

Leila Neves Bastos Borim

**Estudo da expressão de *MYCN* em neuroblastomas que não o
amplifiquem: correlação com estádios e relevância como fator de
prognóstico**

Tese apresentada ao Departamento de
Pediatria da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Pediatria
Orientador: Prof. Dr. Vicente Odone Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Scrideli

São Paulo
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Borim, Leila Neves Bastos

**Estudo da expressão de MYCN em neuroblastomas que não o amplifiquem :
correlação com estádios e relevância como fator de prognóstico / Leila Neves
Bastos Borim. -- São Paulo, 2005.**

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

Área de concentração: Pediatria.

Orientador: Vicente Odone Filho.

Co-orientador: Carlos Scrideli.

Descritores: 1.NEUROBLASTOMA/fisiopatologia 2.PROGNÓSTICO 3.RNA
MESSAGEIRO

USP/FM/SBD-335/05

à m inha tia , que cam inhou junto m e dando am ore e força
a os m eus filhos, que m e deram esperan ça
e à m inha m ãe, por tudo

Aviso

Quando envelhecer vou usar púrpura
com chapéu vermelho, que não combina.
Vou gastar a pensão em uísque e luvas de verão
e sandálias de cetim – e dizer
que não temos dinheiro para manteiga.
Vou sentar na calçada quando me cansar
e devorar as ofertas do supermercado, tocar as campainhas
e passar a bengala nas grades das praças
e compensar toda a sobriedade da minha juventude.
Vou andar na chuva de chinelos,
apanhar flores no jardim dos outros
e aprender a cuspir.
A gente pode usar camisas horríveis e engordar,
comer um quilo de salsichas de uma vez
ou só pão com pickles a semana inteira
e juntar canetas e lápis e bolachas de cerveja
e coisas em caixinhas.
Mas agora temos que usar roupa que nos deixe secos,
pagar aluguel, não dizer palavrão na rua
e ser bom exemplo para as crianças.
Temos de ler jornal e convidar amigos para jantar.
Mas quem sabe eu devia treinar um pouco agora?
Assim os outros não vão ficar chocados demais
quando de repente eu for velha e usar vestido púrpura.

Jenny Joseph

Prof. Dr. Vicente Odone Filho o seu amor e o seu respeito ao ser humano fazem com que seja uma pessoa especial. Chego aqui através de sua orientação que me conduziu com carinho, compreendeu meus limites e me ajudou a superá-los. Neste período como doutoranda descobri o quanto o senhor é especial. Muito obrigada !

Especial, também, é aquele que ciente de seus conhecimentos disponibiliza seu tempo, como fez o Prof. Dr. Carlos Scrideli. Muito obrigada!

Dividir o conhecimento nem sempre é fácil e só o faz quem, como o Prof. Dr. Israel Bendit, é especial. Obrigada!

Pessoas especiais permanecem eternamente em nossa vida e em momentos importantes são lembradas. Assim, carinhosamente lembro e agradeço ao Prof. Dr. Ivan de Lucena Angulo que me conduziu pacientemente no aprendizado da hematologia e ao Dr. Alois Bianchi que carinhosamente me proporcionou o primeiro contato com a oncologia pediátrica.

E por fim, porém muito especial, à Prof. Dra. Beatriz de Camargo por toda amizade, carinho e presença em todos os momentos da minha vida, felizes ou tristes, e pelo auxílio constante no tratamento médico das crianças.

Meu obrigado especial à (ao) (s):

Sra. Denize e sra. Mariangela, secretárias da Pós-graduação do Departamento de Pediatria

João, funcionário no SAME do ITACI

Sra. Maria Aparecida e sra. Marinalva, responsáveis pela confecção das fichas catalográficas na biblioteca da FMUSP

Funcionários e pós-graduandos no Laboratório de Biologia Tumoral da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo

Diretoria da FUNFARME em SJRio Preto, em especial ao Dr. Jorge Fares e Dra. Ana Luiza AAS Rodriguez

Diretoria FAMERP e ao Departamento Pediatria e Cirurgia Pediátrica, em especial ao Prof. Dr. Airton C Moscardini, ao Prof. Dr. Antonio Augusto C dos Santos e ao Prof. Dr. Rafael Liberatore

Dra. Renata, médica oncopediatra da FUNFARME em S J Rio Preto

Dra. Elitânia, médica oncopediatra de Sorocaba

Dra. Cristina, médica oncopediatra de São José dos Campos

Dra. Ana Paula, médica oncopediatra de Curitiba

Dr. Algemir Brunetto, médico oncopediatra de Porto Alegre

Papai e Lydia, obrigada.

Aldenis, Marcelo, Gabriela e Eduardo, valeu.

Com amor para vocês.

Oração Irlandesa

Tenha tempo para o trabalho, este é o preço do sucesso.

Tenha tempo para pensar, esta é a fonte do poder.

Tenha tempo para participar, este é o segredo da juventude.

Tenha tempo para ler, esta é a fonte da sabedoria.

Tenha tempo para ser amável, este é o caminho à felicidade.

Tenha tempo para os sonhos, eles conduzem às estrelas.

Tenha tempo para amar e ser amado, este é um privilégio dos deuses.

Tenha tempo para olhar em volta, o tempo é curto para o egoísmo.

Tenha tempo para sorrir, é a música da alma.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com:

- a) *Guia de apresentação de dissertações e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo. Serviço de Biblioteca e Documentação. 2004.
- b) Referências: adaptado de “International Committee of Medical Journals Editors” (Vancouver) Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina Serviço de Biblioteca e Documentação.
- c) Abreviaturas dos títulos dos periódicos: de acordo com “List of Journals Indexed in Index Medicus”.

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
3.1 Patologia	06
3.2 Estadiamento tumoral	07
3.3 Fatores de prognóstico	08
4. MÉTODOS	14
4.1 Casuística	14
4.2 Amostra tumoral	18
4.3 Critérios e definições	19
4.4 Análise estatística	21
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSSÃO	40
6.1 Caracterização da casuística	40
7. CONCLUSÃO	54
8. ANEXOS	55
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	61

Apêndice

Resumo

Borim LNB. Estudo da expressão de *MYCN* em neuroblastomas que não o amplifiquem: correlação com estádios e relevância como fator de prognóstico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 72p.

INTRODUÇÃO: A relevância da expressão *MYCN* em neuroblastomas sem amplificação, diferentemente do seu aumento quando amplificado, permanece controverso. Neste trabalho, avaliou-se a relação do nível de expressão do transcrito *MYCN* em neuroblastoma não amplificado com os fatores clínicos e biológicos de prognóstico. **MÉTODOS:** Neste estudo observacional realizado entre janeiro de 2000 e dezembro de 2004, foram aferidos os valores do nível de expressão *MYCN* em 29 amostras tumorais, pela técnica RQ-PCR, no Laboratório de Biologia Tumoral da Fundação Pró-Sangue de São Paulo. Seus resultados foram analisados em relação à idade ao diagnóstico, ao estadiamento tumoral, ao grupo de risco, à ocorrência de recaída tumoral e de óbito. **RESULTADOS:** Foram nove crianças com idade <1 ano e 20 com idade ≥ 1 ano, os valores da expressão do transcrito *MYCN* variaram de 0,041 e 27,569, mediana 3,193. O estadiamento foi: quatro estágio 1; três estágio 2; oito estágio 3 e 14 crianças estágio 4. Entre 20 crianças com classificação patológica, 11 foram favoráveis e nove desfavoráveis. Considerando a mediana dos valores expressos a estratificação em grupos de risco com aumento da expressão foram: cinco crianças baixo risco; quatro risco intermediário e cinco alto risco. Grupos de risco sem aumento da expressão foram: duas crianças baixo risco; quatro risco intermediário e nove alto risco. Vinte e oito crianças obtiveram remissão completa e entre elas 14 apresentaram

doença progressiva, sendo que sete morreram. As variáveis clínicas e biológicas não apresentaram frequências diferentes entre os grupos de risco sem e com aumento de expressão. Entre os grupo alto risco e não alto-risco as variáveis idade, recaída tumoral e óbito apresentaram resultado com significado estatístico quando não se considerou o valor da expressão e quando não houve o seu aumento. Entre os grupos alto risco e não-alto risco com aumento da expressão apenas a idade apresentou resultado com significado estatístico. **CONCLUSÃO:** Em crianças com estágio clínico não avançado o nível de expressão parece exercer uma relevância clínica, sugerindo um efeito protetor quanto menor for o aumento da expressão MYCN.

Summary

Borim LNB. Study of the *MYCN* expression in non-amplified neuroblastomas: correlation with tumor states and relevance as a prognostic factor [thesis]. São Paulo: 'Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo'; 2005. 72p.

INTRODUCTION: *MYCN* expression value in non-amplified neuroblastomas remains a controversial issue. In order to add contributions to this field, children with non-amplified neuroblastomas were studied regarding their expression and correlation with clinical and other biological factors. METHODS: Twenty nine tumor samples obtained from non-consecutive patients admitted from January, 2000 through December, 2004, had their *MYCN* transcript expression levels evaluated according to the RQ-PCR assay, at the Tumoral Biology of Laboratory of the 'Fundação Pró -Sangue Hemocentro de São Paulo', and compared to the following other factor: age at onset; tumor stage; risk-group; tumoral relapse rate and death. RESULTS: nine under one-year-old children and 20 over one-year-old children, with *MYCN* transcription expression level between 0.041 and 27.569, mean 3.193. Four children were stage 1, three were stage 2, stage 3 in eight and stage 4 in 14 children. In 20 patients with pathological classifications, 11 were favorable and nine unfavorable histology. Children whose expression level was above the mean were stratified as follows according to risk groups: five low-risk; four intermediate-risk and five high-risk patients. The ones whose expression level was under the mean were two low-risk, four intermediate-risk and nine high-risk patients. Twenty eight children achieved complete remission, with 14 recurrences, with seven deaths. The only factor associated to highly expressed *MYCN* patients was tumoral state.

CONCLUSION: In children with non-advanced-stage disease low levels of expression might be a relevant favorable prognostic factor.

1 – INTRODUÇÃO

O prognóstico de paciente portador de neuroblastoma, a terceira neoplasia maligna sólida mais comum em criança até 15 anos, relaciona-se com alterações genéticas adquiridas nas células tumorais. Devido a uma característica biológica agressiva é responsável por aproximadamente 15% das mortes decorrentes de neoplasia maligna em criança até 15 anos (Bown, 2001; Brodeur, 2003).

Além das alterações genéticas numéricas e estruturais, alterações na expressão de proto-oncogene relacionado com a diferenciação neuronal estão sendo pesquisadas (Alaminos et al, 2003). Entretanto, a complexidade das alterações podem impedir que um determinado fator clínico ou biológico seja devidamente evidenciado (Mora et al, 2002; Schwan et al, 2003).

Quando o gene *MYCN* está amplificado apresenta um aumento no nível da expressão gênica alterando a atuação de outros genes, comprometendo o mecanismo normal de crescimento, diferenciação e apoptose celular (Brodeur e Seeger, 1986; Hogarty, 2003; Van Noesel et al, 2003).

Quando a célula tumoral do neuroblastoma desenvolve maturação natural ou química há uma queda no nível da expressão *MYCN* e o significado clínico, diferentemente do seu aumento, permanece controverso (Hiyama et al, 2004). A expressão da proteína *MYCN* seria um fator de prognóstico mesmo na ausência da amplificação do gene *MYCN* ? (Matthay, 2000; Spitz et al, 2004).

Estudos relacionados à expressão *MYCN* foram realizados baseando-se na evidência de que o neuroblastoma é um tumor biologicamente heterogêneo e os grupos

de risco são determinados por fatores biológicos e clínicos (Brodeur et al, 1997; Westermann e Schawn, 2002). Alguns autores relataram que a expressão do *MYCN* sem amplificação é um fator de prognóstico independente e está correlacionado com a evolução clínica desfavorável da doença (Chan et al, 1997). Estes resultados foram reproduzidos ou não por outros autores (Nagakawara et al, 1992; Bordow et al, 1998; Cohn et al, 2000). Diminuição da SLE na criança com idade ≥ 1 ano, valor inexprimível da proteína *MYCN* em doença avançada ou expressão relativamente alta com evolução clínica favorável poderiam indicar um fator adicional contribuindo no fenótipo tumoral, por exemplo, a ativação do gene *MYCN* não amplificado e com expressão proteica normal (Boon et al, 2001; Van Noesel e Versteeg, 2004).

Com o avanço tecnológico hoje é possível conhecermos o perfil gênico de uma célula (Pinho, 2005). Com isso, poderemos detectar quais genes atuam em um mecanismo celular e se estão associados a outros genes ou fatores (Schulte et al, 2005).

Alguns estudos foram desenvolvidos para analisarem a expressão *MYCN* na célula do neuroblastoma e os genes que estariam ou não com aumento em sua expressão (Boon et al, 2001; Krasnoselsky et al, 2004; Sugihara et al, 2004). Alguns trabalhos avaliaram as expressões gênicas em diferentes estádios ou em classificação histológica favorável e desfavorável relacionando-as com o gene *MYCN* amplificado e não amplificado (Kitanaka et al, 2002; Krasnoselsky et al, 2004).

Observou-se que o estágio tumoral tem um perfil gênico que independe dos outros fatores de prognóstico (Krasnoselsky et al, 2004) e que tumor com histologia favorável tem um perfil gênico distinto do tumor desfavorável (Kitanaka et al, 2002).

A ausência de amplificação do gene *MYCN* com um aumento relativo na expressão da proteína ou transcrito *MYCN* resultaria em um fator biológico ou clínico

significante? Somente o conhecimento relacionado à função da expressão *MYCN* nos mecanismos celulares poderá esclarecer essa questão (Valent et al, 2002; Scott et al, 2003; Tanaka et al, 2004).

2 – OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

- a) Analisar a relevância da expressão do transcrito *MYCN* como elemento de prognóstico em pacientes com neuroblastoma sem amplificação;
- b) Correlacioná-la com os estádios da doença e fatores prognósticos clínicos, neste mesmo grupo.

3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O neuroblastoma foi primeiro descrito por Virchow em 1863 como um glioma da glândula adrenal e no início do século XX determina-se sua origem no tecido nervoso simpático. A sua surpreendente capacidade de maturação é estabelecida em 1927 (Lonergan et al, 2000).

A incidência americana do neuroblastoma em criança menor de 15 anos é de oito crianças/milhão/ano, sendo a terceira neoplasia maligna sólida mais comum representando 8% à 10% nessa faixa etária, porém, corresponde a aproximadamente 15% das mortes decorrentes por neoplasia maligna na criança até 15 anos, devido a sua característica biológica agressiva (Brodeur e Maris, 2002). A idade média ao diagnóstico é de 22 meses, podendo ocorrer também em recém-nascido e inclusive no feto, sendo visualizado pela ultra-sonografia pré-natal (Lukens, 1999; Maris e Denny, 2002).

Como deriva da crista neural, a qual origina o sistema nervoso simpático, ele pode ocorrer em qualquer local que contenha esse tecido, sendo mais freqüente na medula adrenal (35%), no retroperitônio extra-adrenal (30%-35%) e no mediastino posterior (20%). Outros locais são pescoço (1%-5%) e pélvis (2%-3%) (Joshi, 2000; Maris e Denny, 2002; Camargo e Sredni, 2004). Aproximadamente 1% pode apresentar doença metastática sem o local primário definido (Lonergan et al, 2000). Criança com idade ≥ 1 ano, doença metastática ao diagnóstico e evolução clínica desfavorável representa 40% dos pacientes com neuroblastoma. Criança < 1 ano representa $> 10\%$ dos pacientes e podem apresentar regressão espontânea completa com ou sem tratamento

quimioterápico. Criança com doença baixo risco pode apresentar maturação espontânea (incidência mínima) ou induzida pela quimioterapia (Schwab et al, 2003).

3.1– Patologia

O neuroblastoma é descrito como um tumor de pequenas células redondas e azuis e estudos imunohistoquímicos permitem a sua diferenciação com outros tumores histologicamente semelhantes (Sinniah e D’Angio, 1996; Pinho, 2005). São classificados em três sub-tipos histológicos: neuroblastoma; ganglioneuroblastoma e ganglioneuroma (Joshi, 2000).

Eles são tumores de maturação variada, derivados de células da crista neural primordial que formam o sistema nervoso simpático. As células tumorais precursoras podem permanecer indiferenciadas (neuroblastos) ou podem sofrer maturação (células ganglionares e de Schwann). Ele é um tumor primariamente composto por células indiferenciadas e quando totalmente composto por células maduras é denominado ganglioneuroma. Como um grupo, eles definem um espectro de tumor neuroectodérmico simpático, variando da forma imatura (neuroblastomas) para a madura (ganglioneuroma). A presença de tecido imaturo no neuroblastoma e no ganglioneuroblastoma indica um potencial maligno; o ganglioneuroma é considerado benigno (Sinniah e D’Angio, 1996; Joshi, 2000).

“The International Neuroblastoma Pathology Classification” (INPC) descreve dois grupos de prognóstico: favorável e desfavorável. Os fatores determinantes na classificação são a idade ao diagnóstico, a quantidade e tipo de estroma, o grau de diferenciação tumoral e o índice de mitose:cariorréxia (MKI) (Shimada et al, 1999).

Em 1999 Shimada et al demonstraram que a idade é um fator de prognóstico crítico na evolução morfológica do neuroblastoma. O grau de diferenciação neuroblástica, um dos indicadores morfológicos do neuroblastoma, tem valor de prognóstico dependente da idade, porque as células neuroblásticas com potencial de maturação requerem um período de latência *in vivo* para demonstrarem histologicamente esta diferenciação.

A histologia favorável apresenta uma seqüência de maturação dependente da idade ao diagnóstico, iniciando no grau pouco diferenciado (idade <1 ano e 6 meses) para o grau em diferenciação (<5 anos) (Joshi, 2000).

Há uma correlação entre MKI e gene *MYCN*, sendo que MKI alto correlaciona-se com amplificação do gene *MYCN* e o inverso é verdadeiro. O aumento do índice MKI corresponde a um aumento da cariorrexia, isto é, células tumorais apresentando apoptose ou fragmentação do DNA celular induzida pela enzima endonuclease causando morte celular. Porém, é interessante notar que no neuroblastoma além do aumento da cariorrexia, observa-se um aumento concomitante na taxa de mitose (Joshi, 2002).

3.2 – Estadiamento tumoral

Os critérios internacionais de diagnóstico, estadiamento e resposta ao tratamento foram revisados e reestruturados por Brodeur et al em 1993. De acordo com o novo sistema de estadiamento denominado “International Neuroblastoma Staging System” (INSS) o paciente classifica-se em um estágio que depende da abrangência da ressecção cirúrgica, do acometimento de gânglios linfáticos abdominais em tumores irresecáveis e da presença de doença disseminada.

Criança com idade <1 ano, doença disseminada e medula óssea contendo menos de 10% de células neoplásicas, porém sem acometimento ósseo, é classificada como um estágio especial (Brodeur et al, 1993). Segundo Pritchard e Hickman (1994) esse estágio denomina-se IV-S e corresponde ao atual 4S no ‘INSS’. Foi descrito por Evans et al em 1991^(*) e citados por Pritchard e Hickman (1994), sendo que nestes pacientes ocorrem a maioria das regressões espontâneas no neuroblastoma.

3.3 – Fatores de prognóstico

Castleberry et al (1997) estabeleceram um consenso internacional de estratificação em grupos de risco considerando as características clínicas e biológicas do neuroblastoma. Em 2002 o ‘Pediatric Oncology Group (POG)’ e o ‘Children’s Cancer Group (CCG)’ unificaram-se formando o ‘Children’s Oncology Group (COG)’ e revisaram esse sistema de estratificação anterior considerando os fatores de prognóstico. Atualmente, é descrito como ‘COG Risk Stratification System’ e estratifica o paciente em um dos três grupos de risco, considerando os fatores clínicos e biológicos de prognóstico: idade ao diagnóstico e estadiamento tumoral; classificação patológica, índice de DNA e amplificação do gene *MYCN* (Brodeur e Maris, 2002).

^(*) A proposed staging for children with neuroblastoma: Children’s Cancer Study Group A. *Cancer*. 1991;27:3774-78.

a) Fatores clínicos

A idade ao diagnóstico é um fator de prognóstico bem estabelecido e está associado ao estadiamento tumoral. Os indicadores clínicos desfavoráveis são criança com idade ≥ 1 ano e/ou doença avançada (Bown, 2001). Entre as características favoráveis estão criança com idade < 1 ano com uma das seguintes características biológicas: hiperdiploidia, histologia favorável, estágio 1, 2 e 3 e estágio 4 sem amplificação do gene *MYCN* (Look et al, 1984; Shimada et al, 1999; Schmidt et al, 2000).

Entretanto, criança com idade ≥ 1 ano e doença avançada (estádio 4), na maioria das vezes, apresenta uma evolução clínica desfavorável com resistência à quimioterapia e alta taxa de morte e independe da amplificação do gene *MYCN*. Características genéticas e biológicas são fatores desfavoráveis nesse grupo de crianças, tais como, alteração genética numérica (diploidia e tetraploidia), deleção e ganho do cromossomo 1 e 17 (deleção 1p e ganho 17q) e perda da heterozigidade do cromossomo 1 (1p LOH) (Schwab et al, 1996; Brodeur et al, 1997; Abel et al, 1999; Lastowska et al, 2001; Bown, 2001; Westermann e Schwab, 2002; Brodeur, 2002; Van Noesel e Versteeg, 2004).

O mecanismo celular que leva à regressão espontânea no estágio 4-S com doença disseminada não está determinado, algumas alterações sugerem um mecanismo de morte celular por degeneração autofágica, no entanto, o desaparecimento de células neoplásicas e a não transformação ganglioneuromatosa sugerem um mecanismo de apoptose (Matsunaga et al, 2000; Kitanaka et al, 2002; Van Noesel et al, 2003).

b) Fatores biológicos

Entre os fatores biológicos já estabelecidos estão a histologia tumoral, o índice de DNA e a amplificação do gene *MYCN* (Schwab, 2003).

I) Classificação Patológica

É um fator de prognóstico amplamente reconhecido e depende da idade e do estadiamento tumoral (Lastowska et al, 2001).

A associação entre a classificação patológica de prognóstico e o gene *MYCN* distingue quatro sub-tipos de tumores: favorável - não amplificado e favorável - amplificado; desfavorável - não amplificado e desfavorável - amplificado (Goto et al, 2001).

Tumor com classificação desfavorável não apresenta diferenciação neuroblástica e independe da idade, mas a evolução clínica depende da idade. Crianças com idade <1 ano e 6 meses apresentam melhor prognóstico quando comparado com a de outra idade. Tumor não amplificado favorável, estágio 1, 2 ou 4-S apresenta boa evolução clínica (Goto et al, 2001). No tumor com amplificação a classificação favorável é específica para criança <1 ano e 6 meses.

II) Conteúdo celular de DNA (DNAi)

O conteúdo celular de DNA estabelece dois tipos de tumores: os diplóides ($\pm 45\%$) e os triplóides ($\pm 55\%$). Quando o tumor apresenta regressão espontânea e/ou amadurecimento espontâneo, geralmente, é triplóide (Van Noesel e Versteeg, 2004).

A presença de célula tumoral hiperdiplóide é um fator de prognóstico dependente da idade do paciente. O valor de prognóstico da ploidia inexistente após a idade ≥ 2 anos. Provavelmente, a causa está no fato de que criança <1 ano tem um ganho cromossômico sem rearranjo estrutural e tal fato não ocorre em criança com idade ≥ 2

anos (Brodeur, 2003). Criança com idade <1 ano, com qualquer estágio tumoral e DNAi >1 tem uma resposta terapêutica melhor do que a com DNAi =1 (Look et al, 1984).

III) Amplificação do gene *MYCN*

Entre os marcadores biológicos a amplificação do gene *MYCN*, descrita por Seeger et al em 1985, tem importância bem estabelecida, relevância amplamente aceita e independe de fatores clínicos (Westermann e Schwab, 2002; Brodeur, 2003; Schwab et al, 2003). Aproximadamente 30% dos tumores primários apresentam amplificação do gene *MYCN* (Seeger et al, 1985).

O gene *MYCN* está localizado no locus 24 da porção distal do braço curto do cromossomo 2 (2p24) e sua amplificação corresponde citogeneticamente aos corpos cromatínicos “double -minute (dmin)” e as “homogeneously staining regions (hsr)” visualizadas em determinados neuroblastomas (Brodeur e Seeger, 1986; Schwab, 2004).

Em decorrência da amplificação gênica ocorre um aumento no nível da expressão *MYCN* e a sequência de codificação desta proteína, ou seja, a atividade biológica da proteína *MYCN* se mantém tanto na célula normal como na tumoral (Camargo e Sredni, 2004; Schwab, 2004). O perfil gênico de células da linhagem do neuroblastoma demonstraram que a proteína *MYCN* atua no crescimento celular através de genes envolvidos na síntese proteica e na biogênese dos ribossomos (Boon, 2001; Camargo e Sredni, 2004).

No neuroblastoma a amplificação do gene *MYCN* está associada com alterações genéticas estruturais, sendo frequente a deleção 1p, o ganho 17q e células tetraplóides ou diplóides (Camargo e Sredni, 2004; Van Noesel e Versteeg, 2004).

IV) Outros fatores

A deleção do 1p é uma das alterações estruturais mais frequentes no neuroblastoma ocorrendo em aproximadamente 30% dos casos. No neuroblastoma, segundo Bader et al (1991)^(*) citados por Schwab et al (1996), ocorre uma supressão da tumorigenicidade em decorrência da transferência do braço curto desse cromossomo. Embora existam vários locais de quebra no cromossomo 1, a deleção da porção distal do braço curto deste cromossomo (del 1p) é observada na maioria dos casos e está relacionada com evolução clínica desfavorável (Schleiermacher et al, 1994; Schwab et al, 1996; Maris et al, 2001; Brodeur, 2003).

O ganho do cromossomo 17, particularmente 17q, é frequentemente observado sendo que o ganho de todo cromossomo está associado com tumor estágio 1 e 2, enquanto o ganho parcial (17q) está associado com doença avançada (Westermann e Schwab, 2002).

A associação da deleção 1p com o ganho 17q existe num tumor sem amplificação, porém, a amplificação não ocorre sem a del 1p com o ganho 17q, sugerindo que a amplificação é um evento tardio. A presença de deleção 1p com o ganho 17q e amplificação do *MYCN* ocorrem em criança >1 ano, doença avançada e evolução clínica desfavorável (Abel et al, 1999; Lastowska et al, 2001).

^(*) Dissociation of suppression of tumorigenicity and differentiation *in vitro* effected by transfer of single human chromosomes into human neuroblastoma cells. *Cell Growth Diff.* 1991;2:245-55.

O aumento no nível da expressão do receptor *TrkA* para neurotrofina relaciona-se com a evolução celular para uma diferenciação ou apoptose, inversamente o do receptor *TrkB* relaciona-se com o aumento de resistência às drogas e aumento da angiogênese (Naragawara et al, 1993; Castleberry, 1999; Eggert et al, 2000; Ho et al, 2002; Brodeur, 2003; Shimada et al, 2004).

4 – MÉTODOS

4.1 – Casuística

a) Local do estudo

Este estudo realizou-se no Laboratório de Biologia Tumoral da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo onde foram analisadas 32 amostras tumorais de pacientes portadores de neuroblastoma ou ganglioneuroblastoma, sem amplificação do gene *MYCN*.

b) Delineamento do estudo

Estudo observacional de coorte em marcador genético de pacientes portadores de neuroblastoma ou ganglioneuroblastoma.

c) População e período de estudo

Foram incluídas 29 crianças com diagnóstico de neuroblastoma ou ganglioneuroblastoma no período de 01 de janeiro de 2000 a 30 de dezembro de 2004, que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão.

d) Critérios de inclusão

I) Crianças portadoras de neuroblastoma ou ganglioneuroblastoma documentado

II) Idade inferior a 15 anos

III) Estádios 1, 2, 3, 4 e 4S

IV) Sem amplificação do gene *MYCN*

V) Termo de consentimento devidamente assinado

e) Critérios de exclusão

I) Crianças portadoras de ganglioneuroma

II) Amostra tumoral obtida exclusivamente em punção de medula óssea

f) Dados de interesse do estudo

Os dados coletados que identificaram o paciente, o tumor, a terapia e a evolução clínica foram:

I) Paciente: nome completo, sexo, data de nascimento, idade ao diagnóstico.

II) Tumor: local do tumor primário e das metástases quando presentes, classificação patológica de prognóstico, estadiamento tumoral e estratificação em grupo de risco.

III) Terapia: protocolo de tratamento utilizado com a data do início e do término. Caso tenha sido necessária uma segunda terapia, especificou-se a data do início e do término do segundo tratamento.

IV) Evolução clínica: quando houve doença progressiva, especificou-se a data e o tratamento utilizado. Quando remissão tumoral obtida e mantida, data da última avaliação. Na ocorrência de morte, data e causa do evento.

g) Coleta de dados do paciente

À partir do registro elaboramos uma lista com os nomes dos pacientes e seus locais de tratamento. Quando os tratamentos dos pacientes foram realizados no Instituto da Criança ou no Hospital Sírio Libanês, ambos na cidade de São Paulo, os dados de

interesse foram colhidos diretamente dos prontuários médicos, se realizados no Hospital Santa Marcelina, na cidade de São Paulo, os dados foram fornecidos pessoalmente pelo médico responsável ao tratamento e, por fim, quando os tratamentos foram realizados em outras cidades, primeiro estabelecemos um contato telefônico com o médico responsável pelo paciente, explicando nosso interesse e solicitando sua cooperação. À seguir, enviamos uma planilha com as informações de interesse (Apêndice 1). Quando tivemos dúvidas nas respostas fornecidas, novos contatos telefônicos foram realizados.

h) Protocolo de tratamento

Todas as crianças receberam o tratamento de acordo com o seu grupo de risco

I) Grupo Baixo risco

Tratamento cirúrgico exclusivo.

II) Grupo Risco intermediário

Protocolo NEURO-I-80 e NEURO-II-82 modificados (Anexo 1).

III) Grupo Alto risco

Protocolo NEURO-VIII-97 e NEURO-IX-2000 (Anexo 2).

Embora as crianças portadoras de neuroblastoma de alto risco incluídas neste estudo tenham sido submetidas a programas diferentes, todos eles apresentavam em comum o emprego de múltiplas drogas e, necessariamente, derivados de platina, elemento discriminatório dos programas tidos como ideais e aquém do maior potencial. A análise desses vários programas não oferece necessariamente resultados diferentes entre si, o que permite dizer que os vários resultados, analisados em conjunto, representem o que um tratamento convencional pode oferecer em termos terapêuticos a

esse grupo de pacientes, de prognóstico tão sombrio (Odone Filho, 1986; Odone Filho, 1992).

i) Termo de Consentimento

Confirmamos com todos os serviços de Oncologia Pediátrica que enviaram material ao Laboratório de Biologia Tumoral da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo que os responsáveis legais pelo paciente já haviam assinado um Termo de Consentimento ao início do tratamento da criança, o qual foi obtido pelo seu médico responsável.

j) Identificação dos grupos de estudo

Foi estabelecido o nível de expressão do transcrito *MYCN* em cada uma das 29 amostras tumorais deste estudo e, considerando como referência a mediana dos valores obtidos, formamos dois grupos de pacientes: um grupo com o nível de expressão do transcrito *MYCN* acima da mediana e outro igual ou abaixo.

Além destes dois grupos, outros dois grupos foram estabelecidos, considerando a estratificação em grupos de risco de acordo com o “COG Risk Stratification System”.

I) Grupo G-1: paciente com o nível de expressão do transcrito *MYCN* acima da mediana (com aumento da expressão).

II) Grupo G-2: pacientes que apresentaram nível de expressão do transcrito *MYCN* igual ou abaixo da mediana (sem aumento da expressão).

III) Grupo não-AR: pacientes baixo risco e risco intermediário.

IV) Grupo AR: pacientes alto risco.

4.2 – Amostra tumoral

a) Coleta do material

O material de análise foi obtido à partir de amostras criopreservadas retiradas com o objetivo de confirmação do diagnóstico. Para o envio da amostra ao Laboratório de Biologia Tumoral da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo elas eram identificadas e condicionadas em um recipiente térmico com gelo.

b) Identificação da amostra

Através do registro de entrada da amostra no Laboratório de Biologia Tumoral da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo, identificamos 32 amostras tumorais de pacientes com diagnóstico de neuroblastoma, devidamente estocadas e com material genético suficiente e viável para ser utilizado em nosso estudo. Anterior a este estudo e no próprio laboratório, as amostras foram analisadas através da técnica de Quantificação Real da Reação em Cadeia da Polimerase (RQ-PCR) (Raggi et al, 1999) e identificadas sem amplificação do gene *MYCN*.

c) Avaliação do material genético

A avaliação do material genético foi realizada no Laboratório de Biologia Tumoral da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo com a supervisão e orientação do Prof. Dr. Israel Bendit, médico responsável por este serviço.

Na análise da expressão do transcrito *MYCN* foi utilizada a técnica ‘Real Quantitative Polymerase Chain Reaction (RQ-PCR)’ onde foi detectado e mensurado o produto gerado em cada ciclo da reação em cadeia da polimerase (PCR) e este processo

é diretamente proporcional à quantidade de DNA anterior ao início desta reação (Bernard e Wittwer, 2002; Ginzinger, 2002).

I) Condições para análise pelo RQ-PCR

A partir do RNAm da amostra tumoral foi obtido cDNA e realizada a análise da expressão do RNAm *MYCN* pela técnica “RQ-PCR” pelo Prof Dr. Israel Bendit.

As células da glândula hipofisária podem expressar normalmente a proteína *MYCN* (Schwab, 2004). Como haviam amostras de tecido hipofisário normal disponíveis no Laboratório de Biologia Tumoral da Fundação Pró-Sangue do Hemocentro de São Paulo e os valores da expressão do transcrito *MYCN* já haviam sido estabelecidos nestas amostras em outra pesquisa, após confirmarem a autorização para o uso do material, a mediana dos valores expressos em sete amostras da hipófise foi a referência adotada para o cálculo da taxa de PCR em cada amostra (Ct referência) e o gene β_2 *actina* foi o utilizado como controle.

4.3 – Critérios e definições

a) Critérios de diagnóstico

Os critérios de diagnóstico de neuroblastoma foram os estabelecidos pelo “International Neuroblastoma Staging System” (INSS) (Brodeur et al, 1993), os quais são:

I) Inequívoco diagnóstico patológico realizado através de tecido tumoral com ou sem recursos imunohistológicos ou

II) Medula óssea, obtida por punção aspirativa ou biópsia, contendo inequivocamente células neoplásicas e nível sérico ou urinário elevado do ácido vanilmandélico (VMA).

b) Critérios de resposta ao tratamento

Foram de acordo com os critérios previstos no “International Neuroblastoma Staging System” (INSS) (Brodeur et al, 1993).

I) Remissão clínica (RC): desaparecimento de toda doença comensurável, por um tempo mínimo de quatro meses.

II) Doença progressiva (DP): qualquer manifestação de progressão, independente de eventual resposta em outros territórios.

c) Classificação anatomopatológica

Consideramos a “International Neuroblastoma Pathology Classification” (INPC), que classifica o tumor em grupo de prognóstico favorável (F) ou desfavorável (D) de acordo com a quantidade (pobre ou rico) e o tipo (nodular ou não nodular) de estroma, o grau de maturação celular (indiferenciado, em diferenciação, diferenciado), o índice mitose:cariorrexia (MKI) (baixo, intermediário, alto) e a idade do paciente (idade <1 ano 6 meses, ≥ 1 ano e 6 meses e <5 anos e ≥ 5 anos) (Anexo 3).

d) Estadiamento tumoral

Utilizamos o “International Neuroblastoma Staging System” (INSS), o qual classifica os pacientes entre quatro estádios: 1; 2; 3 e 4, quando idade ≥ 1 ano, e entre cinco estádios: 1; 2; 3; 4 e 4S, quando idade <1 ano (Anexo 4).

e) Estratificação em Grupos de Risco

A estratificação foi feita em grupo de baixo risco (BR), risco intermediário (RI) e alto risco (AR), de acordo com a classificação “COG Risk Stratification System”

(Brodeur e Maris, 2002). Nesta classificação considera-se o estágio tumoral (1, 2-A e 2-B, 3, 4 e 4-S), a idade do paciente (idade <1 ano, \geq 1 ano e <21 anos), a histologia (favorável e desfavorável), a ploidia (hipoploidia, normoploidia, hiperploidia) e a amplificação do gene *MYCN* (com amplificação e sem amplificação) (Anexo 5).

f) Terminologia

I) Sobrevida livre de eventos (SLE): é o tempo ocorrido entre o início do tratamento até a doença progressiva, doença progressiva ou morte. Reflete a porcentagem dos pacientes que permaneceram vivos no estudo sem recaídas ou evento fatal de qualquer causa.

II) Sobrevida global (SG): é o tempo ocorrido entre o início do tratamento até a falha do tratamento, definida como morte por qualquer causa.

4.4 – Análise estatística

Analisamos em cada criança os dados clínicos e laboratoriais ao diagnóstico e a sua evolução clínica no período de 01 de janeiro de 2000 a 30 de dezembro de 2004.

Os pacientes que não apresentaram doença progressiva ou morte foram censurados na data de 30 de dezembro de 2004. Pacientes com doença progressiva ou morte foram censurados na data do diagnóstico clínico-laboratorial da constatação de doença progressiva ou da ocorrência da morte. O tempo de seguimento variou entre 1 mês e 53 meses. Os valores de expressão *MYCN* por RQ-PCR variaram entre 0,041 e 27,569.

Realizamos uma análise univariável entre idade ao diagnóstico, o sexo, o grupo de risco e a evolução clínica com o valor da expressão do transcrito *MYCN* entre os pacientes do grupo G-1 e os do grupo G-2. E neles avaliamos os diferentes valores da expressão do transcrito *MYCN* em relação às variáveis de grupo de risco (AR e não-AR), idade ao diagnóstico (<1 ano e ≥ 1 ano), classificação de prognóstico (favorável e desfavorável) e ocorrência ou não de doença progressiva ou morte.

Entre os pacientes de um mesmo grupo G-1 e G-2, em seus diferentes grupos de risco (BR, RI e AR), realizamos uma análise univariável entre a idade ao diagnóstico, o sexo, o nível de expressão do transcrito *MYCN* e a ocorrência de doença progressiva e morte.

A análise univariável entre idade ao diagnóstico, sexo e evolução clínica no grupo AR em relação ao grupo não-AR foi realizada primeiro sem considerarmos a expressão do transcrito *MYCN* e, depois, considerando-a em seus dois diferentes níveis.

Avaliamos a sobrevida global entre os pacientes AR e não-AR, entre idade <1 ano e ≥ 1 ano e entre os pacientes com expressão do transcrito *MYCN* abaixo ou igual e acima da mediana.

Para a comparação dos resultados na análise univariável utilizamos o teste exato de Fisher, pois é o mais indicado em amostras pequenas (Motta e Wagner, 2003). Para avaliarmos os valores da expressão *MYCN* nos grupos Ar e não-AR, idade <1 e ≥ 1 ano e ocorrência ou não de eventos utilizamos o teste de Mann Whitney.

A análise dos resultados obtidos foram realizadas com a orientação do Prof. Dr José A. Cordeiro, docente do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

As estimativas da distribuição do tempo para os eventos foram computadas usando o método Kaplan-Meier (Kaplan e Meier, 1958) e comparação das curvas de SG com “log-rank”. Consideramos o nível de significância de 5% ($P=0,05$), com intervalo de confiança de 95%.

5 - RESULTADOS

No período de 01 de janeiro de 2000 a 30 de dezembro de 2004 foram registradas 32 amostras tumorais com diagnóstico de neuroblastoma. Todas foram previamente analisadas e identificadas sem amplificação do gene *MYCN* e estavam estocadas no Laboratório de Biologia Tumoral da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. Três pacientes foram excluídos do estudo: um paciente era portador de ganglioneuroma e dois não tiveram a confirmação do diagnóstico de neuroblastoma ou ganglioneuroblastoma.

Constam da Tabela 1 os períodos de acompanhamento em nossa casuística de cada grupo constituído.

Tabela 1 – Período de acompanhamento da casuística e dos grupos

GRUPOS	TEMPO DE ACOMPANHAMENTO (meses)			
	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉDIA	MEDIANA
Global	1	53	14	12
Alto risco	1	29	13	13
Não-alto risco	1	53	15	10
Idade <1 ano	1	51	12,5	10
Idade ≥1 ano	1	53	15	12,5

Entre os 29 pacientes deste estudo o neuroblastoma foi mais freqüente em crianças com idade \geq 1 ano (69%) e no sexo feminino (59%) (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição de idade e sexo

VARIÁVEL	CATEGORIA	NÚMERO PACIENTES
Idade	<1 ano	9
	\geq 1 ano	20
Sexo	Masculino	12
	Feminino	17

Em dois pacientes a classificação histopatológica foi ganglioneuroblastoma e foi observado que em um deles, após o tratamento quimioterápico (NB-9), apresentou maturação para ganglioneuroma. A classificação patológica de prognóstico foi realizada em 20 pacientes e entre eles 52% foram favoráveis, sendo dois com estágio 1, três com estágio 2 e seis com estágio 3. Em 48% foram desfavoráveis com dois no estágio 1, dois no estágio 3 e cinco no estágio 4. O grupo de risco mais freqüente foi o AR (48%). Entre os 29 pacientes estudados 98% apresentaram remissão completa e 1 paciente (2%) morreu 30 dias após o seu diagnóstico, devido a uma complicação infecciosa e não estava em remissão completa. Nenhum paciente foi não responsivo. Na evolução clínica, após remissão completa, 50% tiveram doença progressiva e, entre eles, 50% morreram (Tabela 3).

Uma criança com idade <1 ano, estadio 2, sem tratamento quimioterápico, ressecção cirúrgica total e em remissão completa há 6 meses apresentou um quadro clínico de meningococemia e morreu. Esta criança constou em nossa casuística como remissão completa e faz parte do grupo BR G-1 (NB-25).

A frequência de doença progressiva e morte entre crianças com idade <1 ano e ≥ 1 ano não apresentou diferença significativa estatisticamente, sendo $P=0,427$ e $P>0,999$, respectivamente. E a frequência de histologia desfavorável em criança <1 ano, igualmente, não apresentou significância estatística ($P>0,999$).

O nível de expressão do transcrito *MYCN* apresentou o valor mínimo 0,041 e máximo 27,569 e estão listados na Tabela 4.

Os grupos G-1 e G-2 foram constituídos à partir da mediana dos valores da expressão do transcrito *MYCN* em cada amostra (mediana 3,193). No grupo G-1 (n=14) 36% eram do sexo masculino e 43% tinham idade <1 ano. No grupo G-2 (n=15) 40% eram do sexo masculino e 20% tinham idade <1 ano. As características clínicas destes grupos estão descritas na Tabelas 5 e Tabela 6, respectivamente, grupo G-1 e G-2.

Tabela 3 – Distribuição das características clínico-laboratoriais e evolução clínica

VARIÁVEL	CATEGORIA	PACIENTES
Classificação histológica	Ganglioneuroblastoma	2
	Neuroblastoma	27
Classificação patológica de prognóstico	Favorável	11
	Desfavorável	9
Estadiamento	Estádio 1	4
	Estádio 2	3
	Estádio 3	8
	Estádio 4	14
Grupo de risco	Baixo	7
	Intermediário	8
	Alto	14
Evolução clínica	Remissão completa	28
	Morte	1
	Não responsivo	-
	Doença progressiva	14

Tabela 4 – Taxa de expressão do transcrito *MYCN*

PACIENTE	Ct <i>MYCN</i>	Ct <i>ACTINA</i>	delta Ct <i>MYCN</i>	delta Ct <i>ACTINA</i>	delta delta Ct	TAXA <i>MYCN</i>
NB – 1 ⁽¹⁾	24,640	24,120	(6,265)	(1,830)	(4,435)	21,631
NB – 2 ⁽²⁾	25,630	22,350	(5,275)	(3,600)	(1,675)	3,193
NB – 3 ⁽¹⁾	24,440	20,620	(6,465)	(5,330)	(1,135)	2,196
NB – 4 ⁽¹⁾	28,710	19,160	(2,195)	(6,790)	4,595	0,041
NB – 5 ⁽¹⁾	25,530	17,760	(5,375)	(8,190)	2,815	0,142
NB – 6 ⁽¹⁾	23,720	20,880	(7,185)	(5,070)	(2,115)	4,332
NB – 7 ⁽¹⁾	23,960	16,740	(6,945)	(9,210)	2,265	0,208
NB – 8 ⁽¹⁾	21,550	21,380	(9,355)	(4,570)	(4,785)	27,569
NB – 9 ⁽¹⁾	34,290	26,480	3,385	0,530	2,855	0,138
NB – 10 ⁽¹⁾	26,370	19,010	(4,535)	(6,940)	2,405	0,189
NB – 11 ⁽¹⁾	21,150	19,580	(9,755)	(6,370)	(3,385)	10,447
NB – 12 ⁽¹⁾	24,190	23,990	(6,715)	(1,960)	(4,755)	27,002
NB – 13 ⁽¹⁾	27,170	24,290	(3,735)	(1,660)	(2,075)	4,213
NB – 14 ⁽¹⁾	25,830	20,710	(5,075)	(5,240)	0,165	0,892
NB – 15 ⁽²⁾	21,460	18,890	(9,445)	(7,060)	(2,385)	5,223
NB – 16 ⁽²⁾	21,930	18,440	(8,975)	(7,510)	(1,465)	2,761
NB – 17 ⁽¹⁾	27,270	21,210	(3,635)	(4,740)	1,105	0,465
NB – 18 ⁽²⁾	19,770	18,060	(11,135)	(7,890)	(3,245)	9,481
NB – 19 ⁽¹⁾	24,570	18,490	(6,335)	(7,460)	1,125	0,459
NB – 20 ⁽²⁾	19,900	18,080	(11,005)	(7,870)	(3,135)	8,785
NB – 21 ⁽¹⁾	20,940	15,610	(9,965)	(10,340)	0,375	0,771
NB – 22 ⁽²⁾	20,740	17,800	(10,165)	(8,150)	(2,015)	4,042
NB – 23 ⁽²⁾	22,070	20,510	(8,835)	(5,440)	(3,395)	10,520
NB – 24 ⁽¹⁾	24,310	20,040	(6,595)	(5,910)	(0,685)	1,608
NB – 25 ⁽²⁾	23,500	21,710	(7,405)	(4,240)	(3,165)	8,969
NB – 26 ⁽¹⁾	29,190	22,420	(1,715)	(3,530)	1,815	0,284
NB – 27 ⁽¹⁾	22,820	21,420	(8,085)	(4,530)	(3,555)	11,753
NB – 28 ⁽¹⁾	26,700	25,120	(4,205)	(0,830)	(3,375)	10,375
NB – 29 ⁽²⁾	30,280	24,000	(0,625)	(1,950)	1,325	0,399

⁽¹⁾ idade ≥1ano; ⁽²⁾ idade <1ano

Tabela 5 – Distribuição das características clínicas no Grupo G-1

VARIÁVEL	CATEGORIA	PACIENTES
Sexo	Masculino	5
	Feminino	9
Idade	<1 ano	6
	≥1 ano	8
Estadiamento tumoral	Estádio 1	4
	Estádio 2	1
	Estádio 3	3
	Estádio 4	6
Grupo de risco	Baixo	5
	Intermediário	4
	Alto	5
Evolução clínica	Doença progressiva	6
	Morte	2

Grupo G-1 – pacientes com expressão do transcrito *MYCN* > mediana

Tabela 6 – Distribuição das características clínicas no Grupo G-2

VARIÁVEL	CATEGORIA	PACIENTES
Sexo	Masculino	6
	Feminino	9
Idade	<1 ano	3
	≥1 ano	12
Estadiamento tumoral	Estádio 1	-
	Estádio 2	2
	Estádio 3	5
	Estádio 4	8
Grupo de risco	Baixo	2
	Intermediário	4
	Alto	9
Evolução clínica	Doença progressiva	8
	Morte	6

Grupo G-2 – pacientes com expressão do transcrito *MYCN* ≤ mediana

Avaliamos e comparamos os diferentes valores da expressão do transcrito *MYCN* nos grupos AR e não-AR, nas idades <1 ano e \geq 1 ano, nas classificações de prognóstico favorável e desfavorável e na ocorrência ou não de doença progressiva ou morte. Os resultados estão na Tabela 7 e os gráficos são apresentados à seguir (Figuras 1, 2, 3 e 4).

Tabela 7 – Análise dos níveis de expressão em relação ao grupo de risco, idade, classificação de prognóstico e ocorrência de eventos

VARIÁVEL	VALOR DA EXPRESSÃO DO TRANSCRITO			
	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA	P
Grupo alto risco	0,041	27,569	1,544	0,645
Grupo não-alto risco	0,138	21,631	4,042	
Idade <1 ano	0,399	10,520	5,223	0,268
Idade \geq 1 ano	0,041	27,569	1,250	
Prognóstico Favorável	0,138	21,631	3,193	> 0,999
Prognóstico Desfavorável	0,041	11,753	4,332	
Evento ⁽¹⁾	0,041	27,569	2,761	0,743
Não evento ⁽²⁾	0,284	21,631	3,618	

⁽¹⁾Ocorrência de doença progressiva ou morte; ⁽²⁾Não ocorrência de doença progressiva ou morte

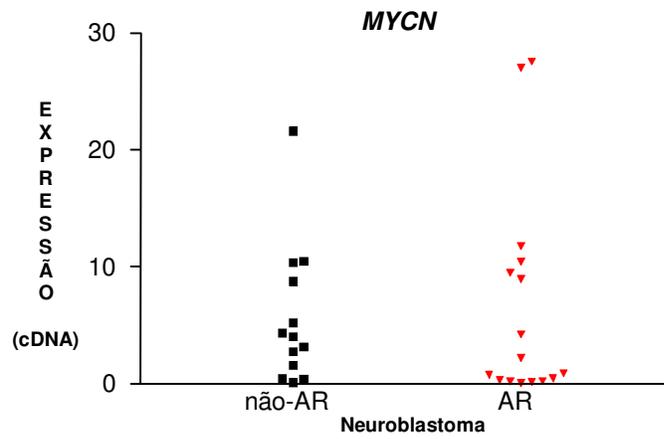


Figura 1 – Distribuição dos valores de expressão do transcrito *MYCN* no ▼ grupo alto risco e no • grupo não-alto risco

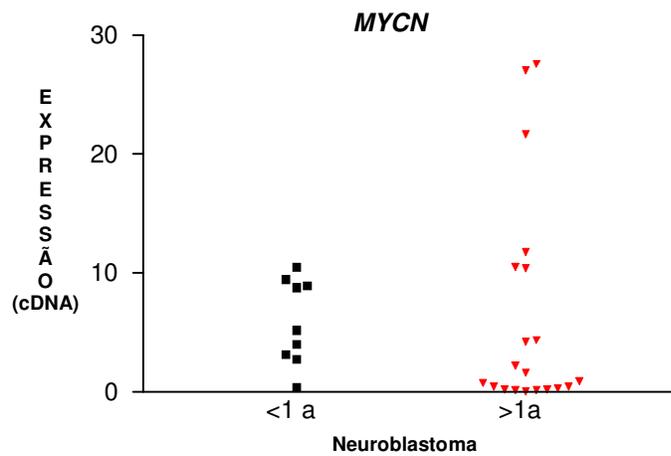


Figura 2 – Distribuição dos valores de expressão do transcrito *MYCN* na ▼ idade ≥ 1 ano e • idade < 1 ano

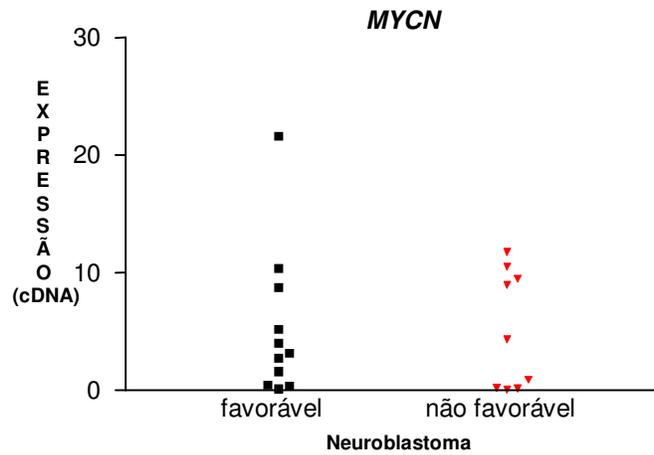


Figura 3 – Distribuição dos valores de expressão do transcrito *MYCN* na classificação patológica de prognóstico • favorável e ▼ desfavorável

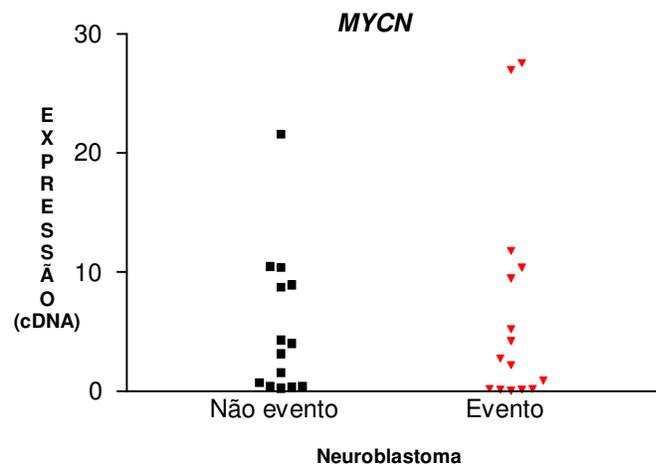


Figura 4 – Distribuição dos valores de expressão do transcrito *MYCN* na ocorrência de
 • doença progressiva ou morte e
 • sem doença progressiva ou morte

Comparamos as características clínicas entre os grupos G-1 e G-2 e os resultados constam da Tabela 7.

Não houve diferença entre a frequência de histologia favorável e desfavorável entre os dois grupos ($P=0,387$).

Tabela 7 – Avaliação das características clínicas entre os grupos G-1 e G-2

VARIÁVEL	CATEGORI	EXPRESSÃO TRANSCRITO		P
		G-1	G-2	
Sexo	Masculino	5	6	> 0,999
	Feminino	9	9	
Idade	<1ano	6	3	0,245
	≥1ano	8	12	
Grupo baixo risco	Sim	5	2	0,215
	Não	9	13	
Grupo risco intermediário	Sim	4	4	> 0,999
	Não	10	11	
Grupo alto risco	Sim	5	9	0,272
	Não	9	6	
Morte	Sim	2	6	0,215
	Não	12	9	

Grupo G-1 – pacientes com expressão do transcrito *MYCN* > mediana; Grupo G-2 – pacientes com expressão do transcrito *MYCN* ≤ mediana

Comparamos as variáveis idade, sexo e evolução clínica entre os grupos: baixo risco G-1 e G-2; risco intermediário G-1 e G-2; alto risco G-1 e G-2. Todas as crianças do grupo alto risco (G-1 e G-2) tinham idade ≥ 1 ano. No grupo de risco intermediário (G-1 e G-2) não ocorreram mortes. Todos os resultados constam da Tabela 9, Tabela 10 e Tabela 11, respectivamente.

Tabela 9 – Avaliação das características clínicas dos grupos G-1 e G-2 entre os pacientes Baixo Risco

VARIÁVEL	CATEGORIA	BAIXO RISCO		P
		G-1	G-2	
Sexo	Masculino	4	2	> 0,999
	Feminino	1	-	
Idade	<1ano	2	-	> 0,999
	≥ 1 ano	3	2	
Doença progressiva	Sim	-	1	0,286
	Não	5	1	
Morte	Sim	1	-	> 0,999
	Não	4	2	

Grupo G - 1 - pacientes com expressão do transcrito *MYCN* > mediana; Grupo G - 2 - pacientes com expressão do transcrito *MYCN* \leq mediana

Tabela 10 – Avaliação das características clínicas dos grupos G-1 e G-2 entre os pacientes Risco Intermediário

VARIÁVEL	CATEGORIA	RISCO INTERMEDIÁRIO		
		G-1	G-2	P
Sexo	Masculino	-	1	> 0,999
	Feminino	4	3	
Idade	<1 ano	4	3	0,429
	≥1 ano	-	1	
Doença progressiva	Sim	2	1	> 0,999
	Não	2	3	
Morte	Sim	-	-	-
	Não	4	4	

Grupo G - 1 – pacientes com expressão do transcrito *MYCN* > mediana; Grupo G - 2 – pacientes com expressão do transcrito *MYCN* ≤ mediana

Tabela 11 – Avaliação das características clínicas dos grupos G-1 e G-2 entre os pacientes Alto Risco

VARIÁVEL	CATEGORIA	ALTO RISCO		
		G-1	G-2	P
Sexo	Masculino	1	3	> 0,999
	Feminino	4	6	
Idade	<1 ano	-	-	-
	≥1 ano	5	9	
Doença progressiva	Sim	4	6	> 0,999
	Não	1	3	
Morte	Sim	1	6	0,266
	Não	4	3	

Grupo G - 1 – pacientes com expressão do transcrito *MYCN* > mediana; Grupo G - 2 – pacientes com expressão do transcrito *MYCN* ≤ mediana

Formamos um grupo de pacientes AR e outro não-AR para avaliarmos as variáveis idade, doença progressiva e morte. Primeiro avaliamos os dois grupos não considerando os níveis de expressão do transcrito *MYCN*. Observamos uma frequência de idade <1ano de 43% (P=0,001) e uma frequência maior de doença progressiva e morte entre os pacientes AR (P=0,014) (Tabela 12).

Repetimos as mesmas avaliações entre AR e não-AR nos grupos G-1 e G-2. A avaliação no grupo G-1 entre AR e não-AR apresentou significância estatística em relação a idade <1ano (P=0,031) e não ocorreu diferença com significância estatística em relação a doença progressiva e morte (P=0,091 e P>0,999, respectivamente) (Tabela 13).

No grupo G-2 a avaliação entre AR e não-AR apresentou significância estatística em relação a idade <1ano (P=0,044) e a morte (P=0,028) (Tabela 14).

Tabela 12 – Avaliação da idade e do morte nos pacientes do grupo alto risco e não-alto risco

VARIÁVEL	CATEGORIA	ALTO RISCO		P
		sim	não	
Idade	<1ano	-	9	0,001
	≥1ano	14	6	
Doença progressiva	Sim	10	4	0,027
	Não	4	11	
Morte	Sim	7	1	0,014
	Não	7	14	

Tabela 13 – Avaliação da idade e do morte em pacientes alto risco e não-alto risco do Grupo G-1

VARIÁVEL	CATEGORIA	G-1 + ALTO RISCO		P
		sim	não	
Idade	<1ano	-	6	0,031
	≥1ano	5	3	
Doença progressiva	Sim	4	2	0,091
	Não	1	7	
Morte	Sim	1	1	>0,999
	Não	4	8	

Grupo G-1 – pacientes com expressão do transcrito *MYCN* > mediana

Tabela 14 – Avaliação da idade e do morte em pacientes alto risco e não-alto risco do Grupo G-2

VARIÁVEL	CATEGORIA	G-2 + ALTO RISCO		P
		sim	não	
Idade	<1ano	-	3	0,044
	≥1ano	9	3	
Doença progressiva	Sim	6	2	0,315
	Não	2	4	
Morte	Sim	6	-	0,028
	Não	3	6	

Grupo G-2 – pacientes com expressão do transcrito *MYCN* ≤ mediana

Analisamos a SG nos pacientes de acordo com o risco (alto risco e não-alto risco), com a idade ao diagnóstico (<1 ano e ≥ 1 ano) e com o valor da expressão do transcrito *MYCN* (com e sem aumento). Os resultados constam da Tabela 15 e os gráficos são apresentados à seguir (Figuras 5, 6 e 7)

Tabela 15 – Sobrevida global em 12 m e 24 m

VARIÁVEL	SG / 12 m	SG / 24 m	'HAZARD	IC ⁽¹⁾ 95%	P
Alto risco	84%	14%	0,1685	17% - 100%	0,05
Não-alto risco	93%	93%			
Idade <1 ano	100%	100%	-	45% - 100%	0,14
Idade ≥ 1 ano	84%	31%			
Expressão >	82%	82%	2,44	56% - 98%	0,24
Expressão \leq	93%	15%			

⁽¹⁾Intervalo de confiança

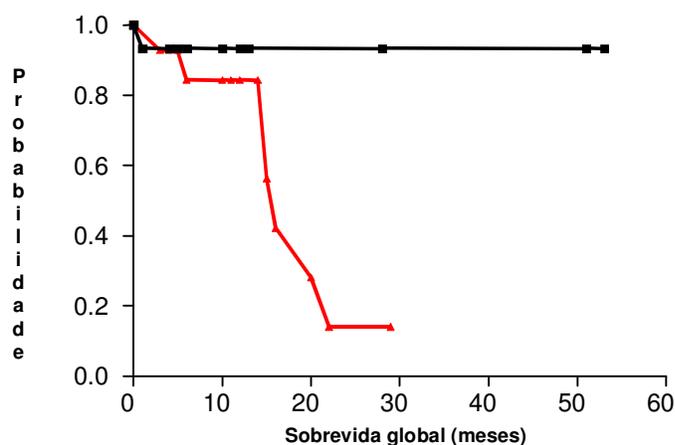


Figura 5 – Sobrevida global em pacientes
 ▲ alto risco e ● não-alto risco

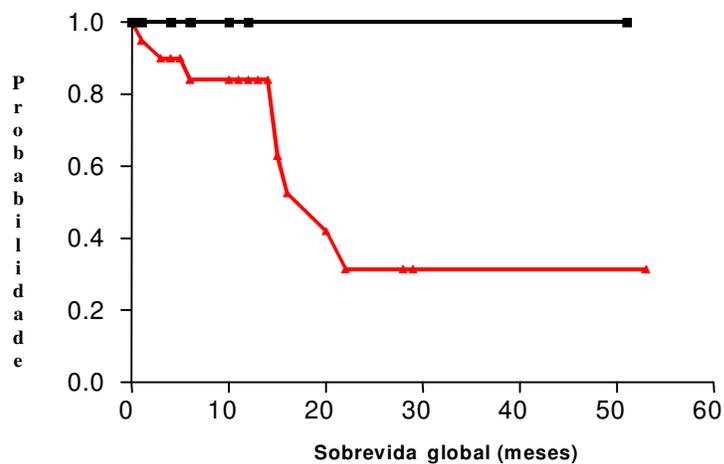


Figura 6 – Sobrevida global em pacientes com ▲ idade ≥ 1 ano e • idade < 1 ano

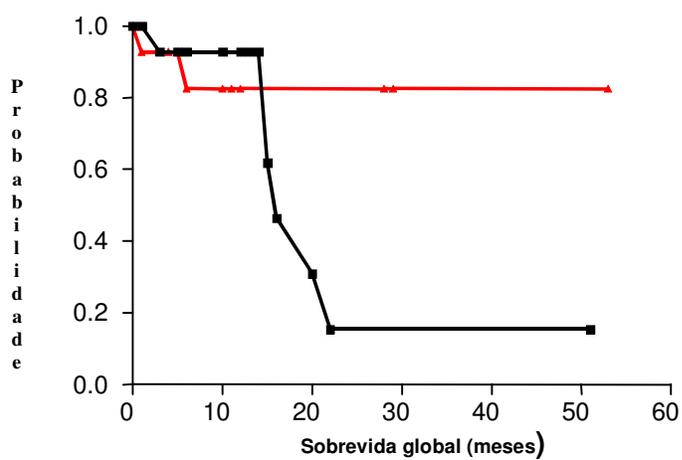


Figura 7 – Sobrevida global em pacientes com ▲ expressão $>$ mediana e • expressão \leq mediana

6 – DISCUSSÃO

6.1 – Caracterização da casuística

PACIENTE	IDADE	SEXO	DIAGNÓSTIC	CENSURA	PROCEDÊNCIA
NB – 1	5a 2m	Masculino	Mai - 00	Dez - 04 ⁽¹⁾	Sorocaba – SP
NB – 2	9m	Feminino	Jun - 00	Dez - 04 ⁽¹⁾	São Paulo – SP
NB – 3	2a 5m	Feminino	Out - 00	Jan - 02 ⁽³⁾	São Paulo – SP
NB – 4	2a 4m	Masculino	Fev - 01	Dez - 02 ⁽³⁾	São Paulo – SP
NB – 5	15 anos	Masculino	Mai - 01	Ago - 03 ⁽³⁾	São Paulo – SP
NB – 6	2a 11m	Masculino	Ago - 01	Dez - 04 ⁽¹⁾	São Paulo - SP
NB – 7	1a 9m	Feminino	Dez - 01	Mar - 02 ⁽³⁾	São Paulo – SP
NB – 8	3 anos	Feminino	Jan - 02	Nov - 02 ⁽²⁾	São Paulo – SP
NB – 9	1a 8m	Masculino	Abr - 02	Set - 02 ⁽²⁾	São Paulo – SP
NB – 10	6a 5m	Feminino	Jul - 02	Mar - 04 ⁽³⁾	São Paulo – SP
NB – 11	1 ano	Feminino	Jul - 02	Dez - 04 ⁽¹⁾	Curitiba – PR
NB – 12	3 anos	Feminino	Dez - 02	Jun - 03 ⁽³⁾	São Paulo – SP
NB – 13	6a 5m	Masculino	Mar - 03	Ago - 03 ⁽²⁾	São Paulo – SP
NB – 14	6 anos	Feminino	Jun – 03	Out – 04 ⁽³⁾	São Paulo – SP
NB – 15	8 meses	Feminino	Set - 03	Set - 04 ⁽²⁾	São Paulo – SP
NB – 16	2 meses	Masculino	Out - 03	Abr - 04 ⁽²⁾	São Paulo – SP
NB – 17	1a 8m	Masculino	Out - 03	Dez - 04 ⁽¹⁾	São Paulo – SP
NB – 18	6 meses	Feminino	Nov - 03	Mar - 04 ⁽²⁾	São Paulo – SP
NB – 19	1a 4m	Feminino	Nov - 03	Dez - 04 ⁽¹⁾	Porto Alegre – RS
NB – 20	9 meses	Feminino	Dez - 03	Dez - 04 ⁽¹⁾	Porto Alegre - RS
NB – 21	1a 7m	Feminino	Jan - 04	Dez - 04 ⁽¹⁾	São Paulo – SP
NB – 22	3 meses	Feminino	Jan - 04	Dez - 04 ⁽¹⁾	São Paulo – SP
NB – 23	6 meses	Masculino	Fev - 04	Dez - 04 ⁽¹⁾	São José dos Campos –
NB – 24	1 ano	Masculino	Mar - 04	Dez - 04 ⁽¹⁾	São Paulo – SP
NB – 25	10 meses	Feminino	Mar - 04	Dez - 04 ⁽¹⁾	São Paulo – SP
NB – 26	4a 6m	Feminino	Mar - 04	Dez - 04 ⁽¹⁾	São José dos Campos –
NB – 27	3a 4m	Feminino	Jul - 04	Nov - 04 ⁽²⁾	Porto Alegre – RS
NB – 28	1a 2m	Masculino	Set - 04	Out - 04 ⁽⁴⁾	Porto Alegre – RS
NB – 29	9 meses	Feminino	Nov - 04	Dez - 04 ⁽¹⁾	Sorocaba - SP

⁽¹⁾Remissão Completa; ⁽²⁾Doença progressiva; ⁽³⁾Morte após doença progressiva; ⁽⁴⁾Morte sem remissão completa

Fatores de prognóstico clínico e biológico são bem estabelecidos no neuroblastoma, porém determinadas diferenças clínicas ainda não estão definidas, tais como, uma melhor resposta terapêutica entre crianças com idade <1 ano, doença avançada e sem amplificação *MYCN* em relação às crianças com idade ≥ 1 ano e as mesmas características clínicas e biológicas (Schmidt et al, 2000; Van Noesel e Versteeg, 2003). Assim, como muitas outras questões, a relevância clínica da expressão *MYCN* em paciente sem amplificação permanece não definida, podendo estar relacionada a um fator de prognóstico já estabelecido. Portanto, escolhemos realizar nosso estudo com crianças de todas as idades e em todos os estádios.

Kohl et al (1983)^(*), citados por Seeger (1985), observaram que a amplificação do gene *MYCN* resultava em um aumento no nível do RNAm específico para *MYCN*. Quando compara-se a expressão do transcrito *MYCN* nas células SK-N-SH da linhagem de neuroblastoma amplificado com um gene não amplificado, pode-se observar um aumento de 40 à 60 vezes no nível de sua expressão. As células SK-N-SH humanas têm uma única cópia de *MYCN* por genoma haplóide e expressam baixos níveis do seu transcrito (Schwab, 2004).

Outros tecidos tumorais que podem apresentar um aumento na expressão *MYCN* sem amplificação são os tumores de Wilms, os retinoblastomas e os tumores pulmonares de pequenas células. Alguns tecidos não tumorais têm como característica normal o aumento da expressão *MYCN* sem amplificação, tais como, células do tecido embrionário da retina e renal nos mamíferos. Nível de expressão *MYCN*, tão alto quanto o do gene amplificado no neuroblastoma, pode ser observado em células do tecido fetal do cérebro humano.

^(*)Activated expression of the *N-myc* gene in human neuroblastoma and related tumors. *Science*.1984;226:1335-7

O aumento da expressão *MYCN* sem amplificação nos tecidos tumorais do retinoblastoma e Wilms poderia refletir a presença de célula tumoral indiferenciada e portanto seria considerado uma característica normal (Schwab, 2004).

Triche e Sorensen (2002) referiram que tanto a análise pelo PCR quantitativo, como pela hibridização *in situ* (método de FISH) da expressão do gene *MYCN* apresentam excelentes resultados, porém a técnica “RQ-PCR” é mais sensível quando comparada a outras técnicas e havendo material adequadamente disponível para a obtenção do RNA, essa deve ser a técnica de escolha (Bernard e Wittwer, 2002; Ginzinger, 2002; De Preter et al, 2002). Como nossas amostras possibilitaram a obtenção do RNAm íntegro foi realizada a técnica de “RQ-PCR”. Outra possível análise da expressão gênica é pela imunohistoquímica, que é uma técnica semi-quantitativa e sem custo excessivo, mas sua análise é subjetiva e mais propensa ao erro (Oue et al, 1995; Pinho, 2005).

Estudos realizados por Kohl et al (1983) observaram que nas células da linhagem do neuroblastoma os valores elevados da proteína *MYCN* correlacionavam-se com os valores elevados do transcrito *MYCN* (Seeger et al, 1985). Em 2002, Boon et al relataram que a expressão da proteína *MYCN* está diretamente relacionada à expressão do transcrito *MYCN*. Em publicações referentes à expressão do transcrito *MYCN* não encontramos obrigatoriedade no uso de duas técnicas para sua análise (Chan et al, 1997; Raggi et al, 1999; Cohn et al, 2000; Valent et al, 2001; Ginzinger, 2002; Spitz et al, 2004), assim, foi utilizada somente a técnica “RQ-PCR” para a análise da amostra tumoral.

A avaliação do aumento na expressão da proteína ou do transcrito *MYCN* como fator de prognóstico pode ser realizada usando como referência o valor expresso pelo

gene amplificado em dez cópias (Valent et al, 2002). Contudo, a associação entre a sobrevida e a expressão *MYCN* em genes amplificados é influenciada pelo aumento da expressão gênica (Brodeur et al, 1997; Bown, 2001; Westermann e Schwab, 2002; Brodeur, 2003), assim, o aumento significativo da expressão *MYCN* em gene amplificado poderia impedir a observação de um efeito da expressão *MYCN* na sobrevida da criança, devido ao seu aumento quantitativo relativamente menor no gene não amplificado. Como em nosso estudo todas as crianças apresentaram neuroblastoma sem amplificação escolhemos como referência a mediana dos valores expressos pelo transcrito *MYCN* nas amostras tumorais (Cohn et al, 2000; Matsunaga et al, 2000; Motta e Wagner, 2002; Tanaka et al, 2004).

Avaliamos nosso grupo com o objetivo de detectar diferenças significativas entre as idades ou estádios clínicos dos pacientes, pois são fatores de prognóstico e influem na evolução da doença (Shimada et al, 1999; Lastowska et al et al, 2001; Van Noesel e Versteeg, 2004). Na avaliação de um grupo, a proporção de crianças com idade <1ano ou com doença não metastática pode melhorar os resultados em relação ao tempo de sobrevida (Cohn et al, 2000; Matthay, 2000). Em nossa casuística 69% das crianças tinham idade ≥ 1 ano e a distribuição entre os estádios foi de: 14% estágio 1; 11% estágio 2; 28% estágio 3 e 47% estágio 4. Porém, na estratificação em grupos de risco (Brodeur et al, 1993) 49% das crianças eram AR e 51% não-AR. Assim, as avaliações entre os grupos puderam ser realizadas sem a influência preponderante de um único fator de prognóstico.

A nossa casuística em relação à idade foi muito pequena impossibilitando uma avaliação entre as diferentes características clínicas e biológicas. Mesmo assim, a importância da idade como fator de prognóstico justifica sua inclusão nesta discussão.

Em 1999, Shimada et al demonstraram pela primeira vez a influência de um fator clínico na classificação patológica do neuroblastoma. Eles relataram que pacientes com idade ≥ 18 meses apresentavam características biológicas desfavoráveis e pior prognóstico. À partir desta afirmação estudos foram feitos e, atualmente, algumas características biológicas são relacionadas com uma idade específica (Mora et al, 2003; Schmidt et al, 2000).

Look et al (1984) analisando a ploidia nas células tumorais do neuroblastoma encontraram uma associação significativa entre o conteúdo de DNA e a idade do paciente. Referiram que a maioria das crianças com idade <1 ano e hiperdiploidia apresentaram estágio 1 ou 2 e uma melhor SLE. No entanto, a ploidia perdeu seu valor de prognóstico quando as crianças tinham idades ≥ 2 anos (Mora et al, 2001).

Em um estudo com crianças portadoras de neuroblastoma Mora et al (2002) observaram que entre as crianças com idade <1 ano 83% dos neuroblastomas eram indiferenciados. Já, entre as crianças com idade ≥ 1 ano, seis apresentaram ganglioneuroblastoma e uma criança apresentou ganglioneuroma. Na nossa casuística duas (7%) crianças apresentaram ganglioneuroblastoma, sendo que, as duas eram do sexo masculino, idades de 19 meses e 12 meses ao diagnóstico, tumor primário em supra renal, estágio 2 e ambas apresentaram remissão completa.

Neste mesmo estudo, Mora et al (2002) referiram que 17 pacientes apresentaram classificação histológica desfavorável. Entre eles, 13 (34%) não tinham amplificação do gene *MYCN* e a distribuição neste subgrupo de histologia desfavorável foi: três crianças eram estágio 1 e com idade ≥ 1 ano, uma criança apresentou doença progressiva; sete crianças eram estágio 2 com idade ≥ 1 ano, quatro apresentaram doença progressiva; seis crianças eram estágio 3 com idade ≥ 1 ano, duas com doença progressiva.

Entre os nossos pacientes, 20 crianças foram classificadas de acordo com a “International Neuroblastoma Pathology Classification” (Shimada et al, 1999), sendo seis pacientes com histologia desfavorável e idade ≥ 1 ano. Cinco crianças eram estágio 4 e tiveram doença progressiva e uma criança era estágio 1 e apresentou remissão completa. Entre os pacientes com histologia desfavorável e idade < 1 ano, duas crianças eram estágio 4 e uma estágio 1. Duas estão em remissão completa e uma criança apresentou doença progressiva e morreu.

Observamos que nossos pacientes, quando apresentaram histologia desfavorável e idade ≥ 1 ano, apresentaram evoluções clínicas semelhantes aos pacientes descritos no estudo de Mora et al (2002). Resultados semelhantes foram descritos por Goto et al (2001) quando avaliaram pacientes com amplificação e sem amplificação do gene *MYCN*. Entre os pacientes sem amplificação e histologia desfavorável, quando apresentaram idade < 1 ano tiveram melhor evolução clínica do que aqueles com idade ≥ 1 ano e mesmo estágio clínico.

Entre os 11 (55%) pacientes que apresentaram histologia favorável, seis (55%) tinham idade < 1 ano e quatro eram estágio 1 e 2. Shimada et al (1999) referiram que tumores com histologia favorável tem uma associação com idade < 1 ano e estágio 1 ou 2. Em nossa casuística não encontramos diferença na frequência de histologia favorável entre pacientes com idade < 1 ano e ≥ 1 ano ($P=0,387$), contudo, nossa amostra era pequena.

A amplificação do gene *MYCN* está indiscutivelmente associada a doença avançada (Seeger et al, 1985; Brodeur et al, 2003) e é um dos principais fatores de prognóstico considerados na estratificação para a escolha de um tratamento (Look et al, 1991, Brodeur e Maris, 2000). Apesar de estudos sugerirem que genes co-amplificados

ou expressões gênicas modificadas em decorrência da amplificação do *MYCN* poderiam contribuir para o fenótipo tumoral, o assunto permanece controverso (Matthay, 2000; Vandesompele et al, 2001; Scott et al, 2003; Shimada et al, 2004).

Em nossa casuística a expressão do transcrito *MYCN* foi observada em todos os 29 pacientes e em vários níveis de intensidade, variando de 0,041 o nível mínimo e 27,569 o máximo, mediana 3,193. Cohn et al (2000) quando avaliaram o nível de expressão do transcrito *MYCN* em 69 amostras tumorais de neuroblastoma sem amplificação observaram uma variação no nível da expressão. Tanaka et al (2004) estudaram 46 amostras tumorais sem amplificação e observaram uma variação com valor mínimo 0,02 e máximo 1,24.

Os valores da expressão do transcrito *MYCN* não apresentaram diferenças quando analisamos os pacientes em relação ao grupo de risco, à idade ao diagnóstico, à classificação de prognóstico e à ocorrência de doença progressiva ou morte. Em um estudo com crianças portadoras de neuroblastoma Tanaka et al (2004) observaram que o nível de expressão *MYCN* entre 35 tumores não amplificados de portadores com idade <1 ano foi maior do que o nível obtido entre 7 tumores não amplificados de portadores com idade ≥ 1 ano, entretanto, Cohn et al (2000) não observaram esta diferença. Em nossa casuística o nível de expressão do transcrito *MYCN* em crianças com idade <1 ano foi 0,399 o mínimo e 10,520 o máximo, com mediana de 5,222 e não houve diferença ($P=0,268$) em relação às crianças com idade ≥ 1 ano.

O aumento da expressão gênica pode ocorrer mesmo na ausência da amplificação e seu mecanismo ainda não foi definitivamente estabelecido. Enquanto alguns autores sugeriram um processo normal, porém mais longo na degradação proteica (Brodeur et al, 1997), outros sugeriram uma disfunção nos mecanismos

celulares que regulariam a transcrição do gene com um aumento na sua produção (Alaminos et al, 2001).

Em 1997, Chan et al publicaram um dos primeiros estudos com o objetivo de analisar o aumento da expressão da proteína *MYCN* como fator de prognóstico em pacientes portadores de neuroblastoma sem amplificação. Nesta publicação eles estudaram 57 crianças portadoras de neuroblastoma estádios 3, 4 e 4S com e sem amplificação e avaliaram a relação entre os fatores de prognóstico e a expressão da proteína *MYCN* obtida em análise imunohistoquímica. Eles observaram que crianças sem amplificação apresentaram uma melhor SLE e, entre os pacientes deste grupo sem amplificação, observaram uma melhora na taxa de SLE quando a expressão da proteína *MYCN* não apresentava aumento. Concluíram que o aumento na expressão da proteína *MYCN* em gene não amplificado era um fator de prognóstico desfavorável independente e reforçava a hipótese de que a expressão gênica era essencial para a progressão do neuroblastoma. Em nosso estudo, embora tenhamos encontrado aumento da expressão do transcrito *MYCN* em neuroblastoma sem amplificação, não observamos significância estatística entre as evoluções clínicas dos pacientes em seus diversos níveis de expressões ($P=0,743$).

Entretanto, é conveniente observarmos que em nossa casuística todos os tumores eram não amplificados e no estudo apresentado por Chan et al (1997) os tumores eram amplificados e não amplificados. Quando estudamos um grupo com tumores amplificados e não amplificados avaliando a relevância no aumento da expressão *MYCN* em tumores sem amplificação, os resultados devem ser analisados cuidadosamente, devido a presença de altos níveis de expressão da proteína em neuroblastoma amplificado. Sendo a expressão *MYCN* um fator de prognóstico

desfavorável e de grande influência na evolução da doença, pode-se observar em tumores sem amplificação resultados que não se correlacionam a ela (Cohn et al, 2000; Matthay, 2000).

Outro importante trabalho analisando a expressão *MYCN* em tumor não amplificado foi publicado por Cohn et al (2000) quando estudaram 69 amostras tumorais de neuroblastoma sem amplificação e doença estágio C ou D (correspondentes aos estádios 3 e 4 do INSS). Eles concluíram que o aumento na expressão da proteína *MYCN* em portadores de doença avançada e sem amplificação não era um fator de prognóstico desfavorável. Quando avaliamos nossos pacientes em um mesmo grupo de risco relacionando o aumento ou não da expressão com a ocorrência de doença progressiva e/ou morte nossos resultados sugeriram que a expressão *MYCN* não foi um fator de prognóstico.

Com o desenvolvimento tecnológico, atualmente, é possível conhecer o perfil da expressão gênica nas células do neuroblastoma. Pesquisas estão sendo realizadas para identificarem e definirem a participação do gene *MYCN* nos mecanismos de crescimento, regressão e maturação tumoral (Hogart, 2003; Mora et al, 2003).

Em um estudo *in vitro* e *in vivo* Boon et al (2000) demonstraram que diferentes níveis da expressão *MYCN* em células de linhagem tumoral e de amostra tumoral, ambos sem amplificação, ocasionaram diferentes valores da expressão nos genes de proteínas ribossômicas, assim como uma diferença no volume do RNA ribossômico. O perfil gênico da célula sem amplificação e com aumento da expressão *MYCN* correlacionou-se *in vivo* com o perfil gênico do tumor amplificado e com aumento da expressão. Portanto, concluíram que a proteína *MYCN* ao início de sua ação induz genes

com função na síntese proteica, independente do seu nível de expressão e sugerem que poderiam ocorrer outras alterações, associadas ou não a outros fatores.

Alaminos et al (2003) numa ampla análise gênica da expressão *MYCN* identificaram alguns mecanismos biológicos e um perfil gênico associado com o aumento da expressão proteica. Observaram que o perfil gênico correlacionou-se com o nível de expressão *MYCN* e a sua atuação reguladora sobre outros genes nem sempre foi independente e muitas vezes foi associada a outras estruturas celulares. Eles definiram um perfil gênico para os tumores com aumento da expressão *MYCN* e um outro perfil para aqueles sem o aumento, independente da amplificação do gene *MYCN*. Concluíram que uma sub-classificação molecular baseada no nível da expressão gênica poderá vir a proporcionar melhores resultados terapêuticos.

Foi observado por Krasnoselsky et al (2004) que para cada estágio tumoral corresponderia um perfil da expressão gênica, por exemplo, genes relacionados ao processo biológico de proliferação celular apresentavam aumentos nas expressões nos tumores estádios 4, mas não nos tumores estádios 1, 2 ou 3. Quando analisaram um tumor com amplificação do *MYCN* e estágio 4 observaram que os genes relacionados com a proliferação celular apresentavam aumento na intensidade de suas expressões, assim como aqueles relacionados com a síntese proteica. No tumor sem amplificação as expressões correspondentes a estes genes estavam ausentes. Eles concluíram portanto que, a expressão sem amplificação não era clinicamente relevante e entre uma célula amplificada e outra não amplificada o perfil gênico era distinto.

Outro estudo, publicado por Hiyama et al (2004), analisou a expressão *MYCN* relacionada às características histológicas. Ao estabelecer o perfil de expressão gênica para o grupo histológico desfavorável e para o favorável em 20 amostras tumorais,

observou que nos tumores com histologia favorável as expressões dos genes responsáveis pela diferenciação neuronal e apoptose, tanto na amostra tumoral em maturação como na em regressão, apresentaram aumentos em seus valores. Já, nos tumores com histologia desfavorável as expressões de genes reguladores do ciclo celular e da síntese proteica, incluindo o gene *MYCN*, apresentaram-se aumentadas tanto nos tumores amplificados como nos não amplificados. Quando em nossa casuística analisamos a expressão do transcrito *MYCN* em relação à classificação de prognóstico favorável e desfavorável observamos que os maiores valores estavam presentes entre os pacientes com histologia desfavorável (mínimo 0,041, máximo de 11,753 e mediana 4,332), mas esta diferença entre eles não apresentou significância estatística.

Matsunaga et al (2000) avaliaram a expressão do transcrito *MYCN* em três grupos de pacientes: Grupo [1] com crianças <1 ano e diagnóstico feito através do exame de “screening” (n=39); Grupo [2] com crianças <1 ano, tumor não amplificado e com diagnóstico clínico (n=16); Grupo [3] com crianças \geq 1 ano, tumor não amplificado e com diagnóstico clínico (n=15). Eles observaram que as crianças do Grupo [1] apresentaram valores altos no nível de expressão do transcrito *MYCN* em relação ao Grupo [2], mas a expressão não foi um fator desfavorável em nenhum dos grupos. Concluíram que o aumento da expressão do transcrito *MYCN* pode ser parte de um mecanismo biológico que induz morte celular em crianças <1 ano com tumores não amplificados e sem manifestação clínica.

Entretanto, Kitanaka et al (2002) observaram que em amostra tumoral de neuroblastoma, com diagnóstico realizado pelo exame de “screening”, a expressão do gene *RAS* estava aumentada em áreas de degeneração celular sem características de apoptose. Estudando as células da linhagem do neuroblastoma observaram que o gene

RAS in vitro induziu a célula para uma degeneração autofágica e as alterações foram semelhantes às obtidas *in vivo* na amostra tumoral. A evolução de neuroblastoma em criança com idade <1 ano e diagnóstico realizado pelo exame de “screening” apresentou regressão espontânea em aproximadamente 30% dos casos e quando diagnosticado clinicamente apresentou uma menor frequência de regressão, mesmo ocorrendo em idades semelhantes. Eles sugeriram duas possibilidades: fatores hereditários de controle genético poderiam aumentar a expressão *HRAS* em crianças <1 ano com diagnóstico pelo exame de “screening”; ou, como no neuroblastoma a expressão *MYCN* é inversamente proporcional à expressão *HRAS*, o aumento da expressão *MYCN* inibiria a expressão *HRAS* impedindo a regressão tumoral espontânea em crianças <1 ano e com tumor clinicamente diagnosticado.

Como vimos, a relevância clínica da expressão *MYCN* permanece indefinida e controversa. Alguns trabalhos, incluindo o de Krasnoselsky et al (2004) referiram que o aumento da expressão *MYCN* em neuroblastoma não amplificado é insuficiente para causar alterações significativas no mecanismo da síntese proteica. Porém, Boon et al (2002) como já relatamos, referiram que a ação do *MYCN* nos genes envolvidos na síntese proteica foi precoce e outros fatores associados à expressão poderiam exercer uma importante influência. Igualmente, Valent et al (2002) sugeriram que o aumento da expressão *MYCN* sem amplificação poderia proporcionar um aumento no nível da proteína *MYCN*, suficientemente capaz de alterar o processo biológico, quando associado a outros fatores.

Pacientes AR e não-AR apresentam diferentes respostas ao tratamento e esta diferença é observada em vários estudos clínicos (George et al, 2001; Mora et al, 2001; Mora et al, 2002). Na análise global de nossa casuística também observamos uma maior

freqüência de doença progressiva e morte no grupo AR em relação ao não-AR, com significância estatística ($P=0,027$ e $P=0,014$ respectivamente).

No grupo sem aumento da expressão não encontramos diferença com significância estatística na freqüência de doença progressiva entre os pacientes AR e não-AR, mas a freqüência de morte foi maior entre os pacientes do grupo AR em relação ao não-AR e apresentou uma diferença com significância estatística ($P=0,028$).

No grupo não-AR sem aumento da expressão uma criança com idade ≥ 1 ano, estágio 2 e diagnóstico histológico de ganglioneuroblastoma apresentou maturação tumoral pós-quimioterapia e outra com idade < 1 ano, estágio III e histologia favorável apresentou doença progressiva seis meses após o início do seu tratamento e obteve novamente remissão completa. Porém, no grupo AR seis crianças apresentaram doença progressiva e todas morreram.

Ao contrário, observamos que as freqüências de doença progressiva e de morte entre pacientes AR e não-AR do grupo com aumento da expressão não apresentaram diferença.

Quando avaliamos os pacientes do grupo não-AR e com aumento da expressão encontramos seis crianças com idade < 1 ano e três com idade ≥ 1 ano, sendo que três apresentaram doença progressiva. Entre as três crianças, duas eram < 1 ano e não obtiveram nova remissão e a outra criança era ≥ 1 ano, estágio 2, com histologia favorável e morreu sem obter remissão completa, 1 mês após o diagnóstico. No grupo AR quatro crianças apresentaram doença progressiva sendo que, uma morreu e três não obtiveram nova remissão.

Nosso estudo, diferentemente do estudo de Krasnoselsky et al (2004), sugeriu que na criança com estágio clínico não avançado a evolução clínica foi melhor, quando

menor foi seu nível de expressão, porém, este resultado foi obtido em uma amostra pequena de pacientes.

Quando em 1985, Seeger et al observaram que pacientes com amplificação do gene *MYCN* apresentaram rápida progressão tumoral e referiram uma menor sobrevida nestes pacientes. Eles também relataram que o neuroblastoma sem amplificação pode apresentar um pequeno aumento no número de cópias do gene *MYCN* (entre três a dez cópias) e os pacientes tem uma sobrevida menor em relação aquela apresentada pelos pacientes portadores de neuroblastoma com uma única cópia do gene *MYCN* (SLE em 18 meses de 30% e 70%, respectivamente). Segundo Valent et al (2002) estes resultados em crianças sem amplificação demonstrariam existir um efeito linear da dosagem *MYCN* na sobrevida das crianças e que níveis baixos da expressão poderiam causar um efeito protetor.

Nossos resultados relacionados à SG dos pacientes AR e não-AR foram semelhantes a outros estudos já publicados, com SG / 2 anos de 14% e 84%, respectivamente. (P=0,05) (Cohn et al, 2000; George et al, 2001; Goto et al, 2001; Mora et al, 2002).

7 – CONCLUSÕES

De acordo com nossos resultados, concluímos que no grupo de neuroblastoma sem amplificação:

- a) Não há associação de prognóstico entre o aumento da expressão do transcrito *MYCN* e a evolução clínica na totalidade da amostra avaliada. Entretanto, em crianças com estágio clínico não avançado o nível de expressão do transcrito *MYCN* sugere um efeito protetor associado a seus menores índices.
- b) Não há associação entre o nível de expressão do transcrito *MYCN* e a classificação patológica de prognóstico, o grupo de risco e a idade ao diagnóstico.

8 – ANEXOS

8.1 – Anexo 1

Protocolo NEURO-I-80 e NEURO-II-82 modificados.

Grupo Risco Intermediário → Tratamento quimioterápico e cirúrgico.

- Quatro ciclos indutórios, com intervalo de 21 dias entre eles, com:
 - a) ciclofosfamida – 150 mg/m²/d EV ou VO durante 7 dias
 - b) adriamicina – 35 mg/m²/dia EV no dia 8
- Reavaliação cirúrgica
 - a) se negativa: final de tratamento
 - b) se positiva: reiniciar quimioterapia (reavaliar após 3 ciclos)
- Reavaliação imagenológica exclusiva em tumores primários torácicos

8.2 – Anexo 2

Protocolo NEURO-VIII-97 e NEURO-IX-2000.

Grupo Alto Risco → Tratamento quimioterápico, cirúrgico e radioterápico

D) Protocolo Neuro-VIII-97

São quatro ciclos indutórios e o início de um novo ciclo será no 38º dia do último ciclo, sendo os dois primeiros iniciados com qualquer contagem celular e os dois últimos com granulócitos ≥ 500 células/mm³ e plaquetas ≥ 50.000 células/mm³.

- Ciclofosfamida: 200 mg/m²/dia EV ou VO durante 7 dias
- Adriamicina: 45 mg/m²/dia EV no dia 8
- Vincristina: 1,5 mg/m²/d EV nos dia 14 e dia 21
- Carboplatina: 200 mg/m²/dia EV em 1 hora nos dia 20, dia 21 e dia 22
- VP-16: 300 mg/m²/dia EV em 6 horas nos dia 20, dia 21 e dia 22
- Verapamil (iniciar 1 hora antes da carboplatina): doses e amostras conforme protocolo fase I com Verapamil utilizado concomitantemente ao estudo Neuro-VIII-97

	Infusão de 72 horas consecutivas (mg/kg)			
60 min pré-QT	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4
0,1	0,2	0,25	0,3	0,35

a) Resposta clínica completa (após 4º ciclo)

Definir resposta cirúrgica e caracterização de envolvimento de SN e/ou meníngeo

- Resposta cirúrgica completa (ausência de tumor a cirurgia retardada ou resíduos microscópicos pós-cirurgia): transplante autólogo de medula óssea (TAMO).
- Resposta cirúrgica parcial: MIBG terapêutico (10 mCi/kg, máximo de 800mCi) + coleta de células tronco, após MIBG → TAMO.
- Tumores residuais macroscópicos: radioterapia localizada (2.400 – 3000 cGy).
- Infiltração meníngeo documentada ou envolvimento extenso de calota craniana: radioterapia craniana (2.400 cGy).

b) Doença progressiva (após 4º ciclo)

- Inclusão em programas fase I ou II
- Decisões eletivas relativas à indicação de TAMO com MIBG terapêutico prévio.

D) Protocolo Neuro-IX-2000

São 2 fases com dois ciclos pré-indutórios e quatro ciclos indutórios, com reavaliação clínica após cada fase. Ao final da 2ª fase ocorre uma avaliação cirúrgica e radioterapia. Posteriormente, MIBG terapêutico e TAMO.

a) 1ª fase

- Ciclofosfamida: 250 mg/m²/dia EV em 30min nos dias 1a 5
- Topotecan: 0,75 mg/m²/dia EV em 30min nos dias 1a 5
- G-GM/CSF: 10 mcg/kg/dia SC ou EV no período do 6º dia ao 15º dia
- Reiniciar ciclo no dia 16

b) Reavaliação clínica ao término do 2º ciclo

c) 2ª fase

- Ciclofosfamida: 200 mg/m²/dia EV ou VO dias 1 ao 7
- Adriamicina: 45 mg/m²/dia EV no dia 8
- Carboplatina: 300 mg/m²/dia EV em 1h nos dias 20 a 22
- Etoposide: 300 mg/m²/dia EV em 6h nos dias 20 a 22
- Verapamil: 0,1 mg/kg EV em 15min, após 0,2 mg/kg/hora EV contínuo nos dias 19 a 22
- Vincristina: 1,5 mg/m²/dia EV no dia 28
- G-GM/CSF: 10 mcg/kg/dia SC ou EV nos dias 23 a 34
- Reiniciar novo ciclo no dia 35

d) Reavaliação clínica ao término do 4º ciclo

e) Reavaliação cirúrgica: se possível, fazer a retirada de todo tumor

f) MIBG terapêutico: 10-12 mci/kg

g) TAMO

8.3 – Anexo 3

Classificação patológica de prognóstico:

“International Neuroblastoma Pathology Classification” (INPC)

PROGNÓSTICO	HISTOPATOLOGIA E IDADE
FAVORÁVEL	Estroma rico, não nodular, todas as idades
	Estroma pobre, em diferenciação, MKI ⁽¹⁾ <100, idades: 1 ½ → 5 anos
	Estroma pobre, MKI ⁽¹⁾ <200, idade < 1 ½ anos
DESFAVORÁVEL	Estroma rico, nodular, qualquer idade
	Estroma pobre, idade > 5 anos
	Estroma pobre, indiferenciado, idades: 1 ½ → 5 anos
	Estroma pobre, em diferenciação, MKI ⁽¹⁾ >100, idades: 1 ½ → 5 anos
	Estroma pobre, MKI ⁽¹⁾ >200, idade < 1 ½ anos

⁽¹⁾ MKI – índice de mitose : cariorrexia

8.4 – Anexo 4

Estadiamento tumoral:

“International Neuroblastoma Staging System” (INSS)

ESTÁDIO	CARACTERIZAÇÃO
I	Tumor localizado, confinado à área de origem; remoção macroscopicamente completa, com ou sem doença residual microscópica; linfonodos ipsi e contralaterais identificados livres de comprometimento neoplásico
2 A	Tumor unilateral com remoção macroscopicamente incompleta; linfonodos ipsi e contralaterais identificados livres de comprometimento neoplásico
2 B	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 regional de linfonodos; ou tumor unilateral, com envolvimento contralateral de linfonodos; ou ainda, tumor de linha média, com envolvimento bilateral de linfonodos
4	Disseminação do tumor a linfonodos distantes, ossos, medula óssea, fígado ou outros órgãos (exceto como definido em 4S)
4 S	Tumor primário localizado conforme definido para estádios 1 ou 2, com disseminação metastática limitada a fígado, pele e medula óssea (infiltração ≤ 10% das células neoplásicas)

8.5 – Anexo 5

Sistema de estratificação para grupos de risco:

“COG Risk Stratification System”.

Estádio (INSS)	Idade (anos)	MYCN ⁽¹⁾	Histologia (Shimada)	DNAi ⁽²⁾	Grupos de risco
I	0 – 21	Qualquer	Qualquer	Qualquer	Baixo
2 A	< 1	Qualquer	Qualquer	Qualquer	Baixo
2 B	≥ 1 → 21	Sem amplificação	Qualquer		Baixo
	≥ 1 → 21	Amplificado	Favorável		Baixo
	≥ 1 → 21	Amplificado	Desfavorável		Alto
3	< 1	Sem amplificação	Qualquer	Qualquer	Intermediário
	< 1	Amplificado	Qualquer	Qualquer	Alto
	≥ 1 → 21	Sem amplificação	Favorável		Intermediário
	≥ 1 → 21	Sem amplificação	Desfavorável		Alto
	≥ 1 → 21	Amplificado	Qualquer		Alto
4	< 1	Sem amplificação	Qualquer	Qualquer	Intermediário
	< 1	Amplificado	Qualquer	Qualquer	Alto
	≥ 1 → 21	Qualquer	Qualquer		Alto
4 S	< 1	Sem amplificação	Favorável	> 1	Baixo
	< 1	Sem amplificação	Qualquer	= 1	Intermediário
	< 1	Sem amplificação	Desfavorável	Qualquer	Intermediário

⁽¹⁾ MYCN amplificado → número de cópias > 1; ⁽²⁾ DNAi - índice mitótico

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel F, Ejeskär K, Kogner P, Martinsson T. Gain of chromosome arm 17q is associated with unfavorable prognosis in neuroblastoma, but does not involve mutations in the somatostatin receptor 2 (SSTR2) gene at 17q24. *Br J Cancer*. 1999;81:1402-09.

Alaminos M, Mora J, Cheung N-KV, Smith A, Qin J, Chen L et al. Genome-wide analysis of gene expression associated with *MYC* in human neuroblastoma. *Cancer Res*. 2003;63:4538-46.

Bernard PS, Wittwer CT. Real-Time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem*. 2002;48:1178-85.

Boon K, Caron HN, Van Asperen R, Valentijn L, Hermus M-C, Van Sluis P et al. *N-myc* enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *EMBO J*. 2001;20:1383-93.

Bordow SB, Norris MD, Haber PS, Marshall GM, Haber M. Prognostic significance of *MYCN* oncogene expression in childhood neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 1998;16:3286-94.

Bown N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biologic aspects. *J Clin Pathol.* 2001;54:897-910.

Brodeur GM, Seeger RC. Gene amplification in human neuroblastomas: basic mechanisms and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet.* 1986;19:101-111.

Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F. Revision in the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. *J Clin Oncol.* 1993;11:1466-77.

Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogart MD, White PS. Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1997;19:93-101.

Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editores. *Principles and Practice of Pediatric Oncology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p.895-937.

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

Camargo B, Sredni ST. Tumores Pediátricos. In: Ferreira CG, Rocha JC, editores. *Oncologia Molecular.* São Paulo: Atheneu; 2004. p.251-70.

Caron H, van Sluis P, de Kraker, et al. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1996;97:362-64.

Castleberry RP. Biology and treatment of neuroblastoma. *Pediatr Clin North Am.* 1997;44:919-37.

Castleberry RP. Predicting outcome in neuroblastoma [editorial]. *N Engl J Med.* 1999;340:1992-3.

Chan HSL, Gallie BL, DeBoer G, Haddad G, Ikegaki N, Dimitroulakos J et al. *MYCN* protein expression as a predictor of neuroblastoma prognosis. *Clin Cancer Res.* 1997;3:1699-1706.

Choo KH, Brown RM, Earle E. *In situ* Hybridization of Chromosomes. In: Mathew C, editor. *Methods in Molecular Biology: Protocols in Human Molecular Genetics.* Clifton: The Human Press Inc; 1991. p.233-54.

Cohn SL, London WB, Huang D, Katzenstein HM, Salwen HR, Reinhart T et al. *MYCN* expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with nonamplified *MYCN*. *J Clin Oncol.* 2000;18:3604-13.

De Preter K, Speleman F, Combaret V, Lunec J, Laureys G, Eussen BHJ et al.
Quantification in neuroblastoma using a Real-Time Quantitative PCR assay. *Mod Pathol*. 2002;15:159-66.

Eggert A, Ho R, Ikegaki N, Liu X-g, Brodeur GM. Different effects of *TrkA* expression in neuroblastoma cell lines with or without *MYCN* amplification. *Med Pediatr Oncol*. 2000;35:623-27.

George RE, Variend S, Cullinane C, Cotterill SJ, McGuckin AG, Ellershaw C et al.
Relationship between histopathological features, *MYCN* amplification, and prognosis: a UKCCSG study. *Med Pediatr Oncol*. 2001;36:169-76.

Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: Na emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*. 2002;30:503-12.

Goto S, Umehara S, Gerbing RB, Stram DO, Brodeur GM, Seeger RC et al.
Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and *MYCN* status in patients with peripheral neuroblastic tumors. *Cancer*. 2001; 92:2699-2708.

Hann H-W L, Evans AE, Cohen IJ, Leitmeyer JE. Biologic differences between neuroblastoma stage 4-S and 4. *N Engl J Med*. 1981;305:425-29.

Hiyama E, Hiyama K, Yamaoka H, Sueda T, Reynolds CP, Yokoyama T. Expression profiling of favorable and unfavorable neuroblastomas. *Pediatr Surg Int.* 2004;20:30-38.

Ho R, Eggert A, Hishiki T, Minturn JE, Ikegaki N, Foster P et al. Resistance to chemotherapy mediated by *TrkB* in neuroblastomas. *Cancer Res.* 2002;62:6462-66.

Hogart MD. The requirement for evasion of programmed cell death in neuroblastomas with *MYCN* amplification. *Cancer Lett.* 2003;197:173-9.

Joshi VV. Peripheral neuroblastic tumors: pathologic classification based on recommendations of International Neuroblastoma Pathology Committee (modification of Shimada classification). *Pediatr Dev Pathol.* 2000;3:184-199.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;53:457-81.

Kitanaka C, Kato K, Ijiri R, Sakurada K, Tomiyama A, Noguchi K et al. Increased *RAS* expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:358-68.

Krasnoselsky AL, Whiteford CC, Wei JS, Bilke S, Westermann F, Qing-Rong C et al.

Altered expression of cell cycles genes distinguishes aggressive neuroblastoma.

Oncogene. 2004;12:1-9.

Lastowska M, Cullinane C, Variend S, Colterill S, Bown N, O' Neill S et al.

Comprehensive genetic and histopathologic study reveals three types of neuroblastoma

tumors. *J Clin Oncol*. 2001;19:3080-90.

Lonergan GF, Schwab CM, Suarez ES. Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and

ganglioneuroma: radiologic-pathologic correlation. *RadioGraphics*. 2002;22:911-34.

Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA. Cellular DNA content as
a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N*

Engl J Med. 1984;311:231-35.

Lukkens JN. Neuroblastoma in the neonate. *Semin Perinatol*. 1999;23:346-49.

Maris JM, Guo C, Blake D, White PS, Hogarty MD, Thompson PM et al.

Comprehensive analysis of chromosome 1p deletions in neuroblastoma. *Med Pediatr*

Oncol. 2001;36:32-36.

Maris JM, Denny CT. Focus on embryonal malignancies. *Cancer Cell*. 2002;2:447-50.

Matsunaga T, Shirasawa H, Hishiki T, Yoshida H, Kouchi K, Ohtsuka Y et al. Enhanced expression of N-*myc* messenger RNA in neuroblastoma found by mass screening. *Clin Cancer Res.* 2000;6:3199-3204.

Matthay KK. *MYCN* expression in neuroblastoma: A mixed message? [editorial]. *J Clin Oncol.* 2000;18:3591-4.

Mora J, Cheung N-KV, Chen L, Qin J, Gerald W. Survival analysis of clinical, pathologic, and genetic features in neuroblastoma presenting as locoregional disease. *Cancer.* 2001;91:435-42.

Mora J, Gerald WL, Qin J, Cheung N-KV. Evolving significance of prognostic markers associated with treatment improvement in patients with stage 4 neuroblastoma. *Cancer.* 2002;94:2756-65.

Mora J, Gerald WL, Nai-Kong V C. Evolving significance of prognostic markers associated with new treatment strategies in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 2003; 197:119-24.

Motta VT, Wagner MB, editores. *Bioestatística*. Caxias do Sul: Educ / Robe Editorial; 2003.

Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor BS, Brodeur MG. Association between high levels of expression of the *TRK* gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1993; 328:847-54.

Odone Filho, V. *Tratamento combinado dos neuroblastomas: resultados do protocolo NEURO-I-80* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;1986.

Odone Filho, V. *Tratamento convencional dos neuroblastomas* [tese livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;1992.

Oue T, Fukuzawa M, Kamata S, Okada A. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen expression in human neuroblastoma. *J Pediat Surg.* 1995;30:528-32.

Pinho M, editor. *Biologia Molecular do Câncer: fundamentos para a prática médica.* Rio de Janeiro: Revinter; 2005.

Pritchard J, Hickman JA. Why does stage 4S neuroblastoma regress spontaneously? *Lancet.* 1994;344:869-70.

Raggi CC, Bagnoni ML, Tonini GP, Maggi M, Vona G, Pinzani P et al. Real-Time Quantitative PCR for the measurement of *MYCN* amplification in human neuroblastoma with the TaqMan detection system. *Clin Chem.* 1999;45:1918-24.

Schleiermacher G, Peter M, Michion J, Hugot J-P, Vielh P, Zucker J-M et al. Two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma. *Genes Chrom Cancer*. 1994;10:275-81.

Schmidt ML, Lukens JN, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Gerbing RB et al. Biologic factors determine prognosis in infants with stage 4 neuroblastoma: a prospective Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol*. 2000;18:1260-68.

Schulte JH, Schramm A, Klein-Hitpass L, Klenk M, Wessels H, Hauffa BP et al. Microarray analysis reveals differential gene expression patterns and regulation of single target genes contributing to the opposing phenotype of *TrkA*- and *TrkB*-expressing neuroblastomas. *Oncogene*. 2005;24:165-77.

Schwab M, Prami C, Ambler LC. Genomic instability in 1p and human malignancies. *Genes Chrom Cancer*. 1996;16:211-29.

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

Schwab M. *MYCN* in neuronal tumors. *Cancer Lett*. 2004;204:179-87.

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

Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY et al. Association of multiple copies of the *N-myc* oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med.* 1985;313:1111-16.

Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System). *Cancer.* 1999;86:364-72.

Shimada H, Nakagawa A, Peters J, Wang H, Wakamatsu P, Lukens JN et al. *TrkA* expression in peripheral neuroblastic tumors. *Cancer.* 2004;101:1873-81.

Sinniah D, D'Angio G, editores. *Atlas of Pediatric Oncology.* Londres: Arnold; 1996.

Spitz R, Hero B, Skowron M, Ernestus K, Berthold F. *MYCN*-status in neuroblastoma: characteristics of tumours showing amplification, gain, and non-amplification. *Eur J Cancer.* 2004;40:2753-59.

Sugihara E, Kanai M, Matsui A, Onodera M, Schwab M, Miwa M. Enhanced expression of *MYCN* leads to centrosome hyperamplification after DNA damage in neuroblastoma cells. *Oncogene.* 2004;23:1005-9.

Takeda O, Homma C, Maseki N, Sakurai M, Kanda N, Schwab M et al. There may be two tumor suppressor genes on chromosome arm 1p closely associated with biologically distinct subtypes of neuroblastoma. *Genes Chrom Cancer*. 1994;10:30-39.

Tanaka S, Tajiri T, Noguchi S, Shono K, Ihara K, Hara T et al. Clinical significance of a highly sensitive analysis for gene dosage and the expression level of *MYCN* in neuroblastoma. *J Pediatr Surg*. 2004;39:63-68.

Triche TJ, Sorensen PHB. Molecular Pathology of Pediatric Malignance. In: Pizzo PA, Poplack DG, editores. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p.161-204.

Valent A, Le Roux G, Barrois M, Terrier-Lacombe MJ, Valteau-Couanet D, Léon B et al. *MYCN* gene overrepresentation detected in primary neuroblastoma tumour cells without amplification. *J Pathol*. 2002;198:495-501.

Van Noesel MM, Pieters R, Voûte PA, Versteeg R. The N-*myc* overexpression in neuroblastomas is associated with sensitivity as well as resistance to apoptosis. *Cancer Lett*. 2003;197:165-172.

Van Noesel MM, Versteeg R. Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic ‘Dance Macabre’. *Gene*. 2004;325:1-15.

Vandesompele J, Speleman F, Van Roy N, Laureys G, Brinkschmidt C, Christiansen H et al. Multicentre analysis of patterns of DNA gains and losses in 204 neuroblastoma tumors: how many genetic subgroups are there? *Med Pediatr Oncol.* 1998;36:5-10.

Westermann F, Schwab M. Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Lett.* 2002;184:127-47.

10 – Apêndice 1

Planilha de identificação e dos dados clínico-laboratoriais do paciente.

Nome DN ⁽¹⁾	I ⁽²⁾	S ⁽³⁾	T ⁽⁴⁾	Meta ⁽⁵⁾	P ⁽⁶⁾	E ⁽⁷⁾	G ⁽⁸⁾	Diag ⁽⁹⁾	Tratam ⁽¹⁰⁾	Evento ⁽¹¹⁾	Ult aval ⁽¹²⁾

⁽¹⁾ DN – data de nascimento

⁽²⁾ I – idade ao diagnóstico

⁽³⁾ S – sexo

⁽⁴⁾ Tumor – local primário do tumor

⁽⁵⁾ Meta – local de metástase, quando estágio 4 ou 4S

⁽⁶⁾ P – classificação patológica de prognóstico (favorável / desfavorável)

⁽⁷⁾ E – estadiamento clínico

⁽⁸⁾ GR – grupo de risco

⁽⁹⁾ Diagn – data do diagnóstico

⁽¹⁰⁾ Tratam – data do início do tratamento

⁽¹¹⁾ Eventos – data de recaída tumoral ou óbito

⁽¹²⁾ Ult aval – data da última consulta à partir de janeiro de 2005