossa amostra, não pretendemos concluir o valor preditivo de qualquer fator prognóstico, mas, sim, realizarmos uma análise crítica de nossa amostragem frente aos dados de literatura.

Entre os parâmetros clínicos e laboratoriais que têm sido considerados como fatores de risco evolutivo dos neuroblastomas e que também analisamos em nosso estudo, devemos incluir:

6.1) FATORES INDEPENDENTES DE PROGNÓSTICO

6.1.1) Extensão da doença:

É um dos dois principais fatores independente de prognósticos (além da idade do paciente ao diagnóstico) reconhecidos historicamente nos protocolos atuais. Breslow¹⁰⁰, já em 1971, demonstrou categoricamente em 246 crianças analisadas, que o prognóstico era tanto mais reservado quanto maior fosse o grau de disseminação do neuroblastoma.

Na literatura, COTTERILL²⁶⁸ descreve, em sua estatística com 825 pacientes maiores de um ano portadores de neuroblastoma estágio 3 e 4 (INSS), 143 (17,3%) crianças estágio 3 e 682 (82,7%) estágio 4. BERNSTEIN e outros autores obtiveram a sobrevida média para pacientes estágio de 60-63 % e para pacientes 4 de 15 % a 25%²⁶⁹.

Na presente análise, incluímos apenas casos com mais de um ano de idade, com doença regional (estádio 3) e metastática (estádio 4), excluindo os demais estádios de doença, pois o peso favorável exercido pelo estágio tornaria os demais fatores de risco muito difíceis de serem avaliados. Dos 53 casos levantados, 47 eram portadores de neuroblastoma estágio 4.

Em que pese o limitado número de pacientes estágio 3 (apenas 11,3%), não se observou uma associação estatisticamente significativa na sobrevida total ($P=0,159$) e na sobrevida livre de eventos ($P=0,153$) entre pacientes estágio 3 e 4.

Não houve diferença estatística entre os pacientes submetidos ou não a transplante de medula óssea (TMO), em relação a extensão da doença (estádio 3 e 4 INSS- $p= 0,2117$).

6.1.2) Idade:

Reconhecemos, no neuroblastoma, uma interferência extremamente evidente do fator idade em seu prognóstico, sendo favorável à ocorrência de moléstias em crianças cuja idade é inferior ao limite que se situa entre 6 e 18 meses, aceitando-se mais recentemente os 18 meses como limite¹⁰⁸.

Na análise desta série, propositadamente, excluímos as crianças menores de um ano de idade ao diagnóstico, dividimo-la conforme a mediana das idades encontradas (36 meses). Dentro desse contexto analítico, no que diz respeito à sobrevida, não houve diferença significativa ao compararmos as diversas faixas etárias, no que diz respeito à sobrevidas total ($P= 0,159$) e livre de eventos ($P= 0,201$).

Também não foi observada diferença na faixa etária entre pacientes que foram ou não submetidos a transplante de medula óssea ($P= 0,2117$). Destaca-se que apenas pacientes que conseguiram entrar em remissão clínica, teriam tal indicação.

A interpretação dos dados acima deve ser interpretada com limites, porque foi excluído dessa amostra o grupo de crianças em que, mesmo com doença

metastática, pode ser observada cura com quimioterapia de intensidade moderada (crianças menores de 1 ano).

A relevância da extensão da moléstia e da idade como fatores de prognóstico é notável, sendo verdadeiramente os dois únicos fatores independentes reconhecidos nos neuroblastomas. Por essa razão, as tentativas de caracterização da relevância de outros elementos ficam de fato prejudicadas. Assim sendo, há que se os descrever conforme as designações incluídas a seguir.

6.2) FATORES DE PROGNÓSTICO NÃO-INDEPENDENTES

6.2.1) Localização da moléstia:

Tumores retroperitoneais e particularmente de adrenais têm pior prognóstico, enquanto os mediastinais têm melhor sobrevida. Todavia, não representa fator independente do estágio¹¹⁰.

Em nossa casuística, não houve associação significativa da localização da neoplasia com a sobrevida total ($P=0,561$) e livre de eventos ($P= 0,383$).

Não observamos também diferença de localização do tumor primário entre pacientes submetidos ou não a TMO ($P=0,291$).

6.2.2) Ácido Vanilmandélico (VMA):

Reconhecemos as interferências no prognóstico associadas à excreção preferencial de um ou outro dos dois metabólitos urinários mais freqüentemente analisados em crianças com neuroblastoma, quais sejam VMA e HVA⁵⁶ e principalmente a relação entre VMA: HVA⁵⁷.

Nessa série, na qual apenas valores de VMA foram analisados, seu valor ao diagnóstico, conforme fosse menor ou igual a mediana, ou superior não se revelou significante em relação a sobrevida total ($P=0,295$) e livre de eventos ($P=0,530$) Também não houve diferença entre os grupos submetidos ou não a TMO ($P=0,5462$).

6.2.3) Ferritina sérica:

Níveis anormais são raramente encontrados em crianças com doença localizada⁶³. Níveis normais apresentam prognóstico melhor comparativamente àquelas com níveis elevados⁶⁴.

Em nossa casuística, houve surpreendentemente associação significativa entre níveis séricos baixos de ferritina e menor sobrevida total ($P=0,037$) e associação altamente tendenciosa em relação a menor sobrevida livre de eventos ($P=0,054$).

Tal dado não é consonante com a literatura mundial e possíveis explicações são que a ferritina é um marcador inespecífico dessa moléstia e que também pode se alterar em outras situações como, por exemplo, anemias carenciais e desnutrição.

Aproximadamente 80 % dos pacientes avaliados no presente estudo (submetidos ou não a TMO) apresentavam quadro laboratorial inicial de anemia ($Hb < 11,0g/dL$), com média de $9g/dL$. Em torno de 22% do grupo submetido a TMO e 40% no grupo sem TMO apresentavam algum grau de desnutrição.

Tais dados podem justificar nossos valores baixos de ferritina sérica observados nesse trabalho em nossa população brasileira portadora de neuroblastoma, diferentemente de outros em países europeus e América do

Norte, cuja população apresenta um perfil sócio-econômico bem diverso da nossa. Esses pacientes anêmicos e/ou desnutridos, com ferritina baixa, poderiam evoluir com mais intercorrências frente a uma quimioterapia agressiva e terem uma sobrevida menor. Tais hipóteses necessitam de um estudo mais aprofundado.

Na análise multivariada, concluímos que o paciente que se apresenta com valores de ferritina sérica inferior a 334 n/ug/l tem chance oito vezes maior chance de óbito em relação a pacientes com ferritina maior ou igual a 334 n/ug/l.

Não houve diferença estatística significativa dos valores de ferritina entre os grupos que foram ou não submetidos a TMO.

Segue abaixo curvas de Kaplan-Meier referente a ferritina sérica:

Figura 7: Curva de sobrevida total de Kaplan-Meier: FERRITINA SÉRICA

Figura 8: Curva de sobrevida livre de eventos total de Kaplan-Meier: FERRITINA SÉRICA

6.2.4) Desidrogenase láctica:

O nível de desidrogenase láctica (DHL) no soro de pacientes, ao diagnóstico, tem correlação com o prognóstico. Níveis sanguíneos superiores a 1500 U/ml ou 2,7 vezes o limite superior da normalidade estão associados com doença mais agressiva. Os elevados níveis enzimáticos refletem uma rápida multiplicação celular e/ou a presença de grandes massas tumorais¹¹⁷⁻⁸.

Observamos que o grupo de pacientes submetidos a TMO diferem em relação ao DHL, ao apresentarem valores significativamente menores ($P=0,0201$), quando comparado ao grupo sem TMO. Tal dado estaria de acordo com a literatura, porque tais pacientes apresentavam menos doença inicial (197 cm^3 com TMO vs 364 cm^3 sem TMO), que fez com que esse grupo entrasse em remissão clínica e fosse submetido a TMO.

Não foi observado associação estatisticamente significativa na sobrevida total ($P=0,149$) e livre de eventos ($P=0,160$), ao utilizarmos como ponto de corte de sobrevida a mediana. Assim resolvemos utilizar o valor de 1500 U/ml (ou 2,7 vezes o limite superior da normalidade)¹¹⁹ na curva de sobrevida, conforme orientação da literatura e obtivemos valores significativos na sobrevida total ($P=0,035$), conforme curvas abaixo:

Figura 9: Curva de sobrevida total de Kaplan-Meier: DESIDROGENASE LÁTICA

Figura 10: Curva de sobrevida livre de eventos de Kaplan-Meier:
DESIDROGENASE LÁTICA

3) FATORES DE PROGNÓSTICO CUJA INTERVENIÊNCIA NÃO É CONSPICUAMENTE REPRODUZIDA NOS VÁRIOS ESTUDOS

6.3.1) Histologia conforme Shimada :

Apesar de ser um fator prognóstico importante e consagrado na literatura⁴³⁻⁵, não encontramos associação significativa entre os pacientes portadores de neuroblastoma avançado e a classificação histológica de Shimada em relação à sobrevida total ($P=0,722$), livre de evento ($P=0,241$) e nos grupos submetidos ou não a TMO ($P=0,521$).

Tal fato pode ter ocorrido, porque estudamos em nossa amostra um grupo homogêneo de pacientes em relação a disseminação da doença e faixa

etária (maiores de um ano) e sabe-se, da literatura, que tal classificação perde parte de seu impacto, quando comparada com variáveis de maior impacto como idade e estágio.

Tentamos fazer uma associação da mediana da idade de nossos pacientes (36 meses) com a classificação de Shimada e óbito e também não encontramos valores significantes ($P=0,569$).

6.3.2) *MYCN*:

A amplificação do *MYC* é tida como uma das principais variáveis de prognóstico em neuroblastomas, sendo presente em aproximadamente 1/3 dos neuroblastomas avançados e 5% em doenças localizadas¹⁴⁶⁻¹⁴⁷.

Apesar de obtivermos em nosso estudo 32,5% de *MYC* amplificados, estatística semelhante à literatura mundial para neuroblastomas avançados, não obtivemos relação estatisticamente significativa entre sua amplificação e a sobrevida total ($P=0,287$) e livre de eventos ($P=0,228$). Também não observamos tal significância nos grupos submetidos ou não a TMO ($P=0,568$).

O número reduzido de pacientes com material adequado para análise do *MYCN* ($N=40$) pode ter contribuído para a não significância estatística esperada dos dados obtidos na sobrevida desses pacientes. Além disso, há outras características genéticas também associadas ao prognóstico como a ploidia e a deleção de 1p; dados esses não avaliados no presente estudo pela exiguidade de amostras obtidas..

6.4) OUTROS FATORES DE PROGNÓSTICO AVALIADOS NESSE TRABALHO

6.4.1) Sexo e raça:

No levantamento da literatura realizado nesse trabalho, não há referências de correlação do sexo e/ou raça com o prognóstico em neuroblastomas.

Nossa amostragem apresenta conclusão semelhante com P não significativa (Sobrevida total(ST) com $P=0,707$ e $0,435$. para sexo e idade respectivamente e sobrevida livre de eventos (SLE) com $P=0,713$ e $0,957$).

Também não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos com e sem TMO ($0,637$ para sexo e $0,773$ para raça).

6.4.2) Tempo de sinais e sintomas:

O diagnóstico feito mais precocemente, teoricamente, pode refletir prognóstico mais favorável, principalmente em doença mais avançada.

Em nossa casuística, não encontramos dados estatisticamente significantes em relação à sobrevida total ($P=0,867$) e livre de eventos ($P=0,990$). Ao avaliarmos os pacientes submetidos ou não a TMO, tal variável também não se mantém estatisticamente significativa ($P=0,390$).

A ampla dispersão desses dados com variação de cinco dias a sete meses, além da eventual subjetividade das informações geradas pelos familiares pode ter contribuído para tais conclusões.

6.4.3) Estado nutricional:

O estado nutricional prejudicado que, em outros estudos, é reconhecido como elemento desfavorável de prognóstico em consequência do maior número de intercorrências^{267,270}, nessa série não se demonstrou relevante (ST com $P=0,566$ e SLE com $P=0,691$). Também não foi observada associação

estatisticamente significativa nos grupos submetidos ou não a transplante de medula óssea ($P=0,148$).

Tal resultado pode ser consequência que, em neuroblastoma avançado, as intercorrências não estejam implicadas de maneira tão significativa na sobrevida do paciente, quanto a própria intensidade da neoplasia.

6.4.4) Hemoglobina sérica:

Utilizamos o nível de hemoglobina como um possível reflexo da cronicidade e agressividade da moléstia, condicionando uma pior condição geral e, portanto, uma menor tolerância ao tratamento²⁷¹.

Não foi observado associação estatisticamente significativa entre níveis de hemoglobina e sobrevida total ($P= 0,263$), livre de eventos ($P=0,254$) e nos grupos submetidos ou não a transplante de medula óssea ($P=0,6884$).

Os motivos prováveis apontados para tais resultados seria pela dificuldade de associá-la exclusivamente a moléstia básica, já devidamente discutido no item 2.3 (ferritina).

6.4.5) Dimensões do tumor primário:

Pode-se afirmar que tumores maiores estão geralmente relacionados com estádios mais avançados e conseqüentemente com prognóstico desfavorável.

Em nossa casuística, entretanto, houve associação tendenciosa de maiores tumores com menor sobrevida total ($P=0,082$). Não houve, entretanto, associação do tamanho tumoral com a sobrevida livre de eventos ($P= 0,669$) e nem relação entre pacientes submetidos ou não a TMO ($P= 0,1582$).

Tal fato pode ser decorrente que, mais importante que o volume tumoral, o grau de disseminação da doença implicaria em pior resultado terapêutico.

Segue abaixo figura referente a curva de Kaplan-Meier relacionando sobrevida total com tamanho tumoral.

Figura 11: Curva de sobrevida total de Kaplan-Meier: TAMANHO DO TUMOR AO DIAGNÓSTICO

6.4.6) Metástases :

Tumores com metástases à distância apresentam prognóstico pior, relacionando-se assim com o estadiamento da doença^{89,109}.

Não observamos associação estatisticamente significativa em relação à tempo de sobrevida entre pacientes com linfonodos ipsilaterais comprometidos, contralaterais e pacientes, que, devido ao grande tamanho tumoral, foram submetidos apenas à biópsia tumoral e/ou biópsia de medula óssea, tornando muitas vezes não avaliável a possibilidade de infiltração ganglionares (ST com $P=0,469$ e SLE com $P=0,662$). Associação acima também não foi observada em relação aos grupos submetidos ou não a TMO ($P=0,513$).

Tal fato provavelmente decorre que a irressecabilidade do tumor tenha um papel mais relevante do que a presença ou não das metástases ganglionares. Além disso, a literatura também destaca a relevância do envolvimento de linfonodos não intimamente aderidos ao tumor, cujos dados disponíveis indicam que sua chance de cura não é estatisticamente diferente daqueles com doença amplamente disseminada.^{89,109}

Observou-se diferença estatisticamente significantes em relação as metástases ósseas entre pacientes submetidos ou não a TMO. O grupo com TMO apresentou maior percentagem de casos com metástases no crânio do que o grupo sem TMO ($P=0,003$) e associação tendenciosa de maior quantidade de metástases em coluna do que o outro grupo ($P=0,065$). Não houve, entretanto, associação estatisticamente significativa na sobrevida em ambas as situações referidas (ST e SLE com P de $0,177$ e $0,293$).

Fizemos uma análise estatística quantificando a quantidade de seguimentos ósseos acometidos (apesar das limitações inerentes que essa análise possa gerar, ao basear-se apenas em Raios-X esqueleto) e não obtivemos associação estatisticamente significativa dessa variável com a sobrevida total ($P=0,369$) e livre de eventos ($P=0,484$).

Possível hipótese para esse resultado, seria que o fato de existir maior quantidade de metástases ósseas, implicasse em um tratamento quimioterápico mais agressivo, gerando prognóstico semelhante em ambos os grupos.

Também não foi observado diferenças estatisticamente significantes em relação a presença de invasão de fígado ($P=0,545$).

Não foi viável quantificar o envolvimento de medula óssea nesse trabalho e avaliamos apenas a presença ou não de envolvimento medular. Não houve associação estatisticamente significativa de tal variável com a sobrevida total ($P=0,864$) e livre de eventos ($P=0,962$). Tentamos correlacionar indiretamente os níveis de hemoglobina com a invasão medular, mas não obtivemos sucesso devido inespecificidade de tal variável, conforme anteriormente explicado.

Provável justificativa seria a mesma referida acima, em relação a maior intensidade de tratamento nas situações de doença avançada.

Não houve diferença significativamente significativa entre os grupos submetidos ou não a TMO em relação a metástases em medula óssea ($P=0,583$) e fígado ($P=0,249$).

6.4.7)Terapêutica:

6.4.7ª) Quimioterapia

O Protocolo Neuro VIII97 consiste de 4 ciclos de 28 dias de quimioterapia indutória com as seguintes drogas:

Ciclofosfamida (200 mg/m²) por 7 dias

Adriamicina (45 mg/m²) no 8º dia

Vincristina (2mg/m²) no 14º dia

Carboplatina (200 mg/m²) e Etoposide (300 mg/m²) nos dias 21º a 23º

Vincristina (2 mg/m²) no 28ºdia

O protocolo Neuro IX 2000 utiliza o esquema indutório semelhante com 4 ciclos, associando TMO e uso de retinóicos. Também prevê a modulação de resistência múltipla a drogas como uso de Verapamil, obtenção de células tronco periféricas após exposição a MIBG terapêutico e radioterapia preventiva de Sistema Nervoso Central.

Assim compreende-se porque o grupo com TMO apresentou número significativamente maior de casos de pacientes tratados com Protocolo Neuro IX 2000, enquanto os não transplantados tiveram uma percentagem maior de crianças tratadas com Neuro VII97 (P=0,001). E também a maior exposição a radioterapia (P=0,001) e Ácido Retinóico (P=0,001) no grupo dos transplantados.

Em relação a sobrevida, observa-se uma associação tendenciosa de maior número de óbitos no Grupo tratado com Protocolo Neuro VII97, em relação ao Neuro IX 2000 (ST com P=0,093 e SLE com P= 0,057). Tal fato justifica-se pela utilização, no Protocolo Neuro-IX-2000, de terapêutica visando o tratamento de neuroblastomas de mau prognóstico com o arsenal paralelo referido acima.

Desde 1979, a megaquimioterapia com resgate de células autólogas (TAMO) vem sendo testada como uma tentativa de diminuir o índice de recaídas pós quimioterapia²⁷² (QT).

O TAMO pode ter um papel importante no controle dos pacientes com neuroblastoma (NB) avançado, podendo ser usado como consolidação nos pacientes em remissão clínica. Alguns estudos têm mostrado melhora com o uso de doses altas de QT²¹⁷⁻²⁰.

Em nosso meio, Cristófani, em 1994, utilizou Melfalan em dose mieloablativa seguido de TAMO para pacientes com NB inicial/e avançado em

pacientes em remissão clínica. Observou que o esquema é factível em nosso meio, com toxicidade aceitável. Houve bons resultados, mas não se observou melhora na sobrevida livre de doença, quando comparada à literatura⁴¹

Em 1999, o CCG publicou o primeiro estudo randomizado utilizando TAMO para os pacientes com NB inicialmente avançado. O esquema indutório foi realizado com drogas comumente utilizadas para NB e posterior randomização para TAMO x não TAMO. Houve melhora significativa na SLE (34 % x 28 %), mas não na sobrevida total (44 % x 43%) em 3 anos. De qualquer modo, esse trabalho confirmou o TAMO como um caminho para o tratamento de NB de alto risco²¹⁷.

Nossos resultados em relação ao TMO demonstra uma diferença estatisticamente significativa em relação a maior sobrevida total ($P = 0,001$) e livre de eventos ($P < 0,001$) em pacientes submetidos a transplante de medula óssea, conforme figura abaixo.

Figura 12: Curva de sobrevida total de Kaplan-Meier para pacientes submetidos ou não a transplante de medula óssea.

Figura 13: Curva de sobrevida livre de eventos de Kaplan-Meier para pacientes submetidos ou não a transplante de medula óssea

É importante entretanto salientar que, apenas pacientes que entraram em remissão clínica, puderam ser submetidos a TMO. Exclui-se assim dessa opção terapêutica, pacientes graves que não tiveram êxito na fase indutória. A diferenciação entre ambos grupos já foi descrita anteriormente e será destacada na conclusão desse trabalho.

Estudos remotos da década de 80 acusam o valor terapêutico dos retinóides nos neuroblastomas, ao induzir a diferenciação de células neuroblastomatosas *in vitro*, tanto em linhagens amplificadoras como não amplificadoras de *MYCN*, causando uma acentuada diminuição da expressão de *MYCN* RNA e limitação da proliferação celular. MATTAY, em sua randomização com o uso ou não de retinóicos, obteve melhor sobrevida livre de progressão, conforme artigo já descrito nesse trabalho²¹⁷.

Em nosso estudo, o uso de retinóides gerou um aumento significativo da sobrevida total ($P = 0,003$) e livre de eventos ($P = 0,001$), conforme figuras abaixo

Figura 14-Curva de sobrevida total de Kaplan-Meier: USO DO ÁCIDO RETINÓICO

Figura 15: Curva de sobrevida livre de eventos de Kaplan-Meier: USO DO ÁCIDO RETINÓICO

Na análise multivariada o paciente que fez uso de ácido retinóico, apresentou chance de 14 vezes menor de óbito do que os não se submetem a tal substância.

6.4.7^b Cirurgia inicial

A ressecção cirúrgica completa permite prognóstico mais favorável para o neuroblastoma, conforme dados da literatura⁹¹. Em nossa casuística, observamos de maneira enfática também que o grupo submetido a ressecção completa inicial apresenta associação estatisticamente significativa de maior sobrevida total ($P < 0,001$) e livre de eventos ($P < 0,001$), em relação aos pacientes submetidos a outros procedimentos cirúrgicos (biópsia tumoral, biópsia de medula óssea e ressecção incompleta) ($P < 0,001$).

As figuras abaixo ilustram tais dados:

Figura 16: Curva de sobrevida total de Kaplan-Meier: CIRURGIA INICIAL

Figura 17: Curva de sobrevida livre de eventos de Kaplan-Meier: CIRURGIA INICIAL

Também se observa uma associação tendenciosa ($P=0,082$) de menor percentagem de biópsias na abordagem inicial de pacientes submetidos a TMO, em relação a pacientes não submetidos a essa modalidade terapêutica. Tal fato deve-se ao fato que a maioria dos pacientes que foram submetidos a TMO tiveram uma resposta indutória completa com ressecabilidade do tumor, ao invés de apenas biópsia.

6.4.7^c “Second Look”

Com relação às cirurgias retardadas (*second look*) nenhuma análise, em nenhum dos programas utilizados institucionalmente para crianças estágio 4 e idade superior a 1 ano ao diagnóstico, revelou qualquer interferência de seus resultados no prognóstico das crianças (embora marginalmente a sobrevida desde o diagnóstico fosse superior naquelas em que a cirurgia retardada demonstrasse

ou ausência de tumor viável ou permitisse a remoção completa do tumor primário, com ou sem doença residual microscópica).

Observamos no presente estudo que o grupo sem TMO apresenta maior percentagem de casos não realizados e a população submetida a TMO apresenta maior percentagem de casos com ressecção completa ($P=0,003$). Esse grupo sem TMO não atingiu remissão clínica satisfatória e, portanto, não chegou a ter indicação do procedimento (massa muito extensa, metástases) ou evoluiu para óbito precoce.

Entretanto foi observado um impacto estatisticamente bem significativo na ressecção completa ou incompleta na cirurgia retardada em relação a sobrevida desses pacientes total ($P=0,05$) e livre de eventos ($P < 0,036$), conforme curvas abaixo:

Figura 18: Curva de sobrevida total de Kaplan-Meier: SEGUNDA CIRURGIA

Figura 19: Curva de sobrevida livre de eventos de Kaplan-Meier: SEGUNDA CIRURGIA

Na análise multivariada, o paciente com “*second look*” completo apresenta 5 vezes menor chance de óbito do que a ressecção incompleta.

7. CONCLUSÕES:

1) Em relação ao objetivo de estudar quadro clínico, aspectos epidemiológicos e características laboratoriais, genéticas, histológicas de neuroblastomas disseminados em crianças maiores de um ano, submetidas ou não à transplante de medula óssea:

A) O estudo de variáveis clínicas, laboratoriais e epidemiológicas correlacionáveis com o prognóstico e de

fácil aplicabilidade em nosso país é de extrema importância no neuroblastoma avançado e deve ser mais estudada em futuros trabalhos. Nossos resultados com uma amostra limitada abre caminho para novos estudos nesse controverso campo.

2) Em relação ao objetivo de relacionar a evolução clínica com as variáveis referidas acima, tentando definir fatores de risco que possam influir na sobrevida;

- A) Os pacientes submetidos a TMO apresentam melhor sobrevida total e livre de eventos, em relação ao grupo não submetido a essa modalidade terapêutica. Tais dados podem ser consequência da efetividade dessa arma terapêutica ou porque uma amostra viciada de pacientes de melhor prognóstico é conduzida a TMO, isto é, os pacientes que entraram em remissão clínica
- B) Não observamos impacto na sobrevida da amplificação do *MYCN* e critérios histológicos de Shimada. Tais fatores são citados rotineiramente na literatura médica como importantes fatores prognósticos. Não foi também observado correlação de quantidade de doença metastática com o prognóstico e apenas uma discreta correlação tendenciosa entre tamanho tumoral e sobrevida total.
- C) Os níveis de hemoglobina inicial não se mostraram úteis como fatores de prognóstico.

.

- D) A cirurgia retardada completa mostrou-se fator prognóstico de extrema importância, comprovado na análise multivariada. Pacientes submetidos a ressecção retardada completa apresentam 5 vezes menor chance de óbito em relação ao grupo com ressecção incompleta.
- E) Na análise univariada, níveis séricos altos de ferritina, DHL <1500, cirurgia inicial e retardada com ressecção completa, TMO e a utilização de ácido retinóico gerou uma sobrevida melhor nos pacientes com neuroblastoma avançado.
- F) Na análise multivariada, valores de ferritina abaixo de 334 N/ug/l correlacionaram-se com pior prognóstico apresentando 8 vezes mais chance de óbito em relação ao outro grupo. Tal dado também é de extrema relevância e deve ser avaliado em outros trabalhos nacionais para verificar se tal correlação é próprio da população brasileira ou viés desse trabalho.
- G) A utilização de retinóides mostrou-se de extrema importância no prognóstico de nossos pacientes com 14 vezes menor chance de óbito, em relação ao grupo sem retinóides (análise multivariada). Sugere-se, à partir desses dados, a prescrição rotineira desse medicamento em neuroblastomas avançado

3) Em relação ao objetivo 3 de definir fatores preditivos para a indicação de transplante de medula óssea em pacientes portadores de neuroblastoma avançado.

A) A definição de fatores preditivos para a indicação de transplante de medula óssea em pacientes portadores de neuroblastoma avançado foi também objetivo desse trabalho, pois somente os pacientes que entram em remissão acabam sendo submetidos a TMO. O grupo que não entra em remissão deverá ter outras opções terapêuticas e reconhecer esse grupo é de extrema importância. A cirurgia inicial e a retardada com ressecção completa, além de valores mais baixos de DHL conduzem com mais frequência a TMO. Surpreendente a maior percentagem de metástase óssea em calota craniana no grupo de TMO merece ser melhor avaliada em novos estudos, pois não encontra correlação com a literatura médica.

Em suma, o estudo em neuroblastomas avançados de fatores de prognóstico de ordem biológica e molecular deve ser realizado sempre que possível: não pudemos definir, e não há notícia de que tenham sido, parâmetros de natureza clínica e laboratorial geral que demonstrassem maior impacto. Necessário portanto criar centros de referências para tratamento de neuroblastomas avançados ou locais para drenagem de exames mais complexos de biologia molecular.

.Apesar de não conseguimos evidenciar fatores clínicos laboratoriais relevantes no prognóstico dessa doença nesse trabalho, futuros estudos de maior amplitude e visão prospectiva devem ser realizados para comprovação ou não desse conceito.

9. REFERÊNCIAS

1. Cotterill SJ, Pearson AD, Pritchard J. Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: results of the European Neuroblastoma Study Group "Survey" 1982-1992. *Eur J Cancer*. 2000;36:901-8.
2. Sano H, Bonadio J, Gerbing RB, London WB, Mattay KK, Lukens JN, Shimada H. International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age. *Eur J Cancer*. 2006;42:1113-9.
3. Young JLJ, Ries LG, Silverberg E. Cancer incidence, survival and mortality for children younger than 15 years. *Cancer*. 1986;58:598.
4. Ribeiro KCB, Camargo B, Torloni H. Hospital Based Pediatric Cancer Registry, 1999. v.2, p.22.
5. Voute PA. Neuroblastoma. In: Sutow WW, Fernbach DJ, Vietti TJ. *Clinical pediatric oncology*. St Louis: Mosby; 1984. p.559-87.
6. Kinnier-Wilson LM, Draper GJ. Neuroblastoma, its natural history and prognosis: a study of 487 cases. *Br J Med*. 1974;3:301-7.
7. Stiller CA, Parkin DM. International variations in the incidence of neuroblastoma. *Int J Cancer*. 1992;52:532-43.
8. Izbicki T, Mazur J, Izbicki E. Epidemiology and etiology of neuroblastoma: An overview. *Anticancer Res*. 2003;23:755-60.
9. Hoff J, Schymura MJ, Curnem MG. Trends in the incidence of childhood and adolescent cancer in Connecticut, 1935-1979. *Med Pediatr Oncol*. 1988;16:78-87.
10. Ericsson JL, Karnström L, Mattson B. Childhood cancer in Sweden, 1958-1974. Incidence and mortality. *Acta Paediatr Scand*. 1978;67:425-32,

11. Davis S, Rogers MA, Pendergrass TW. The incidence and epidemiologic characteristics of neuroblastoma in the United States. *Am J Epidemiol.* 1987;126:1063-74.
12. Beckwith JB, Perrin EV. In situ neuroblastoma; a contribution to the natural history of neural crest tumors. *Am J Pathol.* 1963;43:1089-104.
13. Beckwith JB, Martin NF. Observations on the histopathology of neuroblastomas. *J Pediatr Surg.* 1968;3:106.
14. Hardy PC, Nesbit ME. Familial neuroblastoma: a report of a kindred with a high incidence of infantile tumors. *J Pediatr.* 1972;80:74-7.
15. Knudson AG, Strong LC. Mutation and cancer. Neuroblastoma and pheochromocytoma. *Am J Hum Genet.* 1972;24:514-32.
16. Foulkes WD, Buu PN, Filiatrault D, Leclerc JM, Narod SA. Excess of congenital abnormalities in French-Canadian children with neuroblastoma; a case series study from Montreal. *Med Pediatr Oncol.* 1997;29:272-9.
17. Michalek AM, Buck GM, Nasca PC, Freedman AN, Baptiste MS, Mahoney MC. Gravid health status, medication use and risk of neuroblastoma. *Am J Epidemiol.* 1996;143:996-1001.
18. Flaegstad T, Andresen PA, Johnsen JL, Asomani S, Orgensen GE, Vignarajan S. A possible contributory role of BK virus infection in neuroblastoma development. *Cancer Res.* 1999;59:1160-3.
19. Olshan AF, Smith JC, Bondy M L, Neglia JP, Pollock BH. Maternal vitamin use and reduced risk of neuroblastoma. *Epidemiology.* 2002;13:575-80.
20. Roos AJ, Olshan AF, Teschke K, Poole C, Savitz DA, Blatt J, Bondy M L, Pollock BH. Parental occupational exposures to chemicals and incidence of neuroblastoma in offspring. *Am J Epidemiol.* 2001;2:106-14.
21. Munzer C, Menegaux F, Lacour B, Valteau-Couanet D, Michon J, Coze C, Bergeron C, Auvrignon A, Bernard F, Thomas C, Vannier JP, Kanold J, Rubie H, Hémon D, Clavetl J. Birth-related characteristics, congenital

- malformation, maternal reproductive history and neuroblastoma: the ESCALE study (SFCE). *Int J Cancer*. 2008;122: 2315-21.
22. Roos AJ, Olshan AF, Teschke K, Poole C, Savitz DA, Pollock BH, Grufferman S. Parental occupational exposures to electromagnetic fields and radiation and the incidence of neuroblastoma in offspring. *Epidemiology*. 2001;12:508-17.
 23. Daniels JL, Olshan AF, Teschke K, Hertz-Picciotto I, Savitz DA, Blatt J, Bondy ML, Neglia JP, Pollock BH, Cohn SL, Look AT, Seeger RC, Castleberry RP. Residential pesticide exposure and neuroblastoma. *Epidemiology*. 2001;12:4-6.
 24. Buck GM, Michalek AM, Chen CJ, Nasca PC, Baptiste MS. Perinatal factors and risk of neuroblastoma. *Paediatr Perinatal Epidemiol*. 2001;15:47-53.
 25. Daniels JL, Olshan AF, Pollock BH, Shah NR, Stram DO. Breast-feeding and neuroblastoma in USA and Canada. *Cancer Causes Control*. 2002;13:401-5.
 26. Bollande RP, Towler WF. Possible relationship of neuroblastoma in Von Recklinghausen's disease. *Cancer*. 1970;26:162-74.
 27. Debaun MR, Tucker MA. Risk of cancer during the first four years of life in children from Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry. *J Pediatr*. 1998;132:398-400.
 28. Emery LG, Shields M, Shah NR, Garbes A. Neuroblastoma associated with Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Cancer*. 1983;52:176-9.
 29. Grotting JC, Kassel C, Demmer L. Nesidioblastosis and congenital neuroblastoma. *Arch Pathol Lab Med*. 1979;103:642-6.
 30. Johnston KM, Zoger S, Golabl M, Mulvihill JJ. Neuroblastoma in Duchene muscular dystrophy. *Pediatrics*. 1986;78:1167-74.

31. Verloes A, Elmer C, Lacombe D, Heirichs C, Rebuffat E, Demarquez JL, Monda A, Adam E. Ondine-Hirschprung syndrome –Further delineation in two cases and review of literature. *Eur J Pediatr*. 1993;152:75-7.
32. Maris JM, Chatten J, Meadows AT, Biegel JA, Brodeur GM. Familial neuroblastoma: a three-generation pedigree and a further association with Hirschprung disease. *Med Pediatr Oncol*. 1997;28:1-5.
33. Pendergrass TW, Hanson JW. Fetal hydantoin syndrome and neuroblastoma. *Lancet*. 1976;2:150.
34. Battistl L, Degani D, Pregolotto S, Bogna-Pignatti C. Fetal alcohol syndrome and malignant disease: a case report (letter). *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1993;15:136-7.
35. Kinney H, Faix R, Brazy J. Fetal alcohol syndrome and neuroblastoma. *Pediatrics*. 1980;66:130-2.
36. Westermann F, Schaw M. Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Lett*. 2002;184:127-47.
37. Robbins SL, Cotran RS. Neuroblastoma and ganglioneuroma. In: *Pathologic basis of disease*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Company; 1983. p.1167-8.
38. Odone-Filho V. *Tratamento combinado dos neuroblastomas: resultados do protocolo NEURO-I-80* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo; 1986. 160p.
39. Odone-Filho V. *Tratamento convencional dos neuroblastomas*. [Livre Docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo; 1992. 123p.
40. Liebhart M, Klepacka T, Michalak E, Wozniak W, Izbicki T. Histopathologic differentiation of tumors derived from neuroblastic cells in children depending on age. *Med Wieku Rozwoj*. 1999;3:433-9.

41. Cristófani LM. *Estudo comparativo para o tratamento de crianças com neuroblastoma avançado* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina- Universidade de São Paulo; 1994. 97p.
42. Dehner LP. Pathologic anatomy of classic neuroblastoma: including prognostic features and differential diagnosis. In: Pochedly C, ed. *Neuroblastoma: tumor biology and therapy*. Boca Raton: CRC Press; 1990. p.111-43.
43. Shimada H, Chatten J, Newton WJ, Sachs W, Hamoudi N, Chiba T, Marsden H, Misugi K. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and age –linked classification of neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst*. 1984;73:405-16.
44. Umehara S, Nakagawa A, Matthay KK, Lukens JN, Seeger RC, Stram DO, Gerbing RB, Shimada H. Histopathology defines prognostic subsets of ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer*. 2000;89:150-61.
45. George RE, Variend S, Cullinane C, Cotterill SJ, McGuckin AG, Ellershaw C, Lunec J, Pearson AD. Relationship between histopathological features, MYCN amplification, and prognosis: a UNCCSG study: United Kingdom Children Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol*. 2001;36:169-76.
46. Brodeur GM, Castleberry RP. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG ,d. *Principles and practice of pediatric oncology*. 3rd ed. Philadelphia: J B. Lippincott Company; 1997. p.761-97.
47. Joshi V, Cantor A, Altshuler G. Prognostic significance of histopathologic features of neuroblastoma: A grading system based on the review of 211 cases from the Pediatric Oncology Group(abstract). *Proc Am Soc Clin Oncol*. 1991;10:311.
48. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumours (recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee). *Cancer*. 1999;86;349-63.

49. Shimada H, Umehara S, Monobe Y, Hachitanda Y, Nakagawa A, Goto S, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK. International pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumours: a report from Children's Cancer Group. *Cancer*. 1999;92:2451-61.
50. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*. 1999;86:364-72.
51. Stickler GB, Hallenback GA, Flock EV. Ganglioneuroblastoma associated with chronic diarrhea and increased excretion of catecholamines. *Proc Staff Med Clinic*. 1959;34:548-50.
52. Brodeur GM, Fernbach DJ, Vietti TJ. Neuroblastoma and other peripheral neuroectodermal tumors. In: Fernbach DJ, ed. *Clinical pediatric oncology*. 4th ed. St. Louis: C.V. Mosb; 1991. p.337.
53. Mathieu P, Favrot M, Frappaz D, Chauvin F, Greffe J, Montegue A, Lacroix C, David L, Brunat-Mentigny M, Philip T. Neuroblastoma in children: clinical and biological aspects. An experience of screening in France. *Ann Biol Clin*. 1993;51:665-88.
54. Lucas K, Gula MJ, Knisely AS, Virgi MA, Wollman M, Blatt J. Catecholamine metabolites in ganglioneuroma. *Med Pediatr Oncol*. 1994;22:240-3.
55. Voorhess ML. Urinary catecholamine excretion by normal children. *Pediatrics*. 1967;39:252-7.
56. Fitzgibbon MC, Tormey WP. Pediatric reference ranges for urinary catecholamines metabolites and their relevance in neuroblastoma diagnosis. *Ann Clin Biochem*. 1994;31:1-11.
57. Laug W, Siegel S, Shauk K, Landing B, Baptista J, Gutenstein M. Initial urinary catecholamine metabolite concentrations and prognosis in neuroblastoma. *Pediatrics*. 1978;62:77-83.

58. Cooper EH. Neuron-specific enolase. *Int J Biol Markers*. 1994;4:24-6.
59. Ishiguro Y, Kato K, Ito T, Nagaya M, Yamada N, Sugiti T. Nervous system-specific enolase in serum as a marker for neuroblastoma. *Pediatrics*. 1983;72:696-700.
60. Zeltzer P, Marangos P, Evans AE, Schneider SL. Serum neuron-specific enolase in children with neuroblastoma. Relationship to stage and disease course. *Cancer*. 1986;57:1230-4.
61. Massaron S, Seregini E, Luksch R, Casanova M, Botti C, Ferrari L, Martinetti A, Molteni SN, Bellani FF, Bombardieri E. Neuron-specific enolase evaluation in patients with neuroblastoma. *Tumour Biol*. 1998;19:261-8.
62. Hervas BI, Rivas SA, Bello AP, Canete A, Fernandez JM, Saura QA, Gonzalez CP, Ruiz RJC, Castell V, Perez PJL, Monfort JA, MATEO NA. Value of 123I-MIBG scanning, neuron-specific enolase and serum ferritin in the diagnosis and follow-up of patients with neuroblastoma. *Rev Esp Med Nucl*. 2001;5:369-76.
63. Hann H, Evans AE, Siegel S, Wong K, Sather H, Dalton A, Hammond D, Seeger R. Prognostic importance of serum ferritin in patients with stage III and IV neuroblastoma: the CCSG experience. *Cancer Res*. 1985;45:2843-8.
64. Sellig RA, Madafiglio J, Haber M, Norris MD, White L, Stewart BW. Ferritin production and desferrioxamine cytotoxicity in human neuroblastoma cells lines. *Anticancer Res*. 1993;3:721-5.
65. Wu ZL, Schwartz E, Seeger R, Ladisch S. Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas. *Cancer Res*. 1986;46:440-3.
66. Thomas PB, Delatte SJ, Sutphin A, Frankel AE, Tagge EP. Effective targeted cytotoxicity of neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg*. 2002;37:539-44.

67. Lanzkowsky P. Neuroblastoma. In: Lanzkowsky P. *Manual of pediatric hematology and oncology*. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. p.419-21.
68. Alexander F. Neuroblastoma. *Urol Clin North Am*. 2000;3:383-92.
69. Crucetti A, Kiely EM, Spitz L, Drake DP, Pritchard J, Pierro A. Pelvic neuroblastoma: low mortality and high morbidity. *J Pediatr Surg*. 2000;35:724-8.
70. Berthold F. Overview: biology of neuroblastoma. In: Pochedly C. *Neuroblastoma: tumor biology and therapy*. Boca Raton: CRC Press; 1990. p.1-27.
71. Kedar A, Glassman M, Voorhess ML. Severe hypertension in a child with ganglioneuroblastoma. *Cancer*. 1981;47:2077-85.
72. Rudnick E, Khakoo Y, Antunes NL, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Gerbing RB, Stram DO, Mattay KK. Opsoclonus-myoelonus-ataxia syndrome in neuroblastoma: clinical outcome and antineuronal antibodies- a case report from the Children's Cancer Group Study. *Med Pediatr Oncol*. 2001;36:612-22.
73. Kaplan S, Holbrook C, McDaniel H, Buntain W, Crist W. Vasoactive intestinal peptide secreting tumors of childhood. *Am J Dis Child*. 1980;134:21-4.
74. Cooper EH. Neuron-specific enolase. *Int J Biol Markers*. 1994;9:205-10.
75. Brisse H, Edeline V, Michon J, Couanet D, Zucker J, Neuenschwander S. Current strategy for the imaging of neuroblastoma. *Radiology*. 2001;82:447-54.
76. Lastoria S, Maurea S, Caraco C, Vergara E, Maurelli L, Indolfi P, Casale FDI, Tullio MT, Salvatore M. Iodine-131 metaiodobenzilguanidine scintigraphy for localization of lesions in children with neuroblastoma : comparison with computed tomography and ultrasonography. *Eur J Nucl Med*. 1993;20:1161-7.

77. Osmanagaoglu K, Lippens M, Benoit Y, Obrie E, Schelstraete K, Simons M. A comparison of iodine-123 meta-iodobenzylguanidine scintigraphy and single bone marrow aspiration biopsy in the diagnosis and follow-up of 26 children with neuroblastoma. *Eur J Nucl Med*. 1993;20:1154-60.
78. Turba E, Fagioli G, Mancini A, Rosito P, Galli A, Alvisi P. Evaluation of stage 4 neuroblastoma patients by means of MIBG and 99m Tc-MDP scintigraphy. *J Nucl Biol Med*. 1993;37:107-14.
79. Dessner DA, Di Pietro MA, Shulkin BL. MIBG detection of hepatic neuroblastoma: correlation with CT, US and surgical findings. *Pediatr Radiol*. 1993;23:76-80.
80. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*. 1993;11:1466-77.
81. Carlsen NLT. Neuroblastoma: epidemiology and pattern of regression. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1992;14:103-10.
82. Cassady JR. A hypothesis to explain the enigmatic natural history of neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 1984;12:64-7.
83. James DH. Proposed classification of neuroblastoma. *J Pediatr*. 1967;71:764.
84. Thurman WG, Donaldson MH. Current concepts in the management of neuroblastoma. In: Thurman WG. *Neoplasia of childhood*. Chicago: Year Book Medical Publishers; 1967. p.175-81.
85. Pinkel D, Pratt C, Holton C, James D, Wrenn E, Hustu O. Survival of children with neuroblastoma treated with combination chemotherapy. *J Pediatr*. 1968;73:928-31.
86. Evans AE, D'Angio GJ, Randolph J. A proposed staging for children with neuroblastoma (Children's Cancer Study Group A). *Cancer*. 1971;27:374-8.

87. Hayes FA, Green A, Husto HO, Kumar M. Surgicopathologic staging of neuroblastoma: prognostic significance of regional lymph node metastases. *J Pediatr*. 1983;102:59-62.
88. Evans AE, Baum E, Chard R. Do infants with stage IV-S neuroblastoma need treatment? *Arch Dis Child*. 1981;56:271-4.
89. Niname J, Pritchard J, Morris Jones PH. Stage II neuroblastoma. Adverse prognostic significance of lymphonode involvement. *Arch Dis Child*. 1982;57:438-42.
90. Brodeur GM, Seeger RC, Barret A. A International criteria for diagnosis, staging and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 1988;6:1874-81.
91. Smith EI, Haase GM, Seeger RC, Brodeur GM. A surgical perspective on the current staging in neuroblastoma – The International Neuroblastoma Staging System proposal. *J Pediatr Surg*. 1989;24:386-90.
92. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NLT, Castel V, Castleberry R, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, Kaneko M, Kemshead J, Lampert F, Lee RE, Look AT, Pearson AD, Philip T, Roald B, Sawada T, Seeger R, Tsuchida Y, Voute P. Revisions of the International criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. *J Clin Oncol*. 1993;11:1466-77.
93. Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Mattay KK. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG task force report. *J Clin Oncol*. 2009;27:289-97.
94. Simon T, Hero B, Benz-Bohm G. Review of image defined risk factors in localized neuroblastoma patients: Results of the GPOH NB97 trial. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50:965-9.
95. Cecchetto G, Mosseri V, De Bernardi B, Helardot P, Monclair T, Costa E, Horcher E, Neuenschwander S, Toma P, Rizzo A, Michon J, Holmes K.

- Surgical risk factors in primary surgery for localized neuroblastoma: the LNESG1 study of the European International Society of Pediatric Oncology Neuroblastoma Group. *J Clin Oncol*. 2005;33:8483-9.
96. Holmes K, Mosseri V, Cecchetto G. Surgical risk factors(SRF) and outcome following primary surgery for localized neuroblastoma: Results of LNESG1. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;49:433.
 97. Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Schleiermacher G, Speleman F, Spitz R, London WB, Cohn SL, Pearson ADJ, Maris JM. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *Br J Cancer*. 2009;100:1471-82.
 98. Adams GA, Shochat SJ, Smith EI. Thoracic neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Pediatr Surg*. 1993;28:372-8.
 99. Brodeur GM, Azar C, Brother M. Neuroblastoma: effects of genetic factors on prognosis and treatment. *Cancer*. 1992;70:1685-94.
 100. Breslow N, McCann B. Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma. *Cancer Res*. 1971;21:2098-103.
 101. Bowman LC, Hancock ML, Santana VM. Impact of intensified therapy on clinical outcome in infants and children with neuroblastoma: the St. Jude Children's Research Hospital experience, 1962-1988. *J Clin Oncol*. 1991;9:1599-608.
 102. Sandstedt B, Jereb B, Eklund G. Prognostic factors in neuroblastomas. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 1983;91:365-71.
 103. McWilliams NB, Hayes FA, Green AA. Cyclophosphamide/doxorubicin vs. cisplatin/teniposide in the treatment of children older than 12 months of age with disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group randomized phase II study. Medical and Pediatric Oncology. *Med Pediatr Oncol*. 1986;8:50-4.

104. Nickerson HJ, Nesbit ME, Grosfeld JL. Comparison of stage IV and IV-S neuroblastoma in the first year of life. *Med Pediatr Oncol.* 1985;13:261-8.
105. McWilliams NB. IV-S Neuroblastoma treatment controversy revisited. *Med Pediatr Oncol.* 1986;8:41-4.
106. Gugliemi M, De Bernardi B, Rizzo A. Resection of primary tumor at diagnosis in stage IV-S neuroblastoma; does it affect the clinical course? *J Clin Oncol.* 1996;14:1537-44.
107. Hsu LL, Evans AE, D'Angio GJ. Hepatomegaly in neuroblastoma stage 4s: criteria for treatment of the vulnerable neonate. *Med Pediatr Oncol.* 1996;27:521-8.
108. London WB, Castleberry RP, Mattay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, Thorner P, Brodeur G, Maris JM, Reynolds CP, Cohn SL. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for Neuroblastoma Risk Group Stratification in Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2005;23:6459-65.
109. Carlsen NL, Christensen IJ, Schroeder H, Bro PV, Hesselbjerg U, Jensen KB, Nielsen OH. Prognostic value of different staging systems in neuroblastoma and completeness of tumour excision. *Arch Dis Child.* 1986;61:832-42.
110. Coldman AJ, Fryer CJ, Elwood JM, Sonley MJ. Neuroblastoma: influence of age at diagnosis, stage, tumor site, and sex on prognosis. *Cancer.* 1980;46:896-901.
111. Woods WG. The use and significance of biologic markers in the evaluation and staging of a child with cancer. *Cancer.* 1986;58:442-8.
112. Berthold F, Hunneman DH, Harms D, Kaser H, Zieschang J. Serum vanillylmandelic acid/homovanillic acid contributes to prognosis estimation in patients with localized but not with metastatic neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 1992;28:1950-4.

113. Nishi M, Miyake H, Takeda T, Hanai J, Fujita K, Ichimiya H, Tanaka T, Hirama T, Ishikawa Y, Kudoh T, Azuma H, Takase A. The relationship between homovanillic/vanillylmandelic acid ratios and prognosis in neuroblastoma. *Oncol Rep.* 1998;5:631-3.
114. Benito HI, Sanchez RA, Arques BP, Canete A, Fernandez JM, Quiles SA, Cabezas GP, Rodriguez JC, Castell V, Pastor PJL, Monfort JA, Navarro MA. Value of 1231-MIBG scanning, neuron-specific enolase and serum ferritin in the diagnosis and follow-up of patients with neuroblastoma. *Rev Esp Med Nucl.* 2001;20:369-76.
115. Hans HL, Stahlhut MW, Evans A. Basic and acidic iso ferritins in the sera of patients with neuroblastoma. *Cancer.* 1988;62:1179.
116. Silber JH, Evans AE, Fridman M. Models to predict outcome from childhood neuroblastoma; the role of serum ferritin and tumor histology. *Cancer Res.* 1991;51:1426-33.
117. Britto JLBC. *Análise dos níveis séricos de desidrogenase láctica como marcador de atividade de doenças neoplásicas* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1991. 100p.
118. Shuster JJ, McWilliams NB, Castleberry R, Nitschke R, Smith EI, Altshuler G, Kun L, Brodeur G, Joshi V, Vietti T. Serum lactate dehydrogenase in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group recursive portioning study. *Am J Clin Oncol.* 1992;15:295-303.
119. Josh VV, Cantor AB, Brodeur GM, Look AT, Shuster JJ, Altshuler G, Larkin EW, Holbrook CT, Silverman JF, Norris HT. Correlation between morphologic and other prognostic markers of neuroblastoma. A study of histologic grade, DNA index, N-myc gene copy number, and lactic dehydrogenase in patients in the Pediatric Oncology Group. *Cancer.* 1993;71:3173-81.
120. Ladisch S, Kitada S, Hays EF. Gangliosides shed by tumor cells enhance tumor formation in mice. *J Clin Invest.* 1987;79:1879-92.

121. Valentino L, Moss T, Olson E. Shed tumor gangliosides and progression of human neuroblastoma. *Blood*. 1990;75:1564-7.
122. Schengrund CL, Shochat SJ. Gangliosides in neuroblastoma. *Neurochem Pathol*. 1988;8:189-202.
123. Evans AE, D'Angio, Propert K. Prognostic factors in neuroblastoma. *Cancer*. 1987;59:1853-9.
124. Ambros IM, Hata J, Joshi VV, Roald B, Dehner LP, Tuchler H, Potschger U, Shimada H. Morphologic features of neuroblastoma (Schwannian stroma –poor tumors) in clinically favorable and unfavorable groups. *Cancer*. 2002;94:1574-83.
125. Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ. Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1997;19:93-101.
126. Brodeur GM. Genetics of embryonal tumours of childhood: retinoblastoma, Wilms tumour and neuroblastoma. *Cancer Surv*. 1995;25:67-99.
127. Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, Yamaoka H, Fukuba I, Matsuura Y, Yokoyama T. Biological characteristics of neuroblastoma with partial deletion in the short arm of chromosome 1. *Med Pediatr Oncol*. 2001;36:67-74.
128. Maris JM, Guo C, Blake D, Whit PS, Hogarty MD, Thompson PM, Rajalingam V, Gerbing R, Stram DO, Mattay KK, Seeger RC, Brodeur GM. Comprehensive analysis of chromosome 1p deletions in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 2001;36:32-6.
129. Ohtsu K, Hiyama E, Ichikawa T, Matsuura Y, Yokoyama T. Clinical investigation of neuroblastoma with partial deletion in the short arm of chromosome 1. *Clin Cancer Res*. 1997;3:1221-8.
130. White PS, Maris JM, Sulman EP. Molecular analysis of the region of distal 1p commonly detected in neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 1997;33:1957-61.

131. Caron H, Sluis P, Kraker J. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1996;334:1525-30.
132. Cheng NC, Roy N, Chan A. Deletion mapping in neuroblastoma cell lines suggests two distinct tumor suppressor genes in the 1p35-35 region, only one of which is associated with N-myc amplification. *Oncogene.* 1995;10:291-7.
133. Brodeur GM, Fong C, Morita M, Griffith R, Hayes FA, Seager RC. Molecular analysis and clinical significance of N-myc amplification and chromosome 1p monosomy in human neuroblastomas. *Advances in Neuroblastoma Research.* New York: Alan R. Liss, Inc.; 1988. p. 3-15
134. Brodeur GM, Sekhon GS, Goldstein MN. Chromosomal aberrations in human neuroblastoma. *Cancer.* 1977;40:2256-63.
135. Caron H. Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavorable prognostic markers in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 1995;4:215-21.
136. Gehring M, Berthold F, Edler L, Schwab M, Amler LC. The 1p deletion is not a reliable marker for the prognosis of patients with neuroblastoma. *Cancer Res.* 1995;15:5366-9.
137. Thompson PM, Seifried BH, Kyemba SK, Jensen SJ, Guo C, Maris JM, Brodeur GM, Stram DO, Seeger RC, Gerbing R, Matthay KK, Matisse TC, White PS. Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2001;36:28-31.
138. Bown N, Lastowska M, Cotterill S, O'Neill S, Ellershaw C, Roberts P, Lewis I, Pearson AD. 17q gain in neuroblastoma predicts adverse clinical outcome. *Med Pediatr Oncol.* 2001;36:14-9.
139. Brinkschmidt C, Christiansen H, Terpe HJ, Simon R, Lampert F, Boecker W, Dockhorn-Dworniczak B. Distal chromosome 17 gains in neuroblastomas detected by comparative genomic hybridization (CGH)

- are associated with a poor clinical outcome. *Med Pediatr Oncol.* 2001;36:11-3.
140. Lastowska M, Van Roy N, Bown N, Speleman F, Roberts P, Lunec J, Strachan T, Pearson AD, Jackson MS. Molecular cytogenetic definition of 17q translocation breakpoints in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2001;36:20-3.
141. Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, Meddeb M, Danglot G, Brinkschmidt C, Christiansen H, Laureys G, Speleman F. Gains of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1999;25:1954-61.
142. Maris JM, Guo C, White PS, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, Gerbing R, Mattahay KK, Seeger RC, Brodeur GM. Allelic deletion at chromosome bands 11q14-23 is common in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 2001;36:24-7.
143. Guo G, White PS, Weiss MJ. Allelic detection at 11q23 is common in *MYCN* single copy neuroblastomas. *Oncogene.* 1999;18:4948-57.
144. Brodeur GM, Seeger RC, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. Clinical implications of oncogene activation in human neuroblastomas. *Cancer.* 1986;58:541-5.
145. Schwab N. Amplification of the *MYCN* oncogene and deletion of putative tumour suppressor gene in human neuroblastoma. *Brain Pathol.* 1990;1:41-6.
146. Brodeur GM, Seeger R, Schwab M, Varmus H, Bishop JP. Amplification on N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stages. *Science.* 1984;224:1121-4.
147. Cohn SL, Salwen H, Quasney MW. Prolonged N-MYC protein half-life in a neuroblastoma cell line lacking N-myc amplification. *Oncogene.* 1990;5:1821-7.

148. Bendit I. *Caracterização molecular dos neuroblastomas: estudo do oncogene MYCN, do gene de resistência múltipla a drogas MDR1, do antígeno nuclear de proliferação celular e do gene supressor de tumor TP 53* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo; 1997.
149. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H. Association of multiple copies of the N-myc oncogene its rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med.* 1985;313:1111-6.
150. Cohn SL, Look AT, Joshi VV. Lack of correlation of N-myc gene amplification with prognosis in localized neuroblastomas: a Pediatric Oncology Group Study. *Cancer.* 1995;55:721-6.
151. Tonini GP. Cellular Oncogenes and supressor genes. In: Tonini GP, Sansone R, Thiele CJ. *Molecular genetics of pediatric solid tumours – basic concepts and recent advances.* 1st ed. Philadelphia: Harwood Academic Publishers; 1992. p.165-78.
152. Brodeur GM, Hayes FA, Green AA, Casper J, Walsh J, Wallach S, Seeger RC. Consist N-myc copy number in simultaneous or consecutive neuroblastoma samples from 60 individual patients. *Cancer Res.* 1987;47:4248-53.
153. Brodeur GM, Fong CT, Morita M, Griffith RC, Hayes FA, Seeger RC. Molecular analysis and clinical significance of N-myc amplification and chromosome 1 abnormalities in human neuroblastomas. *Prog Clin Biol Res.* 1988;271:3-8.
154. Nakagawama A, Sasazuki T, Akiyama H, Kawakami K, Kuwano A, Yokoyama T, Kume K. N-myc oncogene and stage IV-S neuroblastoma: preliminary observation on tem cases. *Cancer.* 1990;65:1960-7.
155. Rubie H, Hartmann O, Michon J, Frappaz D, Coze C, Chastagner P, Baranzelli MC, Plantaz D, Avent-Loiseau H, Benard J, Delattre O, Favrot M, Peyroulet MC, Thyss A, Perel Y, Bergeron C, Courbon-Collet B, Vannie JP, Lemerle J, Sommelet D. N-Myc gene amplification is a major

- prognostic factor in localized neuroblastoma : results of the French NBL 90 study. Neuroblastoma Study Group of the Société Française d'Oncologie Pédiatrique. *J Clin Oncol*. 1997;15:1171-82.
156. Bordow SB, Norris MD, Habe PS, Marshall GM, Haber M. Prognostic significance of MYCN oncogene expression in childhood neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 1998;16:3286-94.
 157. Chan HS, Gallie BL, Haddad G, Ikegaki N, Dimitroulakos J, Yeger H, Ling V. MYCN protein expression as a predictor of neuroblastoma prognosis. *Clin Cancer Res*. 1997;3:1699-706.
 158. Pession A, De Bernard B, Perri P, Mazzocco K, Rondelli R, Nigro M, Iolascon A, Forni M, Basso G, Conte M. The prognostic effect of amplification of the MYCN oncogene in neuroblastoma. The preliminary results of the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma (GCINB). *Pediatr Med Chir*. 1994;16:211-8.
 159. Brodeur GM, Azar C, Brother M, Hiemstra J, Kaufman B, Marshall H, Moley J, Nakagawara A, Saylor R, Novack N, Shneider S, Wasson J, White P, Seeger RC, Look AT, Castleberry R. Genetic and clinical heterogeneity of human neuroblastomas. In: 2nd International symposium –neuroblastoma screening, 1991. [Abstract p.3].
 160. Schwab M. Amplification of N-myc as a prognostic marker for patients with neuroblastoma. *Semin Cancer Biol*. 1993;4:13-8.
 161. Yalcin B, Kutluk T, Kansu E, Gogus S, Canpinar H, Akyuz C, Buyukpamukcu M. DNA content and proliferative activity in children with neuroblastoma. *Pediatr Hematol Oncol*. 2000;17:45-54.
 162. Nakazawa M. The prognostic significance of DNA ploidy for neuroblastoma. *Surg Today*. 1993;23:215-9.
 163. Ladenstein R, Ambros IM, Potschger U, Amann G, Urban C, Fink FM, Schmit K, Jones R, Slociak M, Schilling F, Ritter J, Berthold F, Gadner H, Ambros PF. Prognostic significance of DNA di-tetraploidy in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*. 2001;36:83-92.

164. Vettenranta K, Aalto Y, Wikstrom S, Knuutila S, Saarinen-Pinkala U. Comparative genomic hybridization reveals changes in DNA-copy number in poor-risk neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001;125:125-30.
165. Ambros IM, Zellner A, Roald B. Role of ploidy, chromosome 1p and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1996;334:1505-11.
166. Look AT, Hayes FA, Schuster JJ. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 1991;9:581-91.
167. Borrelo MG, Bongarzone I, Pierotti MA, Luksch R, Gasparini M, Collini P, Pilotti S, Rizzeti MG, Mondellini P, De-Bernardi B. Trk and ret-oncogene expression in human neuroblastoma specimens: high frequency of trk expression in non-advanced stages. *Int J Cancer.* 1993;54:540-5.
168. Nakagawara A, Arenia A, Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM. Association between high levels of expression of the trk gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1993;328:847-54.
169. Ryden M, Sehgal R, Dominici C, Shilling FH, Ibanez CF, Kogner P. Expression of mRNA for the neurotrophin receptor trkC in neuroblastomas with favourable tumours stage and good prognosis. *Br J Cancer.* 1996;74:773-9.
170. Yamashiro DJ, Nakagawara A, Ikegaki N. Expression of TrkC in favorable human neuroblastoma. *Oncogene.* 1996;12:37-41.
171. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ. Expression and function of TrkB and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol.* 1994;14:759-67.
172. Brodeur GM, Nakagawara A, Yamashiro DJ. Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastoma. *J Neuro-Oncol.* 1996;12:37-41.
173. Baudino TA, Cleveland JL. The Max Network Gone Mad (minireview). *Mol Cell Biol.* 2001;21:691-702.

174. Chan H, Haddad G, Thorner PS, De Boer G, Lin YP, Ondrusek N, Yeger H, Ling VP. P-glicoprotein expression as a predictor of the outcome therapy for neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1991;325:1608-14.
175. La Quaglia MP, Kopp EB, Spengler BA, Meyers MB, Biedler J. Multidrug resistance in human neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg*. 1991;26:1107-12.
176. Dhooze CR, Moerlose BM, Benoit YC, Roy N, Philippe LGG. Expression of the MDR1 gene product P-glycoprotein in childhood neuroblastoma. *Cancer*. 1997;80:1250-7.
177. Norris MD, Bordow SB, Marshal GM. Association between high levels of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene and poor outcome in primary human neuroblastoma. *N Engl J Med*. 1996;334:231-6.
178. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nature Med*. 1995;1:249-55.
179. Brodeur GM, Ambros PF. Genetic and biological markers of prognosis in neuroblastoma. In: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voute P.(eds) *Neuroblastoma*. New York: Elsevier Science B. V; 2000. p.355-69.
180. Nakagawara A, Nakamura Y, Ikeda H. High levels of expression and nuclear localization of interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) and CPP-32 in human neuroblastomas. *Cancer Res*. 1997;57:4578-84.
181. Kramer K, Cheung NK, Gerald WL. Correlation of MYCN amplification, TrkA and CD44 expression with clinical stage in 250 patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 1997;33:2098-100.
182. Korja M, Jokilampi A, Salmi TT, Kalimo H, Pelliniemi TT, Isola J, Rantala I, Haapasalo H, Finne J. Absence of polysialylated NCAM is an unfavorable prognostic phenotype for advanced stage neuroblastoma. *BMC Cancer*. 2009;9:57.

183. Hayes FA, Green AA, Mauer AM. Correlation of cell kinetic and *clinical* response to chemotherapy in disseminated neuroblastoma. *Cancer Res.* 1977;37:3766-70.
184. Hayes FA, Mauer AM. Cellkinetics and chemotherapy in neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 1976;57:697-9.
185. Thurman WG, Fernbach DJ, Sullivan MP. Cyclophosphamide therapy in childhood neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1964;270:1336-40.
186. James DH, George P. Vincristine in children with malignant solid tumours. *J Pediatr.* 1964;64:534-42.
187. Pratt CB, Shanks EC. Doxorubicin in treatment of malignant solid tumors in children. *Am J Dis Child.* 1974;127:534-6.
188. Carli M, Green AA, Hayes FA. Therapeutic efficacy of single drugs for childhood neuroblastoma: a review. In: Raybaud E, Clement R, Lebreuil G, Bernard JL, eds. *Pediatric oncology*. Amsterdam: Excerpta Medica; 1982. p.141-50.
189. Filkelstein JZ, Albo V, Ertel I. 5- (3,3 dimethyl-1-triazeno) imidazole-4-carboxamide in the treatment of solid tumors of children. *Cancer Chemother Rep.* 1975;59:351-7.
190. De Bernardi B, Comelli A, Cozzutto C. Peptichemio in advanced neuroblastoma. *Cancer Treat Rep.* 1978;62:811-7.
191. Bleyer WA, Krivit W, Chard RL. Phase II study of VM-26 in acute leukemia, neuroblastoma and other refractory childhood malignancies: a report from the Children's Cancer Study Group. *Cancer Treat Rep.* 1979;63:977-81.
192. Samuels LD, Newton WA, Heyn R. Daunorubicin therapy in advanced neuroblastoma. *Cancer.* 1971;27:831-4.

193. Nitschke R, Starling KA, Vats T. Cis-diamminedichloroplatinum in childhood malignancies; a Southwest Oncology Group Study. *Med Pediatr Oncol.* 1978;4:127-32.
194. De Kraker J, Pritchard J, Hartmann O, Niname J. Single agent ifosfamide in patients with recurrent neuroblastoma (ENSG study2). European Neuroblastoma Study Group. *Pediatr Hematol Oncol.* 1987;4:101-4.
195. Kellie SJ, De Kraker J, Lilleyman JS, Bowman A, Pritchard J. Ifosfamide in previously untreated disseminated neuroblastoma. Results of study 3A of the European Neuroblastoma Study Group. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1988;24:903-8.
196. Ettinger LJ, Gaynon PS, Krailo MD, Ru N, Baum ES, Siegel S, Hammond GD. A phase II study of carboplatin in children with recurrent or progressive solid tumors. A report from the Children's Cancer Group. *Cancer.* 1994;73:1297-301.
197. Pritchard J, Whelan R, Hill BT. Sequential cis-platinum and VM26 in neuroblastoma: laboratory and clinical (OPEC regimen) studies. In: Evans A, D'Angio GJ, Seeger RC, eds. *Advances in neuroblastoma research.* New York: Raven Press; 1985. p.545-55.
198. Green AA, Hayes FA, Pratt CB, Evans W, Howarth CB, Senzer N. Phase II evaluation of cis-platin in children with neuroblastoma and other malignant solid tumors. In: Crooke S, Prestayko A, Carter S, eds. *Cis-platinum: Current status and new developments.* New York: Academic Press; 1980. p.477-84.
199. Philip T, Ghalie R, Pinkerton R, Zucker JM, Bernard JL, Leverger G, Hartmann O. A phase II study of high-dose cisplatin and VP-16 in neuroblastoma; a report from the Société Française d'Oncologie Pédiatrique. *J Clin Oncol.* 1987;5:941-50.
200. Rivera G, Green A, Hayes FA, Avery T, Pratt C. Etoposide VM-26 in the treatment of childhood neuroblastoma. *Cancer Treat Rep.* 1977;61:1243-8.

201. Wilson PCG, Coppes MJ, Sohl H, Chan HSL, Jenkin D, Greenberg ML, Weitzman S. Neuroblastoma stage IV-S: a heterogeneous disease. *Med Pediatr Oncol.* 1991;19:467-72.
202. Sawaguchi S, Kaneko M, Uchino J, Takeda T, Iwafuchi M, Matsuyama S, Takahashi H, Nakajo T, Hoshi Y, Okabe I, Yokoyama J, Nishihira H, Sasaki S, Sakurai M, Sawada T, Nagahara N, Tsuchida Y. Treatment of advanced neuroblastoma with emphasis on intensive induction chemotherapy. A report from the Study Group of Japan. *Cancer.* 1990;66:1879-87.
203. Pinkerton CR, Zucker JM, Hartmann O, Pritchard J, Broadbent V, Morris-Jones P, Breatnach F, Craft AE, Pearson ADJ, Wallendszus KR, Philip T. Short duration, high dose, alternating chemotherapy in metastatic neuroblastoma. (ENSG 3 C induction regimen). *Br J Cancer.* 1990;62:319-23.
204. Haase GM, O'Leary MC, Ramsay NK, Romansky SG, Stram D, Seeger RC, Hammond GD. Aggressive surgery combined with intensive chemotherapy improves survival in poor-risk neuroblastoma. *J Pediatr Surg.* 1991;26:1119-24.
205. Watts RG. Combination chemotherapy with ifosfamide and etoposide is effective in the treatment of central nervous system metastasis of childhood neuroblastoma. *Cancer.* 1992;69:3012-4.
206. Philip T. Overview of current treatment of neuroblastoma. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1992;14:97-102.
207. West DR, Shamberger RC, Macklis RM, Kozakewich HPW, Wayne AS, Kreissman SG, Korf BR, Lavally B, Grier HE. Stage III neuroblastoma over 1 year of age at diagnosis: improved survival with intensive multimodality therapy including multiple alkylating agents. *J Clin Oncol.* 1993;11:84-90.
208. Garaventa A, De Bernardi B, Pianca C, Donfrancesco A, Di Montezemolo LC, Di Tulio MT, Bagnulo S, Mancini A, Carli M, Pession A, Arrighini A, Di Cataldo A, Tamaro P, Iasonni V, Taccone A, Rogers D, Boni L. Localized

- but unresectable neuroblastoma: treatment and outcome of 145 cases. *J Clin Oncol*. 1993;11:1770-9.
209. Hartmann O, Favrot MC. Neuroblastomes. Aspects cliniques et therapeutiques actuels. Apports de la biologie moderne. *Rev Prat*. 1993;43:2182-6.
 210. Craft AW, Pearson AD. Three decades of chemotherapy for childhood cancer: from cure at any cost to cure at least cost. *Cancer Surv*. 1989;8:605-29.
 211. Tubergen DG, Stewart CF, Pratt CB. Phase I trial pharmacokinetics and pharmacodynamics study of topotecan using a five day course in children with refractory solid tumours: a Pediatric Oncology Group study. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1996;18:352-9.
 212. Pratt CB, Stewart C, Santana VM. Phase I study of topotecan for pediatric patients with malignant solid tumours. *J Clin Oncol*. 1994;12:539-43.
 213. Nitschke R, Parkhurst J, Sullivan J. Topotecan in pediatric patients with recurrent and progressive solid tumors: a Pediatric Oncology Group study. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1998;20:315-8.
 214. Goldie JH, Coldman A. Quantitative model for multiple levels of drug resistance in clinical tumors. *Cancer Treat Rep*. 1983;67:923-31.
 215. Gehan E. Dose response relationship in clinical oncology. *Cancer*. 1984;54:1204-7.
 216. Frei E, Teicher BA, Holden SA. Preclinical studies and clinical correlation of the effect of alkylating dose. *Cancer Res*. 1988;48:4717-23.
 217. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP. Treatment of high risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *N Engl J Med*. 1999;341:1165-73.

218. Matthay KK, Reynolds P, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, Haas-Kogan D, Gerbing RB, London WB, Villablanca JG. Long-Term Results for children with high-risk neuroblastoma treated on randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-Retinoic Acid: A Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 2009;27:1007-13.
219. Berthold F, Boos J, Burdach S, et al. Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: A randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2005;6:649-58.
220. Pritchard J, Cotterill SJ, Germond SM, Imeson J, de Kraker J, Jones DR. High dose melphalan in the treatment of advanced neuroblastoma: Results of a randomized trial (ENSG-1) by the European Neuroblastoma Study Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2005;44:348-57.
221. Voûte PA. Radionuclide therapy of neuroblastoma: ¹³¹I- Meta-iodobenzylguanidine (MIBG). In: Brodeur GM, Sawada T, Tsuchida Y, Voûte PA, eds. *Neuroblastoma*. New York: Elsevier Science; 2000. p.471-7.
222. Datz M, Odone-Filho V, Maluf PT. Estudo fase 1 de LDE acoplado a Carmustine em neoplasias sólidas pediátricas. VII Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, 2000. p.44.
223. Schiengold M, Ramos ALLP, Aguiar CE, Schwartzmann G, Nardi NB. Resistência a múltiplas drogas: genética e fisiologia da glicoproteína Pgp. *Acta Oncol Bras*. 1995;14:153-60.
224. Machado TMS. *Utilização do Verapamil como modulador de resistência a drogas em pacientes portadores de neuroblastoma avançado*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo; 2000.
225. Wassberg E, Christofferson R. Angiostatic treatment of neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 1997;33:2020-3.
226. Clagett DM, Verhalen TJ, Biedler JL, Repa JJ. Identification and characterization of all-trans-retinoic acid receptor transcripts and receptor

- protein in human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 1993;300:684-93.
227. Lie SO. 13-Cis-retinoic acid as continuation therapy in children with advanced neuroblastoma in complete or good partial remission. *Med Ped Oncol.* 1990;18:384.
 228. Bowman L, Grossman M, Rill D. UL-2 adenovector-transduced autologous tumor cells induce antitumor immune responses in patients with neuroblastoma. *Blood.* 1998;92:1941-9.
 229. Cheung NKV, Kushner BH, Cheung IY. Anti-G_{d2} antibody treatment of minimal residual stage 4 neuroblastoma diagnosed at more than 1 year of age. *J Clin Oncol.* 1998;16:3053-60.
 230. Trinchieri G. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int Rev Immunol.* 1998;16:365-96.
 231. Siapati KE, Barker S, Kinnon C, Michalski A, Anderson R, Brickell P, Thrasher AJ, Hart SL. Improved antitumor immunity in murine neuroblastoma using a combination of IL2 and IL12. *Br J Cancer.* 2003;88:1642-8.
 232. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:713-58.
 233. Linuma H, Okinaga K, Fukushima R, Inaba T, Iwasaki K, Okinaga A, Takahashi I, Kaneko M. Superior protective and therapeutic effects of IL12 and IL18 gene transduced dendrite neuroblastoma fusion cells on liver metastasis of murine neuroblastoma. *J Immunol.* 2006;176:3461-9.
 234. Bugis SP, Lotzova E, Savage HE, Hester JP, Racz T, Sacks PG, Schantz SP. Inhibition of lymphokine activated killer cell generation by blocking factors in sera of patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 1990;31:176-81.

235. Shurin GV, Shurin MR, Bykovkaia S, Shogan J, Lotze MT, Barksdale EM. Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Res.* 2001;61:363-9.
236. Sietsma H, Nijhof W, Dontje B, Vellenga E, Kamps WA, Kok JW. Inhibition of hemopoiesis in vivo by neuroblastoma derived gangliosides. *Cancer Res.* 1998;58:4840-4.
237. Huebener N, Fest S, Standsby A, Michalsky E, Preissner R, Zeng Y, Gaedicke G, Lode HN. A rationally designed tyrosine hydroxylase DNA vaccine induces specific antineuroblastoma immunity. *Mol. Cancer Ther.* 2008;7:2241-51.
238. Geiger JD, Hutchinson RJ, Hohenkirk LF, McKenna EA, Yanik GA, Levine JE, Chang AE, Braun TM, Mule JJ. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res.* 2001;61:8513-9.
239. Caruso DA, Orme LM, Amor GM, Neale AM, Radcliff FJ, Downey P, Tang ML, Ashley DM. Results of a Phase I study utilizing monocyte derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children with stage 4 neuroblastoma. *Cancer.* 2005;103:1280-91.
240. Bowman L, Grossmann M, Rill D, Brown M, Zhong WY, Alexander B, Leiming T, Coustan SE, Campana D, Jenkins J, Woods D, Kitchingman G, Vanin E, Brenner M. IL-2 adenovector-transduced autologous tumor cells induce antitumor immune responses in patients with neuroblastoma. *Blood.* 1998;92:1941-9.
241. Weiner GJ. Monoclonal antibody mechanisms of action in cancer. *Immunol Res.* 2007;39:271-8.
242. Zafir LI, Michaeli Y, Reiter Y. Novel antibodies as anticancer agents. *Oncogene.* 2007;26:3714-33.
243. Weiner GJ. Monoclonal antibody mechanisms of action in cancer. *Immunol Res.* 2007;39:271-78.

244. Wu ZL, Schwartz E, Seeger R, Ladisch S. Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas. *Cancer Res.* 1986;46:440-3.
245. Cheung NK, Saarinem UM, Neely JE, Landmeier B, Donovan D, Coccia PF. Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 1985;45:2642-9.
246. Cheung NK, Kushner BH, Cheung IY, Kramer K, Canete A, Gerald W, Bonilla MA, Finn R, Yeh SJ, Larson SM. G(D2) antibody treatment of minimal residual stage 4 neuroblastoma diagnosed at more than 1 year of age. *J Clin Oncol.* 1998;16:3053-60.
247. Frost JD, Hank JA, Reaman GH, Friedrich S, Seeger RC, Gan J, Anderson PM, Ettinger LJ, Cairo MS, Blazar BR, Krailo MD, Matthay KK, Reisfeld RA, Sondel PM. A phase I/IB trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14 G2a plus interleukin-2 in children with refractory neuroblastoma: a report of the Children's Cancer Group. *Cancer.* 1997;80:317-33.
248. Gillies SD, Lo KM, Wesolowski J. High-level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes. *J Immunol Methods.* 1989;125:191-202.
249. Handgretinger R, Anderson K, Lang P, Dopfer R, Klingebiel T, Niethammer D. A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 1995;31:261-7.
250. Yu AL, Uttenreuther Fischer MM, Huangc S, Tsui CC, Gillies SD, Reisfeld RA, Kung FH. Phase I trial of human mouse chimeric anti disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 1998;16:2169-80.
251. Simon T, Hero B, Faldum A, Handgretinger R, Schrappe M, Niethammer D, Berthold F. Consolidation treatment with chimeric and GD2 antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 2004;22:3549-57.

252. Osenga KL, Hank JA, Albertini MR, Gan J, Sternberg AG, Eickhoff J, Seeger RC, Matthay KK, Reynolds CP, Krailo M, Adamson PC, Reisfeld RA, Gillies SD, Sondel PM. A phase I clinical trial of the hu14.18 IL2 (EMD 273063) as a treatment for children with refractory or recurrent neuroblastoma and melanoma: a study of the Children's Oncology Group. *Clin Cancer Res.* 2006;12:1750-9.
253. Shusterman S, London WB, Gillies SD, Hank JA, Voss S, Seeger RC, Hecht T, Reisfeld JM, Maris PM, Sondel PM. Anti neuroblastoma activity of hu 14.18 IL2 against minimal residual disease in a Children's Oncology Group (COG) phase II study. *Proc Am Soc Oncol.* 2008;26:132.
254. Ladenstein R, Lasset C, Hartmann O, Klingebiel T, Bouffet E, Gadner H, Paolucci P, Burdach S, Chauvin F, Pinkerton R. Comparison of auto versus allografting as consolidation of primary treatments in advanced neuroblastoma over one year of age at diagnosis: report from the European Group for Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1994;14:37-46.
255. Matthay KK, Seeger RC, Reynolds CP, Stram DO, O'Leary MC, Harris RC, Selch M, Atkinson JB, Haase GM, Ramsay NK. Allogenic versus autologous purged bone marrow transplantation for neuroblastoma: a report from the Childrens Cancer Group. *J Clin Oncol.* 1994;12:2382-9.
256. Inoue M, Nakano T, Yoneda A, Nishikawa M, Nakayama M, Yumura-Yagi K, Sakata N, Yasui M, Okamura T, Kawa K. Graft-versus-tumor effect in a patient with advanced neuroblastoma Who received HLA haplo-identical bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:103-6.
257. Lang P, Pfeiffer M, Muller I, Schumm M, Ebinger M, Koscielniak E, Feuchtinger T, Foll J, Martin D, Handgretinger R. Haploidentical stem cell transplantation in patients with pediatric solid tumors: preliminary results of a pilot study and analysis of graft versus tumor effects. *Klin Pediatr.* 2006;218:321-6.
258. Yoshida H, Kusuki S, Hashii Y, Ohta H, Morio T, Ozono K. Ex vivo-expanded donor CD4 (+) lymphocyte infusion against relapsing

- neuroblastoma. A transient graft-versus-tumor effect. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;52:895-7
259. Tuchman M, Auray-Blais C, Ramnaraine M, Neglia J, Krivit W, Lemieux B. Determination of urinary homovanillic and vanillylmandelic acids from dried filter paper samples: assessment of potential methods for neuroblastoma screening. *Clin Biochem*. 1987;20:173-7.
 260. Sawada T, Hirayama M, Nakata T. Mass screening for neuroblastoma in infants in Japan: interim report of a mass screening study group. *Lancet*. 1987;11:271-3.
 261. Nishi M, Miyake H, Takeda T. Effects of the mass screening of neuroblastoma in Sapporo City. *Cancer*. 1987;60:433-6.
 262. Tuchman M, Woods WG. Introduction: neuroblastoma screening. Laboratory, clinical and epidemiological aspects. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1992;14:95-6.
 263. Woods WG, Gao RN, Shuster JJ, Robison LL, Bernstein M, Weitzman S, Bunin G, Levy I, Brossard J, Dougherty G, Tuchman M, Lemieux B. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2002;346:1084-5.
 264. Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Fehse N, Hero B, Klein G, Sander J, Schwartz K, Trenner J, Zorn U, Michaelis J. Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med*. 2002;346:1084-85.
 265. Yamamoto K, Hanada R, Kikushi A, Ichikawa M, Aihara T, Oguma E, Moritani T, Shimanuki Y, Tanimura M, Hayashi Y. Spontaneous regression of localized neuroblastoma detected by mass screening. *J Clin Oncol*. 1998;16:1265-9.
 266. Mota JAC. Avaliação do estado nutricional na infância. In: Péret FLA (ed). *Suporte nutricional em gastroenterologia pediátrica*. 1st ed. Rio de Janeiro: Medsi; 1994. p.34-42.

267. Giesecke J. *Modern infectious disease epidemiology*. 1st ed. London: Arnold Publications; 1994. p.245-51.
268. Pearson ADJ, Philip T. *Neuroblastoma*. New York: Elsevier Science; 2000. p.551-60.
269. Bernstein ML, Leclerc JM, Bunim G. A population based study of neuroblastoma incidence, survival and mortality in North America. Proceedings; 2nd International Symposium-Neuroblastoma Screening. Minneapolis, Minnesota, USA, 1991. p.4.
270. Holcomb GW, Ziegler MM. Nutrition and cancer in children. *Surg Ann*. 1990;22:129-42.
271. Dallman PR. New approaches to screening for iron deficiency. *J Pediatr*. 1979;94:26.
272. McEllwain TJ, Hedley DW, Gordon MY, Jarman M, Pritchard J. High-dose melphalan and non-cryopreserved autologous bone marrow treatment of malignant melanoma and neuroblastoma. *Exp Hematol*. 1979;7:360-5.