

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Deli Grace de Barros Araújo

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA
QUIESCINA/SULFIDRIL OXIDASE 1 (QSOX1) EM
NEUROBLASTOMAS HUMANOS E SUA
CORRELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS
CLÍNICO-PATOLÓGICOS E COM BIOMARCADORES
DE PROGRESSÃO TUMORAL**

**CURITIBA
2011**

Deli Grace de Barros Araújo

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA
QUIESCINA/SULFIDRIL OXIDASE 1 (QSOX1) EM
NEUROBLASTOMAS HUMANOS E SUA
CORRELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS
CLÍNICOPATOLÓGICOS E COM
BIOMARCADORES DE PROGRESSÃO TUMORAL**

**Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade
Católica do Paraná, como requisito para obtenção
do título de Doutor.**

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia de Noronha

Coordenador: Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho

**CURITIBA
2011**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR

A663e
2011

Araújo, Deli Grace de Barros

Expressão imunoistoquímica da quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) em neuroblastomas humanos e sua correlação com fatores prognósticos clinicopatológicos e com biomarcadores de progressão tumoral / Deli Grace de Barros Araújo ; orientadora, Lúcia de Noronha ; coordenador, Roberto Pecoits Filho. -- 2011.
77 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2011
Bibliografia: p. 64-75

1. Neuroblastoma. 2. Apoptose. 3. Proliferação de células. 4. Prognóstico.
I. Noronha, Lúcia de. II. Pecoits Filho, Roberto. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
IV. Título.

CDD 20. ed. – 610

À minha família, pela compreensão e apoio.

À minha mãe que desde cedo me estimulou a acreditar nos sonhos.

À minha orientadora, Dra. Lúcia de Noronha, pela confiança em mim depositada.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Lúcia de Noronha, minha orientadora que admiro por sua capacidade e dedicação na elaboração deste projeto.

À equipe do Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, especialmente a Ana Paula Camargo Martins e a Marina Luise Viola de Azevedo, sempre dispostas a ensinar e dividir sua experiência.

Aos alunos do PIBIC que colaboraram com o projeto.

À funcionária da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Alcione por desempenhar seu trabalho de forma tão correta e sempre disposta a colaborar com os alunos.

A Dra. Flora Watanabe, chefe do Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital Pequeno Príncipe por ter autorizado o acesso aos prontuários dos pacientes acompanhados naquele Hospital.

A Dra. Elizabeth Gugelmin pela colaboração imprescindível para a realização desta pesquisa.

Aos professores do Programa de Doutorado em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná pelo aprendizado adquirido.

À Professora Márcia Olandoski pela realização da análise estatística desta pesquisa.

Aos professores Dra. Mara Albonei e Dr. Bonald Figueiredo pela valiosa contribuição na elaboração final desta Tese.

Aos meus colegas de trabalho que me ajudaram de alguma maneira para que eu pudesse ausentar-me nos períodos das aulas e compromissos com o Programa de Doutorado.

Enfim agradeço a ajuda e compreensão de todos que se envolveram comigo de alguma forma para que meu objetivo fosse alcançado.

**SE EU PUDER DIMINUIR O SOFRIMENTO,
OU ALIVIAR A DOR DE ALGUÉM,
OU AJUDAR UM PÁSSARO FERIDO
A VOLTAR PARA SEU NINHO,
NÃO TEREI VIVIDO EM VÃO.**

- EMILY DICKINSON

RESUMO

Neuroblastoma é o tumor sólido maligno extracraniano mais comum da infância. Enquanto que em crianças muito pequenas podem regredir espontaneamente ou apresentar boa resposta ao tratamento, alterações genéticas que influenciam a apoptose, em alguns casos, podem conferir resistência à quimioterapia ou determinar recidivas, alterando o prognóstico destes pacientes. O objetivo do estudo é correlacionar a expressão imunoistoquímica da proteína QSOX1 e de outros biomarcadores (PTEN, Ki67, Bcl2, caspase 8 e Bax), em amostras de neuroblastoma isentos de tratamento, com seus fatores prognósticos clinicopatológicos e com sua evolução clínica. Os blocos histopatológicos com amostras dos neuroblastomas (n=23) foram submetidos a testes de imunoistoquímica, após serem organizados em tissue microarray. Os casos foram classificados de acordo com os fatores prognósticos clinicopatológicos (idade ao diagnóstico, se maior ou menor que 18 meses; localização da lesão no momento do diagnóstico, se abdominal ou extra-abdominal; presença ou não de infiltração da medula óssea; grau de diferenciação tumoral, se bem ou pouco diferenciados; classificação histopatológica de Shimada, se favorável ou desfavorável; estado da matriz extracelular tumoral, se rico ou pobre em estroma com células de Schwann diferenciadas e presença ou não de amplificação do *MYCN*) e; de acordo com a evolução clínica (se em óbito ou vivo com ou sem recidivas). Doze casos eram do sexo feminino, nove crianças tinham idade maior que 18 meses, nove apresentavam tumor com localização extra-abdominal e nove pacientes tinham tumores com histologia desfavorável. Quinze pacientes haviam realizado punção de medula óssea, sendo quatro casos positivos para metástases. Nove pacientes evoluíram para o óbito. A QSOX1 apresentou maior expressão imunoistoquímica em crianças menores de 18 meses com neuroblastomas em diferenciação ($p=0,029$) de localização abdominal e sem metástases na medula óssea. O anticorpo Ki67 apresentou maior expressão imunoistoquímica em crianças maiores de 18 meses com tumores indiferenciados ($p = 0,013$), de localização extra-abdominal, com presença de metástase em medula óssea, sendo que este índice proliferativo se correlacionou com a QSOX1 de maneira inversamente proporcional. A imunoexpressão elevada de QSOX1 correlacionou-se com fatores clinicopatológicos de bom prognóstico, sem impacto na evolução clínica. A QSOX1 tem funções que incluem a maturação de matriz extracelular e a indução de apoptose e por este motivo pode estar envolvida no processo de diferenciação benigna e regressão do neuroblastoma, podendo funcionar assim como um biomarcador de algum valor na determinação de grupos de risco para esta neoplasia.

Palavras-chaves: Neuroblastoma, proliferação, apoptose, fatores prognósticos.

ABSTRACT

Neuroblastoma is the solid malignant extracranial tumor most common in childhood. While in very young children it may regress spontaneously or show good response to treatment, genetic changes in apoptosis pathway may result in resistance to chemotherapy or premature relapses with poor outcome. The objective of this study is to correlate the immunohistochemical expression of QSOX1, PTEN, Ki67, Bcl2, Bax and caspase 8 in samples of neuroblastoma without treatment, with their prognostic clinical and pathological factors and with their follow up. The block of tissue samples of neuroblastoma (n = 23) underwent immunohistochemical analysis. Cases were classified according to prognostic factors (diagnostic age greater or less than 18 months; diagnostic lesion location if abdominal or extra abdominal; presence or absence of bone marrow infiltration; tumor grade if well differentiated or poor differentiated; histopathological grading according Shimada if favorable or unfavorable; matrix extracellular status if stroma rich or poor in differentiated Schwann cells; presence or absence of MYNC amplification) and clinical outcome (if death or alive with or without relapses). Twelve cases were females, 9 children were older than 18 months, 9 patients had tumor with the extra-abdominal metastasis and 9 patients had tumors with unfavorable histology. Fifteen patients had undergone bone marrow aspiration, 4 positive for metastasis. Nine patients subsequently died. The QSOX1 showed higher immunohistochemistry expression in children younger than 18 months with neuroblastoma in differentiation ($p = 0.029$) and abdominal location without metastasis in bone marrow. The antibody Ki67 showed higher immunohistochemical expression in children older than 18 months with undifferentiated tumors ($p = 0.013$), extra-abdominal location, with metastasis to bone marrow. The immunohistochemical expression of QSOX1 was associated with good prognostic factors, however, with no impact in the clinical outcome. The QSOX1 has functions that include the maturation of extracellular matrix and induction of apoptosis and for this reason may be involved in the process of benign differentiating and regression of neuroblastoma, which can act as a biomarker of some value in determining risk groups for this neoplasm.

Keywords: Neuroblastoma, proliferation, apoptosis and prognostic factors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF – Apoptosis inducing factor
APAF1 – Apoptotic protease activating factor 1
Bax – (*Rattus norvegicus*) – Bcl2 associated X protein
Bcl2 – (*Rattus norvegicus*) – B-cell CLL/lymphoma 2
Caspase 8 – (*Homo sapiens*) – Apoptoses – related cysteine peptidase
COG – Children's Oncology Group
CISH – Cromogenic *in situ* hybridization
DNA – Ácido desoxirribonucléico
FAD – Flavina adenina dinucleotídeo
FAS – Receptor de membrana
FASL – Ligante Fas
FISH- Fluorescence *in situ* hibridization
HE – hematoxilina-eosina
HsQSOX1- Quiescina sulfidril oxidase 1 humana
INRG – International Neuroblastoma Risc Group
INPC – International Neuroblastoma Pathology Committee
INSS – International Neuroblastoma Staging System
Ki67 – (*Salmo salar*) – Antígeno Ki67
LDH – Desidrogenase láctica
MDR – multi-drug-resistance
MI – Índice mitótico
MKI – Índice mitose/cariorréxis
MOMP – Mitochondrial-outer-membrane-permeabilization
mRNA – micro Ácido ribonucléico
MYCN – *n-myc* mielocytosis viral related onogene, neuroblastoma
PCR – Polymerase chain reaction
PCNA – Proliferating cell nuclear antigen
PIP3 – Fosfatidilinositol-3
PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase
POG – Pediatric Oncology Group
Pgp – Glicoproteína P
PTEN – (*homo sapiens*) Phosphatase and tensin homolog
Qsox1/QSOX1 – (*Rattus norvegicus*)/(*Homo sapiens*) quiescina Q6 sulfidril oxidase 1
QSOX1_S . Quiescina sulfidril oxidase 1 curta
QSOX1_L - Quiescina sulfidril oxidase 1 longa
QSOX 2 – (*Rattus norvegicus*)/ (*Homo sapiens*) Quiescina Q6 sulfidril oxidase 2 ou N
SIOPEN – International Society of Pediatric Oncology Europe Neuroblastoma Group
SOXN – Sulfidril oxidase derivada do Neuroblastoma
TMA – Tissue Microarray
TP53 – Gene supressor de tumor P53

TRKA – Gene receptor de neurofina A

TRKB – Gene receptor de neurofina B

TRX – Tiorredoxina

TS – Gene supressor de tumor

SUMÁRIO	
RESUMO	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 – FATORES CLÍNICOPATOLÓGICOS DO NEUROBLASTOMA.....	13
2.2 – MECANISMOS CELULARES RELACIONADOS À TUMORIGÊNESE.....	21
2.3 – BIOMARCADORES.....	24
3. OBJETIVOS	30
3.1 – OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4. MÉTODO	31
4.1 – CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	31
4.2 – CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	31
4.3 – REVISÃO DAS LÂMINAS E DOS BLOCOS.....	31
4.4 – CLASSIFICAÇÃO DOS CASOS.....	32
4.5 – PREPARO DAS AMOSTRAS EM TISSUE MICROARRAY (TMA).....	32
4.6 – REALIZAÇÃO DOS TESTES IMUNOISTOQUÍMICOS.....	34
4.7 – LEITURA DAS LÂMINAS DE IMUNOISTOQUÍMICA.....	35
4.8 – HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> COM FLUORESCÊNCIA – FISH.....	36
4.9 – VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	36
4.10 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5. RESULTADOS	40
5.1 – ANÁLISE DA POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	40
5.2 – ANÁLISE DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS E DOS BIOMARCADORES.....	40
5.3 – CORRELAÇÃO ENTRE OS BIOMARCADORES TESTADOS	44
5.4 – ANÁLISE DE SOBREVIDA E RECIDIVA <i>VERSUS</i> DOENÇA RESIDUAL.....	44
5.5 – ANÁLISE RESTRITA DOS PACIENTES QUE NÃO FORAM A ÓBITO.....	48
5.6 – ANÁLISE DA AMPLIFICAÇÃO DO <i>MYCN</i>	50
5.7 – FOTOMICROGRAFIAS DAS REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS.....	50
6. DISCUSSÃO	54
6.1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	54
6.2 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
7. CONCLUSÕES	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
9. ANEXOS	75
10. TABELA GERAL DE RESULTADOS	76
11. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA INSTITUIÇÃO	77

1. INTRODUÇÃO

Neuroblastoma é uma neoplasia embrionária do sistema nervoso simpático, sendo mais comumente diagnosticado em lactentes menores de um ano, além de ser o tumor sólido infantil extra-craniano mais comum na infância (1,2), somando de oito a 10% das neoplasias pediátricas (3). A cada ano, cerca de 650 novos casos são identificados nos Estados Unidos da América e sozinho responde, por no mínimo, 15% do total de mortes por câncer infantil.

A diversidade do comportamento do neuroblastoma, por vezes muito agressivo, sugere que a transformação maligna destas células deve-se, em parte, a uma falha da resposta a sinalização que regula a diferenciação e a proliferação celular. Outras vezes, o neuroblastoma pode apresentar uma taxa relativamente alta de diferenciação benigna com regressão espontânea, sendo que este fenômeno pode refletir uma exacerbação na ativação dos programas de diferenciação celular e das cascatas de apoptose. Este processo de maturação e diferenciação benigna, tão bem documentado nos neuroblastomas, está, no caso dessa neoplasia, intimamente relacionado com a diferenciação e maturação de sua matriz extracelular, a qual passa de um neurópilo pouco diferenciado em lesões inicialmente imaturas e de comportamento agressivo para uma matriz extracelular rica em células de Schwann bem diferenciadas nas lesões de comportamento benigno(3).

A despeito disso, de maior interesse ainda, é o raro paciente que mesmo na presença de um perfil clinicopatológico de bom prognóstico (idade inferior a 18 meses, lesão intra-abdominal e ausência de infiltração de medula óssea, com tumor diferenciado, classificação de Shimada favorável, matriz extracelular rica em células de Schwann bem diferenciadas e sem amplificação do *n-myc* mielocytosis viral related oncogene, neuroblastoma - *MYCN*), tem progressão agressiva, com recidivas precoces e evolução clínica desfavorável. A identificação desses pacientes no momento do seu diagnóstico pode facilitar a instituição de terapêuticas mais agressivas, mesmo na presença de fatores de bom prognóstico

que não a indiquem , melhorando as suas chances de sobrevida (1, 4, 5).

A presença de altos níveis de proteínas proliferativas (tais como o Ki67) ou de resistência a apoptose (como o Bcl2) e a inibição de proteínas pró-apoptóticas (como o PTEN, o Bax e as caspases) explicaria o comportamento agressivo destes tumores (3,6) bem como sua resistência à quimioterapia (7). Já é conhecido que os níveis de expressão de moléculas envolvidas na regulação de apoptose e na proliferação celular como PTEN, Bcl2, caspases, Bax, Ki67, apresentam valor prognóstico em pacientes com neuroblastomas (8,9).

O tratamento apropriado e o prognóstico deste tipo de tumor são dependentes de fatores clínicos como a idade (sendo mais favorável quando os pacientes têm menos que 18 meses); o local da lesão ao diagnóstico (localização unicamente abdominal no momento do diagnóstico determina melhor prognóstico) e o estadio tumoral (envolvimento metastático da medula óssea determina pior prognóstico) e, também, de fatores biológicos tais como a diferenciação tumoral (indiferenciados ou pouco diferenciados são de pior prognóstico); a classificação histopatológica de Shimada (os de histologia favorável são de melhor prognóstico), o estado do estroma tumoral (aqueles tumores ricos em estroma com células de Schwann diferenciadas são de melhor prognóstico) e a amplificação do *MYCN* (que quando presente determina pior prognóstico) (1,2,10).

Em resumo, a busca por outros biomarcadores que melhor possam prever o comportamento biológico incerto do neuroblastoma é constante, pois sua descoberta poderia facilitar a instituição precoce de terapêuticas mais adequadas, aumentando assim a sobrevida tão reservada deste tipo de neoplasia. Sendo assim, a hipótese deste estudo se baseia no fato de que os níveis elevados de expressão da Quiescina sulfidril oxidase 1 (QSOX1) em neuroblastomas podem ser representativos de bom prognóstico, definindo assim a QSOX1 como mais um biomarcador prognóstico para essa neoplasia, podendo também discriminar melhor os seus grupos de risco. A QSOX1 é uma proteína que desencadeia processos como a maturação de matriz extracelular e a indução de apoptose ambos, processos envolvidos com diferenciação e a maturação dessa lesão e

consequentemente com seu comportamento mais benigno (6,7).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FATORES CLINICOPATOLÓGICOS DO NEUROBLASTOMA.

O diagnóstico do neuroblastoma pode ser feito via microscopia convencional sendo comum seu diagnóstico diferencial com outros tumores infantis de “pequenas células redondas e azuis” (11). São tumores originários do tecido nervoso simpático e sua histologia pode ser composta por células primitivas, neurônios maduros e células ganglionares em uma mesma massa tumoral (12, 13, 14).

Novas variáveis clínicas e patológicas têm sido amplamente estudadas em crianças portadoras de neuroblastoma. Os parâmetros clinicopatológicos são relevantes por terem valor prognóstico decisivo no momento do diagnóstico deste tipo de tumor. Idade do paciente e extensão da doença são as principais variáveis no estadiamento deste tumor, a fim de estabelecer tratamento adequado. Contudo, pela diversidade do comportamento agressivo desse tumor, outros fatores prognósticos devem ser observados, os quais neste estudo foram tratados como variáveis clinicopatológicas e correlacionadas aos biomarcadores estudados nesta pesquisa.

2.1.2 Localização da lesão.

A massa tumoral pode desenvolver-se em qualquer nível ao longo da via neural simpática (15), com a maioria dos tumores primários ocorrendo na região intra-abdominal (65%). Grande parte desses casos se apresenta como massa abdominal assintomática ao diagnóstico e as metástases podem estar presentes em 75% dos casos (12). A localização na região retroperitoneal e, particularmente nas adrenais, tem pior prognóstico, enquanto que os mediastinais têm melhor sobrevida (16).

2.1.3. Idade da criança.

É importante salientar que a idade do paciente ao diagnóstico é inversamente relacionada à sobrevida. Crianças com idade inferior a um ano no momento do diagnóstico apresentam maior sobrevida, independentemente do estadió clínico (1). Dados mostram que quando diagnosticadas, 36% das crianças com neuroblastoma estão com idade abaixo de um ano, 75% abaixo de quatro anos e 90% encontram-se abaixo dos dez anos. A sobrevida livre de doença para os pacientes abaixo de 1 ano é em torno de 82%, de um a dois anos cai para 32% e acima de vinte anos não é maior que 10% (12).

2.1.4. Alterações genéticas e amplificação do *MYCN*.

O conteúdo de DNA (ácido desoxirribonucléico) nos permite discriminar dois tipos principais de neuroblastomas: os diplóides (cerca de 45% de todos os tumores) e os triplóides (55% restantes). A maior parte dos casos de regressão e amadurecimento espontâneo concentra-se no grupo triplóide. Todavia, a vantagem conferida pela triploidia concentra-se fundamentalmente nas crianças menores de um ano e estádios avançados da moléstia, perdendo sua relevância naquelas de idade superior a dois anos (12,13).

As deleções do braço curto do cromossomo 1 (1p) e os ganhos do braço longo do cromossomo 17 (17q) são algumas das anomalias citogenéticas mais comuns nos neuroblastomas, encontradas em aproximadamente 35% dos casos, sendo, com maior frequência, verificadas em crianças com formas avançadas da doença. Entretanto, seu valor como variável independente de prognóstico é controverso, basicamente por sua habitual associação com *MYCN* (*myelocytosis viral related oncogene*) amplificado. Este último relacionado a tumores mais agressivos e de pior prognóstico (13,17). A translocação t(11;22) (q24;q12) também foi demonstrada em neuroblastomas, além de serem encontradas em tumores de Ewing e rabiomiossarcomas (11).

A amplificação do *MYCN* – oncogene cuja sequência é normalmente localizada na porção distal do braço curto do cromossomo 2 (2p24) – é a melhor alteração genética para descrever o neuroblastoma. A amplificação do oncogene

MYCN, que ocorre em 20% de todos os neuroblastomas associados a fenótipos de alto risco, correlaciona-se a estadios avançados do tumor (31% dos estadios III e IV, contra apenas 4% dos estadios I e II), significando rápida progressão tumoral e péssimo prognóstico, mesmo quando verificada em crianças de tenra idade e estadios iniciais (11,17,18).

Este proto-oncogene é um membro da família *MYC* cuja transcrição de vários fatores parece ser responsável por funções vitais como coordenar o crescimento, o metabolismo e a divisão celular (17).

Várias outras alterações genéticas tem sido implicadas na gênese do neuroblastoma como as descritas no quadro 1 (18).

Quadro 1. Regiões cromossômicas e genes relacionados ou supostamente envolvidos na tumorigênese do neuroblastoma.

Locus cromossômico	Nome do Gene	Tipo do Gene/Função
1p36.2-p36.3		Supressor de tumor
1p13	NGF	Neurotrofina; ligante para NTRK 1
1q23-q31	NTRK1 (TRK-A)	Receptor tirosina kinase
2p12-13	MAD	Pode regular o <i>MYCN</i>
2p24.1	<i>MYCN</i>	Proto-oncogene
2p24	DDX1	RNA helicase/oncogene
3p		Supressor de tumor
4p		Supressor de tumor
7q21	PGY1 (MDR1)	Quimiorresistência
9q22.1	NTRK2 (TRK-B)	Receptor de tirosina kinase
11p13	CD44	Integrina/Supressão de metástase
11p13	BDNF	Neurotrofina; ligante para o NTRK 1
11q23		Supressor de tumor
12p13	NTF3 (NT-3)	Neurotrofina; ligante para o NTRK 3
14q23	MAX	Regulação do <i>MYCN</i>
14q23-qter		Supressor de tumor
15q24-q25	NTRK3 (TRK-C)	Receptor tirosina kinase
16p13.1	MRP	Quimiorresistência
17q22	NME1	Nucleosídeo kinase/Supressão de metástase
17q23-qter		Oncogene
18q21.1	DCC	Supressor de tumor
18q21.3	<i>Bcl2</i>	Supressão de apoptose
19	NTF4 (NT-4)	Neurotrofina; ligante para o NTRK 2

*REGIÕES DE PERDA ALÉLICA SÃO LOCAIS ONDE SE PRESUME CONTER GENES SUPRESSORES DE TUMOR. (18)

Ao longo da última década, a determinação da amplificação do *MYCN* em neoplasias tem sido feita por todos os grupos cooperativos através da técnica de FISH (fluorescence in situ hybridization) (19).

2.1. 5. Classificação morfológica do neuroblastoma.

Em 1988, um esforço cooperativo internacional foi iniciado para estabelecer os critérios de diagnóstico, estadiamento e prognóstico para o neuroblastoma. Grupos internacionais de estudo e tratamento de neoplasias se uniram para estabelecer os critérios para determinar os Grupos de Risco Internacional de Neuroblastoma (INRG). O Comitê Internacional de Patologia do Neuroblastoma (INPC) estabeleceu uma padronização de terminologia e de critérios morfológicos e um consenso para uma classificação que tivesse significado prognóstico, relevância biológica e reprodutibilidade (20). O INPC adotou, em 1994, algumas modificações, do esquema proposto por Shimada em 1984 (21,22) (quadro 2). Este esquema é baseado principalmente nas alterações morfológicas associadas com a sequência de maturação da matriz extracelular neoplásica e da diferenciação de suas células de Schwann (20).

Quadro 2. Avaliação prognóstica de tumores neuroblásticos de acordo com a classificação patológica.

Classificação Internacional	Patológica do	Classificação de Shimada	Grupo Prognóstico
Neuroblastoma	Pobre em estroma	Pobre em estroma	
Favorável		Favorável	favorável
Menor de 1,5 anos	Pouco diferenciado ou em diferenciação e baixo MKI tumoral		
Entre 1,5 e 5 anos	Em diferenciação e baixo MKI tumoral		
Desfavorável		Desfavorável	desfavorável
Menor que 1,5 anos	Tumor indiferenciado e/ou alto MKI tumoral		
Entre 1,5 e 5 anos	Tumor indiferenciado ou pouco diferenciado e MKI tumoral alto		
Maiores que 5 anos	Todos os tumores		
Ganglioneuroblastomas	Rico em estroma	Rico em estroma	
Em maturação ou maduro	Estroma de células de Shwann dominante	Favorável	favorável
Tipo nodular	Estroma de células de Shwann rico nas áreas nodulares	Desfavorável	desfavorável

Legenda: MKI= índice mitose-cariorexix ou cariorrexia

Fonte: Shimada H et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System). Cancer. 1999 86(2):364-372 (22).

O INPC também avaliou outras características morfológicas e elaborou um sistema de classificação prognóstica, descrito por Joshi, o qual é válido atualmente. Todavia, tem sido mantida também a nomenclatura tradicional de Shimada por ser amplamente conhecida e utilizada na prática clínica (Quadro 3) (13,20,21,22,23).

Quadro 3. Comparação prognóstica entre os grupos de acordo com a classificação histopatológica de Shimada e de Joshi.

Prognóstico	Fatores Histopatológicos/Idade
Prognóstico Favorável	Fatores Histopatológicos/ idade
Shimada	Estroma rico, todas as idades, sem nódulo presente Estroma pobre, idade 1,5 - 5 anos, diferenciado, MKIa <100 Estroma pobre, idade < 1,5 anos, MKI<200
Joshi	Grau 1b , todas as idades, grau 2 c , ≤ 1 ano
Desfavorável	
Shimada	Estroma rico, todas as idades, nódulo presente Estroma pobre, idade > 5 anos Estroma pobre, idade 1,5 – 5 anos, indiferenciado Estroma pobre, idade 1,5 – 5 anos, diferenciado, MKI >100 Estroma pobre, idade <1,5 anos, MKI >200
Joshi	Grau 2, idade > 1 ano, grau 3d , todas as idade

MKIa , Índice de cariorrexia (número de mitoses e cariorrexis por 5000 células)

Grau 1b = Baixo índice mitótico (≤ 10/10 high-power fields) e presença de calcificação.

grau 2 c = Baixo índice mitótico ou presença de calcificação.

grau 3d = Ausência de baixo índice mitótico e calcificação.

Fonte: Brodeur GM, Castleberry RP. In: Neuroblastoma. Pizzo PA, Poplack DG, editores. Principle and Practice of Pediatric Oncology. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott, 1993;746 (13).

A classificação dos neuroblastomas segundo a sua diferenciação os divide em dois grupos bem definidos: (1) os indiferenciados/pouco diferenciados e; (2) os em diferenciação/bem diferenciados/ganglioneuroblastomas.

Os tumores indiferenciados ou pouco diferenciados tem neuroblastos pouco diferenciados, poucas células ganglionares e matriz extracelular (estroma) representada por neurópilo pouco diferenciado e pobre em células de Schwann diferenciadas. Além disso, esses tumores pouco diferenciados tem, geralmente, altos índice de mitose/cariorréxis (MKI) (13). O MKI é calculado pela contagem de células em mitose e em cariorréxis em 5000 células e é considerado baixo quando as contagens resultam em menos de 100 mitoses/cariorréxis, intermediários

quando este índice está entre 100 e 200 mitoses/cariorréxis e alto quando está acima de 200 destes eventos em 5000 células. Esses tumores pouco diferenciados também têm altos índices mitóticos (MI), sendo que este índice é calculado contando-se figuras de mitoses em 10 campos de grande aumento (CGA = 400x) e é considerado alto quando resulta em mais de 10 mitoses em 10 CGA.(13)

Contudo, os tumores em diferenciação e bem diferenciados apresentam células ganglionares quase maduras ou maduras e estroma mais fibrilar e rico em células de Schwann muitas vezes bem diferenciadas, culminando a sua diferenciação com os ganglioneuroblastomas que representam a forma mais madura do neuroblastoma, de comportamento benigno e muitas vezes espontaneamente regressivo. Além disso, esses tumores tem baixos MKI e MI (22).

A maturação do neuroblastoma já é um processo bem conhecido e pode acontecer em crianças menores com fatores prognósticos clinicopatológicos favoráveis. Sabe-se que esta maturação é amplamente dependente do remodelamento da matriz extracelular, isto é, do estroma do neuroblastomas, que evolui de neurópilo pouco diferenciado para um estroma rico em células de Schwann bem diferenciadas.(18)

2.1.6. Estadiamento clínico do neuroblastoma.

Historicamente, os fatores de risco de pior prognóstico em pacientes com neuroblastoma incluem metástase óssea, com mais que 10% de células tumorais na medula óssea, *MYCN* amplificado, nível de ferritina sérica maior que 142 ng/ml, desidrogenase láctica (LDH) maior que 500U/L, histologia desfavorável e idade maior que 1 ano no momento do diagnóstico (24). A William Guy Forbeck Research Foundation promoveu uma conferência mundial cujo principal objetivo foi a publicação do Sistema Internacional de Estadiamento do Neuroblastoma (INSS – International Neuroblastoma Staging System) (Quadro 4) (25).

Quadro 4. Estadiamento segundo INSS (International Neuroblastoma Staging System).

Estádios	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.
IIA	Tumor unilateral com remoção macroscopicamente incompleta; linfonodos ipsi e contralaterais identificados livres de comprometimento neoplásico.
IIB	Tumor unilateral com remoção macroscopicamente completa ou incompleta; linfonodos ipsilaterais comprometidos; linfonodos contralaterais identificados livres de comprometimento neoplásico.
III	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.
IV	Disseminação do tumor a linfonodos distantes, ossos, medula óssea, fígado ou outros órgãos (exceto como definido em IV S)
IVS	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). Para crianças menores que 1 ano.

Fonte: (www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/neuroblastoma/HealthProfessional)

Clinicamente, mais de 50% dos pacientes são diagnosticados com metástases (estadio IV pelo INPC) e apesar de utilizarem quimioterapias intensivas, a maioria morre em torno de 3 anos após o diagnóstico. A maior parte dos pacientes com neuroblastoma estadio IV tem dois ou mais dos achados prognósticos desfavoráveis e o tempo de sobrevida livre de doença é menor que 20% (24). A diversidade de fatores clínicos, biológicos e combinações de variáveis prognósticas envolvidas com o neuroblastoma tem sido utilizadas há muitas décadas para distribuição e estratificação de grupos de risco e para atribuir o tratamento adequado. Este tratamento é feito de maneira uniforme por todos os grupos cooperativos de tratamento de neuroblastoma, como o SIOPEN (International Society of Pediatric Oncology Europe Neuroblastoma Group), o COG (Children's Oncology Group) e o POG (Pediatric Oncology Group), há aproximadamente 20 anos. (Quadro 5).

Quadro 5 . Estadiamento de risco do neuroblastoma – baixo, intermediário e alto – do Children's Oncology Group .

Estádio (INSS)	Idade (anos)	MYCN (*)	Histologia (Shimada)	DNAi (**)	Grupos de Risco
I	0-21	Qualquer	Qualquer	Qualquer	BAIXO
IIA, IIB	<1	Qualquer	Qualquer	Qualquer	BAIXO
	≥1→21	Sem amplificação	Qualquer	-	BAIXO
	≥1→21	Amplificado	Favorável	-	BAIXO
	≥1→21	Amplificado	Desfavorável	-	ALTO
III	<1	Sem amplificação	Qualquer	Qualquer	ALTO
	<1	Amplificado	Qualquer	Qualquer	
	≥1→21	Sem amplificação	Favorável	-	ALTO
	≥1→21	Sem amplificação	Desfavorável	-	
	≥1→21	Amplificado	Qualquer	-	
IV	<1	Sem amplificação	Qualquer	Qualquer	ALTO
	<1	Amplificado	Qualquer	Qualquer	ALTO
	≥1→21	Qualquer	Qualquer	-	
IVS	<1	Sem amplificação	Favorável		BAIXO
	<1	Sem amplificação	Qualquer		ALTO
	<1	Sem amplificação	Desfavorável		
	<1	Amplificado	Qualquer		

Legenda:

(*) MYNC amplificado → número de cópias >1

(**) DNAi <1 (hipodiploidia) considerado como favorável

Fonte: (www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/neuroblastoma/HealthProfessional)

Crianças com tumores ressecáveis ao diagnóstico e sem metástases são em torno de 20-30% dos casos (INSS estadios I e II). O acompanhamento mostra boa evolução com taxa de sobrevida de 80 a 100%. Pacientes INSS estadio I tratados com cirurgia tiveram sobrevida livre de doença em 100% dos casos. Porém no estadio II, a presença de fatores como localização extra-abdominal de tumores ao diagnóstico, ruptura de tumor durante a cirurgia, envolvimento de linfonodo regional, histologia desfavorável ou amplificação do *MYCN*, tem sido considerado como maus indicadores de sobrevida (26).

Apenas 4% dos pacientes com neuroblastoma em estadio precoce (estadios I e II) têm amplificação *MYCN*. Aqueles pacientes sem amplificação do *MYCN* têm uma excelente taxa de sobrevida em três anos (90% de probabilidade de sobrevida) (27).

2.2. MECANISMOS CELULARES RELACIONADOS À TUMORIGÊNESE

As mutações carcinogênicas costumam afetar os genes que controlam o nascimento (ciclo celular) ou a morte (apoptose) das células. Duas grandes categorias (de genes) podem ser distinguidas: oncogenes e os genes supressores de tumor (28,29).

A carcinogênese é um processo que pode ser dividido em três fases: iniciação, promoção e progressão, e pode durar de um a 30 anos. Durante esse período, ocorre o acúmulo de mutações no genoma celular, especialmente em genes que garantem a ordem dos eventos do ciclo celular e da mitose, ou executam reparo de eventuais erros na replicação do DNA ou ainda, que promovem e mantêm o estado de diferenciação celular (18,30).

Oncogenes são genes cuja atividade normal é promover a proliferação celular e os genes supressores de tumor são responsáveis pelos processos de apoptose celular. Mutações de ganho ou perda de função em células tumorais criam formas impropriamente ativas desses genes (29).

Genes supressores de tumor são aqueles cujos produtos inibem os eventos que direcionam para o câncer. Alguns produtos de genes supressores de tumor impedem a progressão do ciclo celular, outros encaminham as células para a apoptose e um último grupo de produtos mantêm o genoma estável e as taxas de mutação baixas ao garantirem a precisão da replicação, da reparação e da segregação do DNA da célula. Para que o comportamento de uma célula mude, ambos os alelos de um gene supressor de tumor precisam ser inativados (29).

O neuroblastoma é uma neoplasia heterogênea com biologia complexa e, evidências sugerem que existam três tipos distintos de neuroblastomas como exemplificado na figura 1 (18,30). O evento inicial da tumorigênese parece ocorrer no tecido neuroblástico indiferenciado. A diferenciação celular determina a expressão de um receptor de neurotrofina, o TRKA (receptor de neurotrofina A) ou o TRKB (receptor de neurotrofina B). Aproximadamente um terço dos tumores são caracterizados por significativa expressão do TRKA. Estes tumores chamados

neuroblastomas tipo 1, parecem ter um defeito na divisão mitótica, pois apresentam geralmente triploidia. Pacientes com tumores do tipo 1 geralmente são curados apenas com cirurgia e apresentam um excelente prognóstico (18). Por outro lado, tumores que expressam TRKB são caracterizados por instabilidade genômica. Ocorrem rearranjos cromossômicos no 17q (braço longo do cromossomo 17) em sua maioria. Esses tumores possuem ainda perdas no braço longo do cromossomo 11 e/ou 14 e raramente têm perda do 1p (braço curto do cromossomo 1), ou amplificação do *MYCN* e são chamados de neuroblastoma do tipo 2. Todavia, tumores onde ocorre a perda do 1p, apresentam amplificação do *MYCN* e desenvolvem um comportamento clínico altamente maligno, sendo chamados de neuroblastomas do tipo 3 (18, 31). A probabilidade de sobrevivência dos pacientes com o tipo 3 é menor que 25% e valores intermediários são encontrados para o tipo 2. Definição mais precisa das trocas moleculares que ocorrem nos neuroblastomas podem definir terapias específicas e aumentar as possibilidades de cura . Ver figura 1(18).

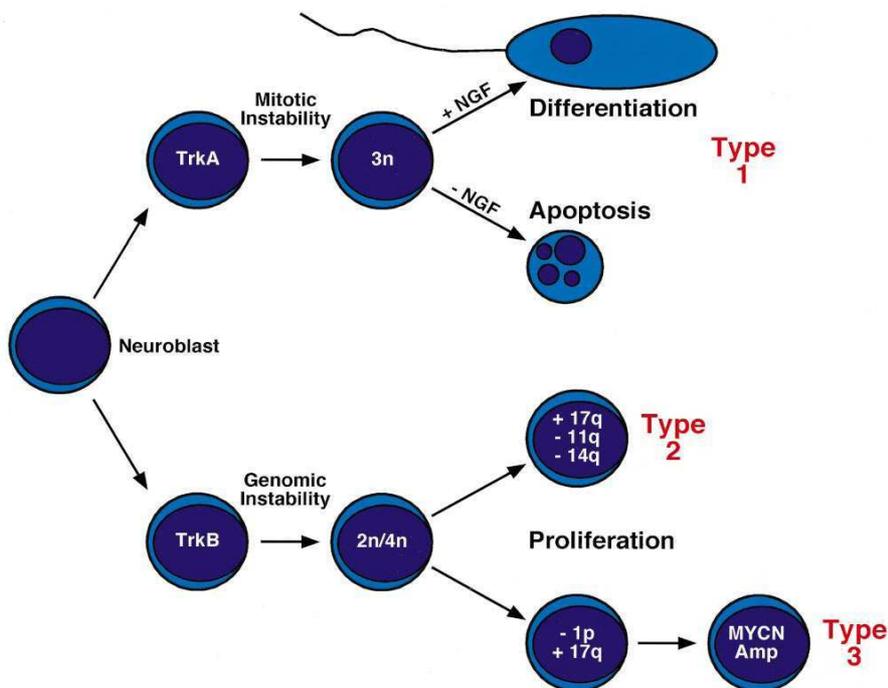


Figura 1 – Modelo hipotético da origem genética do neuroblastoma.
Fonte: Sociedade Americana de Oncologia Clínica, 1999 (30)

A proliferação celular anormal aparece como fator precursor na origem de tumores malignos (32,33). Marcadores de proliferação celular são úteis na graduação de agressividade das lesões malignas. Os marcadores de proliferação mais estudados são as figuras de mitose (visualização e contagem do número de mitoses propriamente ditas) em colorações de rotina e a expressão, por imunohistoquímica, de moléculas que atuam em uma ou mais fases do ciclo celular. Anticorpos monoclonais têm sido empregados para estudar proteínas no ciclo celular e dentre eles, o anticorpo anti-PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA – Proliferating cell nuclear antigen) e o anticorpo para o antígeno Ki67 (32, 34, 35,36).

A morte celular programada ou apoptose é um processo fisiológico de morte celular pelos quais as células que perderam suas funções ou apresentaram defeitos são eliminadas do organismo (30). Foi descrita pela primeira vez por Kerr *et al.* em 1972, sendo essencial para a manutenção do desenvolvimento embrionário e para homeostase nos organismos adultos (37, 38,39). Ganhos ou perdas gênicas em genes que codificam proteínas das vias de apoptose conduzem à perturbação na homeostase celular, o qual pode ser o evento patológico primário resultando no processo de tumorigênese (30, 37).

Os sinais que levam à morte celular podem ser de natureza extracelular ou intracelular, esta sinalização leva à ativação das vias controladas pelas caspases, cuja ativação promove a liberação de fatores pró-apoptóticos pela mitocôndria, ativando outras caspases ditas executoras, conduzindo à alterações celulares características de apoptose (33, 37). A liberação do citocromo C no citoplasma é regulada por membros da família Bcl2, como por exemplo as proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bid e Bim) e as proteínas antiapoptóticas (Bcl2, MCL1, Bclxl ou Bcl2-like 1, Bcl2W). O produto do gene supressor de tumor *TP53* atua como um regulador das vias de apoptose por controlar a transcrição de Bax. Esta atividade depende da fosforilação da proteína p53 por quinases ativadas após o reconhecimento de danos extensos no DNA (39, 40, 41).

2.3. BIOMARCADORES ESTUDADOS

2.3.1. QSOX1.

A QSOX é uma tiol-oxirredutase dependente da FAD (42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51,52). A proteína QSOX1 pertence a uma nova classe de quiescina/sulfidril oxidases FAD – dependentes (flavina adenina nucleotídeo – dependente) que catalisam a formação de ligações de tióis a dissulfetos através da redução de oxigênio, com concomitante formação de peróxido de hidrogênio, portanto têm ação contrária às enzimas antioxidantes (figura 2).

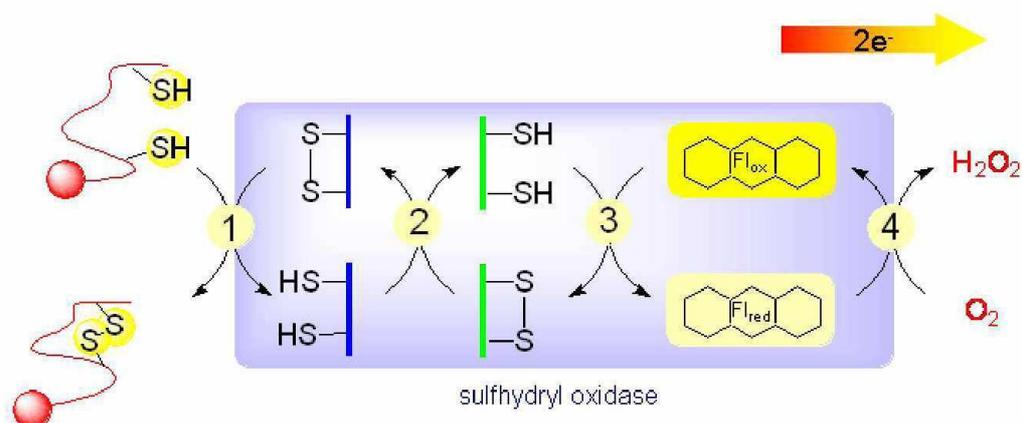


Figura 2. As principais fases da catálise da QSOX. Reoxidação da enzima e geração de peróxido de hidrogênio. Fonte: Thorpe C, Coppock DL (51)

As proteínas QSOX contêm dois domínios: um domínio N-terminal tiorredoxina (TRX) e um domínio próximo à região carboxi-terminal homóloga à ERV1 (figura 3) (49,51).

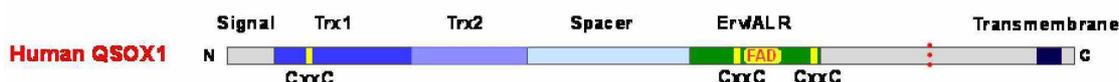


Figura 3 – Gene da QSOX1 humana. Enzimas QSOX tem 1 ou 2 domínios tiorredoxina. Fonte: Thorpe C, Coppock DL (51)

Os arranjos das proteínas QSOX, formadas pela fusão dos domínios TRX e ERV1, foram inicialmente chamados como Q6 (quiescina 6 sulfidril oxidase) e SOXN (sulfidril

oxidase derivada do neuroblastoma), Atualmente são designadas QSOX1 (gene *hQSOX1*) e QSOX2 ou QSOXN (gene *hQSOX2* ou *hQSOXN*), respectivamente (42,49,53). O gene *hQSOX1* apresenta-se com aumento de sua expressão em placenta, estômago e pulmão, enquanto que o *hQSOX2* apresenta aumento de sua expressão em pâncreas, cérebro, rins e coração (45).

Em diferentes espécies existem duas variantes da proteína QSOX1, a QSOX1_L (longa) e a QSOX1_S (curta), também denominadas por alguns autores como QSOX1a e QSOX1b, sendo que as duas partilham as mesmas identidades estruturais (44,45).

A presença da QSOX1 foi demonstrada no ambiente extracelular, como fluido seminal humano (52), clara do ovo da galinha (53, 54), sobrenadante de cultivo de fibroblastos quiescentes (54), sendo que a sua localização extracelular sugere que esta proteína possa estar envolvida na remodelação dos componentes da matriz extracelular, principalmente pelo fato de que a formação de pontes de dissulfeto são requeridas para o apropriado dobramento, função e estabilidades de diversas proteínas (55,56). A QSOX1, também é encontrada no retículo endoplasmático, no complexo de Golgi, nos grânulos secretórios, nas mitocôndrias, entre outras organelas (43,45). A QSOX2 ou QSOXN (quiescina sulfidril oxidase 2 ou N) está associada a membrana plasmática e ao núcleo (44). Estudos com anti-QSOX1 policlonal em cérebro de ratos revelaram a presença da proteína QSOX1 em todas as áreas do cérebro com níveis variados (44)

A família de proteínas QSOX tem sido descrita como proteínas que participam na elaboração da matriz extracelular, maturação de poxvírus, na regeneração de tecidos, sensibilização de células de neuroblastoma a estímulos apoptóticos e como fatores de regulação de crescimento e adesão celulares (49, 56,57).

A expressão do gene *hQSOX1* é baixa em fibroblastos humanos em proliferação, porém sua expressão é elevada quando os mesmos fibroblastos entram em quiescência. Foi também demonstrado, *in vivo*, uma relação entre altos níveis de mRNA (ácido ribonucléico mensageiro) do *hQSOX1* com a quiescência de células de pulmão humano (44). A maior expressão gênica sugere que esta proteína esteja envolvida no processo normal de quiescência celular reversível e, portanto, a inibição desta poderia levar a processos patológicos como câncer (56).

As funções precisas da QSOX1 humana vêm despertando interesses em vários estudos. Sabe-se que a formação de pontes de dissulfeto, função exercida pela QSOX1, é requerida para o arranjo trimérico dos colágenos (56), além de estar relacionada à manutenção da integridade da matriz extracelular (58), desempenhando um papel importante no desenvolvimento fetal. Outra função biológica da QSOX1 seria o seu envolvimento no estresse oxidativo induzindo a apoptose de determinados tipos de células e a sua relação com o controle negativo do ciclo celular (44).

A sulfidril oxidase derivada do neuroblastoma (QSOX2 ou QSOXN) apresenta função pró-apoptótica em células de neuroblastoma humano (45), regulando a sensibilização destas células à indução de morte celular pelo interferon gama (57). Em células de neuroblastoma, programas apoptóticos podem ser ativados por citocinas ou drogas citostáticas. Disfunções no processo de morte celular conferem resistência à terapêutica medicamentosa e diminuem as chances de uma boa resposta terapêutica. Expressão desregulada do gene *MYCN* é crítica na determinação da progressão do neuroblastoma, e uma das funções pleiotrópicas da proteína *MYCN* é a sensibilização celular à apoptose induzidas por citocina e drogas. Apesar de terem sido identificados cinco genes relacionando a sensibilização à morte celular por interferon gama, o gene mais eficiente entre eles foi o da sulfidril oxidase derivada do neuroblastoma (*hQSOX2* ou *hQSOXN*) (57).

2.3.2. PTEN.

O PTEN (phosphatase and tension homolog n chromossome 10) foi descoberto em 1997 como um gene supressor de tumores e está localizado no cromossomo 10q23. Age convertendo PIP3 para PIP2, desta forma gerando a inativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI-3k). A inativação do PTEN resulta no acúmulo do PIP3, cuja função é ativar a PI-3k, promovendo a proliferação celular e inibindo a via apoptótica, alterando assim a sobrevivência celular e levando à tumorigênese (59,60,61,62). O PTEN pode estar alterado por mutações somáticas em vários tipos de carcinomas. Foi utilizado como marcador tumoral em estudos com gliomas e, comparado a outras variáveis clínicas, mostrou-se

relacionado à um melhor estadió clínico (63). Há uma forte evidência de que a ativação da via de sinalização PTEN/PI-3Kt é importante para o desenvolvimento da aberrante proliferação vascular em glioblastomas (64, 65). Alguns autores encontraram um decréscimo da expressão da proteína PTEN nos neuroblastomas mais indiferenciados e mais agressivos clinicamente, quando comparados aos bem diferenciados e menos agressivos, sugerindo que o PTEN tem baixa expressão em tumores em estadió avançado. Esses achados demonstram o papel do PTEN no mecanismo da progressão de tumores malignos como no caso do neuroblastoma (4).

2.3.3. Ki67.

O Ki67 é uma proteína não histona, identificada pelo anticorpo monoclonal anti-Ki67. É uma proteína nuclear humana encontrada durante o ciclo celular, sendo largamente empregada como marcador de proliferação celular. Não é expressa em células na fase G0, mas pode ser detectada nas fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose). Está associada com a proliferação celular, estando a fração de células tumorais positivas ao Ki67 relacionada à evolução clínica da doença (66).

Métodos imunoistoquímicos que pesquisam antígenos associados à proliferação celular tais como o Ki67 e PCNA (Antígeno Nuclear da Célula em Proliferação) são muito utilizados para avaliar a agressividade de um tumor, através da quantificação de sua atividade proliferativa (67, 68).

O valor prognóstico do indicador Ki67 pode ser de particular importância naqueles tipos de câncer cujo curso clínico é difícil de prever somente pelo critério histológico. Sendo assim, o Ki67 é considerado o melhor marcador de proliferação atualmente, com uma forte correlação entre este e o prognóstico de diversos tumores (67, 68, 69).

2.3.4. Caspase - 8.

A indução do processo apoptótico clássico dá-se pela ativação de cisteínoproteases denominadas caspases (70). A família das caspases é considerada a principal via de

regulação de morte celular programada. São sintetizadas como pró-enzimas que necessitam de um processo proteolítico para serem ativadas (71) e têm a capacidade de clivar substratos que possuam resíduos de aspartato levando à fragmentação nuclear e à externalização de fosfolipídios de membrana, os quais são responsáveis pela sinalização para a fagocitose (72,73). São conhecidas 14 caspases humanas, sendo que seis (caspases -3, -6, -7, -8, -9, -10) participam da apoptose (30, 70,73).

A caspase 8 (caspase 8 apoptoses-related) ativa proteínas pró-apoptóticas que promovem a formação de poros na membrana externa mitocondrial. Isso ativa a liberação do citocromo C no citoplasma, o qual, associado à pro-caspase-9, forma o chamado apoptossomo (73). A saída de citocromo C é dependente de uma série de eventos elétricos e químicos na membrana mitocondrial. Estes eventos são modulados pela ação de proteínas indutoras de apoptose da família Bcl2 (Bcl2W, Bclxl, MCL1) e da família Bax (Bad, Bid e Bak), capazes de interagir com elementos estruturais da membrana externa das mitocôndrias (30, 70,73).

2.3.5. Bcl2 e Bax.

A família dos genes *Bcl2* e *Bax* (*B-cell CLL/lymphoma – 2* e *Bcl2-associated X protein* respectivamente) exercem papel importante na regulação da apoptose. O gene *Bcl2* foi primeiramente observado translocado em linfomas foliculares de células B. Essa translocação resulta na transferência do gene *Bcl2* da posição 18q21 para 14q32. Este gene translocado causa uma superexpressão de suas proteínas, podendo resultar na supressão da apoptose (71). As proteínas intracelulares que regulam diretamente o processo de ativação das caspases constituem a denominada família Bcl2. Os membros dessa família podem ser divididos em moléculas pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bclxl, BAD, BID, BIK, HRK, BIM e BOK) e antiapoptóticas (Bcl2, BCL-xL, BCL-w, BFL-1, BRSAG-1, MCL-1, A1, E1B19K, LMW5-HL e EBV BHRF1) (72, 73). Os membros da família Bcl2, como Bcl2 e Bclxl inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo C e são chamados de reguladores antiapoptóticos. A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como danos ao

DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. Entre as proteínas mais estudadas, desta família, estão a Bax (pró-apoptótica) e a Bcl2 (antiapoptótica) cuja superexpressão está relacionada a adenomas e carcinomas colorretais (72). O gene *Bax* humano sintetiza uma proteína que se une ao Bcl2, a proteína Bax α , e a sua superexpressão permite a morte das células (71,72).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL.

Avaliar a expressão imunoistoquímica da Quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) em amostras parafinadas de neuroblastoma humano correlacionando-a com fatores prognósticos clinicopatológicos clássicos, evolução clínica e com biomarcadores de progressão tumoral.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1 – Correlacionar a expressão imunoistoquímica da Quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) em amostras parafinadas de neuroblastoma humano com os fatores prognósticos clinicopatológicos clássicos (idade dos pacientes, localização do tumor, grau de diferenciação tumoral, classificação de Shimada, padrão estromal do tumor, amplificação do *MYCN*, comprometimento de medula óssea) e com a evolução clínica dos pacientes (se em óbito ou se vivo com ou sem recidivas).

2 – Correlacionar à expressão imunoistoquímica dos biomarcadores estudados (PTEN, Ki67, Bax, Bcl2 e caspase-8) com os fatores prognósticos clássicos e com a evolução clínica dos pacientes.

3 – Correlacionar a expressão imunoistoquímica da Quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) com a expressão imunoistoquímica dos outros biomarcadores estudados ((PTEN, Ki67, Bax, Bcl2 e caspase-8).

4. MÉTODO

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Pequeno Príncipe (HIPP-PR) com número de registro 0518-07.

4.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.

Foram selecionados todos os pacientes, de ambos os sexos, com diagnóstico de neuroblastoma, tratados no Hospital Pequeno Príncipe, entre os anos de 1998 a 2004 (n=41). Os prontuários de todos os pacientes foram revisados, bem como suas lâminas histológicas em hematoxilina-eosina (HE) a fim de determinar os casos a serem incluídos neste estudo. Os casos destinados a este estudo foram compostos de amostras pré-tratamento dos tumores (biópsias ou produtos de ressecção tumoral) dos pacientes com diagnóstico de neuroblastoma, já fixadas em formol e emblocadas em parafina, cujos blocos parafinados foram separados para esta pesquisa.

4.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.

Amostras inadequadas para a realização de provas imunoistoquímicas e/ou que apresentavam artefatos tais como necrose, autólise e calcificação (entre outros), detectados no momento da revisão de lâminas, foram retiradas do estudo. Casos cujos prontuários não estavam completos ou eram inexistentes foram retiradas do estudo. Sendo assim, 23 casos cumpriram todos os critérios de seleção.

4.3. REVISÃO DAS LÂMINAS E DOS BLOCOS.

Durante a revisão das lâminas em HE as amostras mais representativas do tumor foram selecionadas e seus blocos foram separados do arquivo.

4.4. CLASSIFICAÇÃO DOS CASOS.

Os casos foram classificados da seguinte maneira:

- o sexo da criança, se feminino ou masculino;
- a faixa etária ao diagnóstico, se menor de 18 meses ou maior ou igual a 18 meses);
- a localização das lesões no momento do diagnóstico, se extra abdominal ou abdominal;
- o estado da medula óssea, se infiltrada pela neoplasia ou não;
- o grau de diferenciação histológica da neoplasia, se pouco diferenciada/indiferenciada ou se bem diferenciada/em diferenciação/ganglioneuroblastomas;
- quanto a evolução da doença, se em óbito ou vivos com ou sem recidiva/doença residual);
- quanto ao tipo de matriz extracelular da neoplasia, se rico ou pobre em estroma com células de Schwann;
- quanto a classificação de Shimada, se de histologia favorável ou desfavorável;
- e por último verificada a presença ou não da amplificação do *MYCN* em todos os casos.

4.5. PREPARO DAS AMOSTRAS EM TISSUE MICROARRAY (TMA).

As lâminas originais em HE, de cada um dos casos do estudo, foram revisadas e durante a revisão foram marcadas duas áreas representativas do tumor, livres de artefatos. Estas áreas foram amostradas dos blocos originais e preparadas em tissue microarrays (TMA) (74,75,76,77).

Este método se inicia a partir da separação de múltiplas amostras e a junção de todos em um bloco comum. A técnica completa, desde o início até a realização dos cortes histológicos, consistiu de alguns passos: (a) através do sistema de espelho, a lâmina com duas áreas previamente escolhidas foi utilizada para localização das regiões mais

representativas do tumor no bloco-doador; (b) para que as amostras fossem posteriormente localizadas no bloco-receptor foi confeccionado um mapa em plano cartesiano, sendo que as linhas identificadas com números e as colunas com letras; (c) uma vez montado o mapa, os blocos-doadores foram organizados para montagem dos blocos-receptores; (d) os blocos receptores foram montados com amostras de tumor retiradas dos blocos doadores com pinça tipo punch de pele de 3mm.; (e) após a confecção dos blocos-receptores (TMA), a partir deles foram confeccionadas lâminas histológicas para a realização das provas imunoistoquímicas (vide figuras 4,5 e 6).

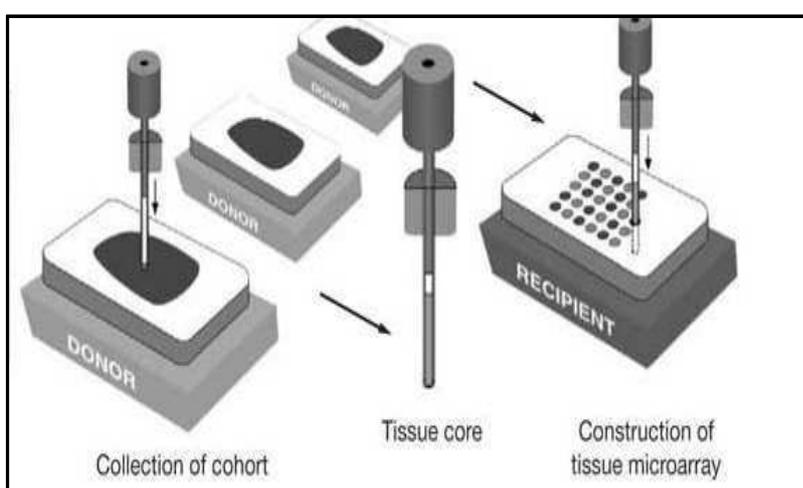


Figura 4 – Esquema da montagem de um tissue microarray. Os blocos doadores (donor) organizados, a pinça de punch sobre a área da amostra a ser retirada e a mesma contendo o corte de tecido (seta), além da construção do bloco receptor (recipient) com suas linhas e colunas previamente identificadas por um mapa em plano cartesiano. Fonte: Adaptado pelo autora.

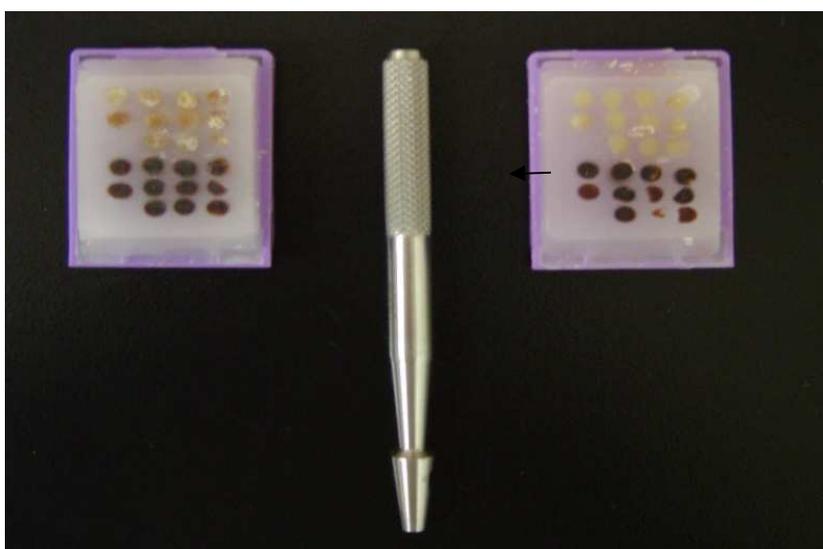


Figura 5 - Fotografia de dois blocos de tissue microarray e da pinça de punch número 3 utilizada para a sua construção. Fonte: Autora.

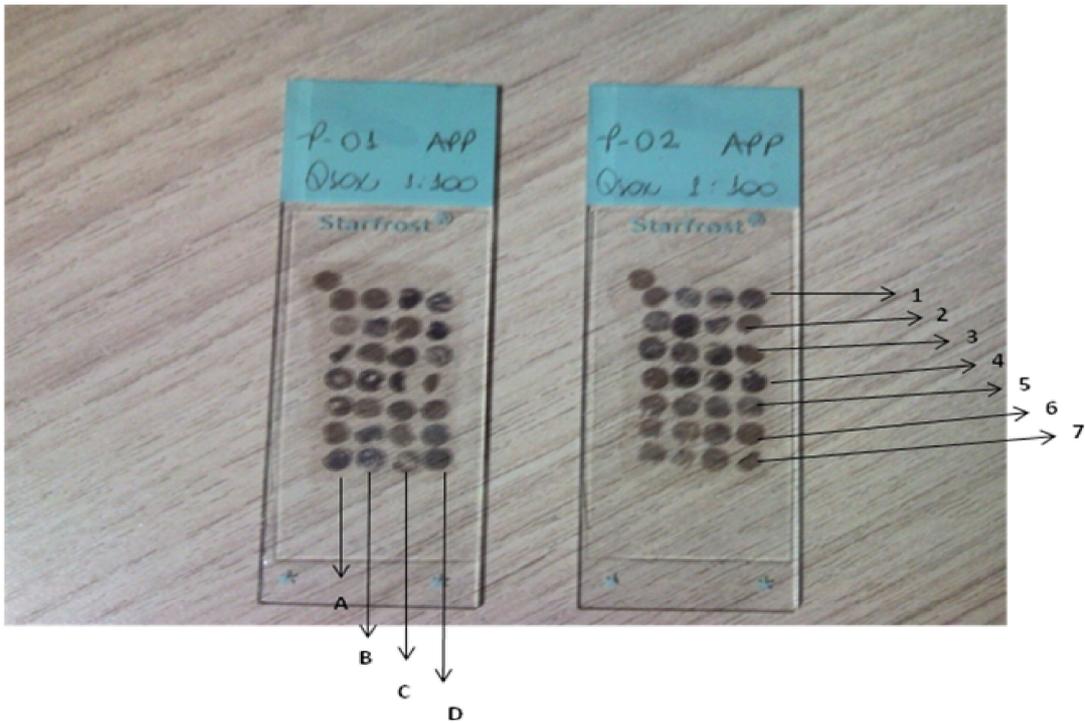


Figura 6 – Fotografia de um exemplo de lâminas de tissue microarray coradas pelo método da imunohistoquímica com o anticorpo anti-QSOX1. . Fonte: Autora.



Figura 7: Equipamento utilizado para avaliação das lâminas de TMA (computador e microscópio com câmera acoplada). Laboratório de Patologia Experimental – PUCPR. Fonte: Autora.

4.6. REALIZAÇÃO DOS TESTES IMUNOISTOQUÍMICOS.

Seis cortes de parafina dos blocos em TMA, com 4µm de espessura cada um, foram desparafinizados com xilol (37°C) e desidratados com banhos sucessivos de álcool. A rehidratação foi feita com água. Foram utilizados álcool metílico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para o primeiro bloqueio da peroxidase endógena e a água destilada e H₂O₂ para o segundo bloqueio. A incubação foi feita com os anticorpos primários na diluição determinada pelo fabricante ou adaptada para melhores resultados neste material (vide quadro 2), tendo duração de 12 horas, em câmara úmida e temperatura de 2 a 8°C. Todos os anticorpos utilizados eram monoclonais: anti-QSOX1 (recombinante de camundongo produzido na Universidade Federal do Paraná – UFPR), anti-PTEN Data Sheet (monoclonal de camundongo da novocastra®), anti-Ki 67 (monoclonal de camundongo Dako®), anti-caspase 8 (monoclonal de camundongo Dako®), anti-Bcl2 (monoclonal de camundongo Dako®) e anti-Bax (monoclonal de camundongo Dako®). Como anticorpo secundário utilizado foi o Advance Dako ® , o qual foi incubado com o material por 30 minutos, também em temperatura de 2 a 8°C. Para a revelação das lâminas foi adicionado complexo DAB + substrato Dako ® sobre as lâminas eletricamente carregadas Star Frost ®, sendo que a contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris, seguida de desidratação com banhos de álcool etílico 100% e de clarificação com xilol. Para a montagem das lâminas se utilizou a resina histológica da marca Entellan ®.

Quadro 6 – Anticorpos utilizados no estudo com respectivas funções e sítios.

Marcador	Fornecedor	Função	Sítio
QSOX1	UFPR	Proliferação	Citoplasma/Matriz extracelular
PTEN	Novocastra®	Antiproliferativo	Núcleo
Ki67	Dako®	Proliferação	Núcleo
Caspase 8	Advanced®	Pró-apoptótica	Membrana Mitocondrial/Citoplasma
Bcl2	Dako®	Antiapoptótica	Membrana Mitocondrial/Citoplasma
Bax	Dako®	Pró-apoptótica	Membrana Mitocondrial/Citoplasma

Fonte: Autora

4.7. LEITURA DAS LÂMINAS DE IMUNOISTOQUÍMICA.

Para a leitura do anticorpo anti-QSOX1 foi utilizado o programa Image Pro Plus®, em um computador DELL®, com o auxílio de uma câmera Dino-eye® e de um

microscópio óptico BX40 da Olympus®. Utilizando-se a objetiva de 40x e o software de análise de imagem foram medidas as áreas de imunopositividade da anti-QSOX1 nas amostras do estudo. O anticorpo anti-QSOX1 cora o citoplasma e matriz extracelular dos neuroblastomas em castanho, quando positivo. O observador fornece ao programa uma amostra da coloração castanha considerada positiva e o programa faz a leitura da totalidade da área imunopositiva no campo de grande aumento (CGA = objetiva de 40x), em micrômetros quadrados (μm^2). Para determinar a área média de imunopositividade da QSOX1 por campo de grande aumento em cada tumor foram lidos cinco campos de grande aumento em todas as amostras dos casos do estudo, somando-se um total de 10 campos de grande aumento por caso.

A leitura das lâminas imunocoradas pelo Ki67 e pelo PTEN foi realizada através da contagem de núcleos positivos por CGA, em microscopia óptica, com o microscópio BX40 da Olympus®, utilizando-se a objetiva 40x, onde foram lidos três campos em todas as amostras, somando um total de seis campos por caso de estudo.

Para as lâminas imunocoradas com Bcl2, caspase 8 e Bax foram feitas utilizando-se um microscópio óptico BX40 da Olympus® e o programa Image Pro Plus®, num computador DELL®, com o auxílio de uma câmera Dino-eye®. Utilizando-se a objetiva de 40x, e o software de análise de imagem foram medidas as áreas de imunopositividade da caspase 8, do Bcl2 e do Bax nas amostras do estudo, do mesmo modo que o descrito para a QSOX1. O programa fez a leitura da área imunopositiva total, em micrômetros quadrados (μm^2), por CGA. Para determinar a área média de imunopositividade para cada anticorpo (caspase 8, Bcl2 e Bax) foram lidos quatro CGA em todas as amostras, somando-se um total de 8 campos por caso.

4.8. HIBRIDIZAÇÃO IN SITU COM FLUORESCÊNCIA - FISH.

A partir do TMA, também foram reproduzidas lâminas em branco e enviadas para o Serviço de Patologia do Hospital A C Camargo em São Paulo para avaliação da amplificação do *MYCN* através da técnica de FISH. Pela hibridização *in situ*, as lâminas confeccionadas podem ser visualizadas em microscópio de fluorescência, e as alterações cromossômicas, se presentes, são identificadas (78,79).

4.9. VARIÁVEIS DO ESTUDO.

4.9.1. Variáveis clínicopatológicas.

Para a análise dos resultados, os casos foram separados em grupos de acordo com os fatores prognósticos clínicopatológicos já conhecidos tais como:

A – Idade ao diagnóstico (se menor de 18 meses ou maior ou igual a 18 meses),

B – Localização da lesão no momento do diagnóstico (se a lesão é extra-abdominal ou apenas abdominal),

C – Infiltração da medula óssea (se infiltrada pela neoplasia ou não),

D – Grau de diferenciação histológica da lesão (se pouco diferenciado/indiferenciado ou bem diferenciado/em diferenciação/ganglioneuroblastoma)

E – Evolução da doença (se em óbito ou vivos com e sem recidiva/doença residual).

F – Classificação de Shimada (se histologia favorável ou desfavorável)

G – Estroma do tumor (se pobre ou rico em estroma com células de Schwann diferenciadas)

H – Amplificação do *MYCN* (Amplificado / Não Amplificado).

4.9.2. Variáveis imunoistoquímicas.

Os grupos definidos pelas variáveis clínico-patológicas foram comparados às médias de positividade dos seguintes marcadores imunoistoquímicos:

A – QSOX1

B – Ki67

C – PTEN

D – Caspase - 8

E – Bcl2

F – Bax

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

A análise estatística realizada considerou as medidas descritivas dos dados, incluindo frequências e percentuais para as variáveis categóricas, e médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões para as quantitativas.

Para a comparação de grupos definidos pelas variáveis clinicopatológicas e evolução clínica em relação as variáveis quantitativas, foi usado o teste t de Student ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Em relação as variáveis nominais dicotômicas, os grupos foram comparados usando-se o teste exato de Fisher.

O grau de associação entre dois marcadores foi avaliado pelo coeficiente de correlação de Spearman e pelo coeficiente de concordância de Kappa.

Para avaliação da sobrevida dos pacientes foram construídas curvas de Kaplan-Meier, sendo as comparações de duas curvas feitas pelo teste de log-rank.

Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. O programa de análise estatística utilizado foi o SPSSV8®.

Para a determinação dos pontos de corte que melhor discriminassem a relação entre os dois grupos histológicos, foram ajustadas curvas ROC. A determinação dos pontos de corte pelas curvas ROC separaram as amostras em dois grupos, quanto a sua imunopositividade, para todos os biomarcadores estudados: (a) grupo da imunopositividade elevada para estes biomarcadores ou; (b) grupo da imunopositividade baixa para os mesmos. Abaixo demonstramos, apenas a título de ilustração, como estes pontos de corte foram calculados, apenas para a QSOX, o Ki67 e o PTEN (tabela 1), sendo que o mesmo método foi aplicado para os demais anticorpos (Bcl2, caspase - 8 e Bax). Após determinação da curva ROC, foram considerados em relação ao Ki67, os valores de 159 núcleos positivos por campo de grande aumento (CGA) como imunopositividade elevada e abaixo disto como imunopositividade baixa. Para o PTEN, o valor para imunopositividade elevada foi de 637 núcleos positivos por CGA e abaixo disto foi considerado imunopositividade baixa. Para a QSOX1, o valor de imunopositividade elevada foi considerado o maior que 63 micrômetros quadrados por CGA e igual ou

abaixo disto foi considerado imunopositividade baixa (Quadro 7).

Quadro 7. Determinação de ponto de corte para os anticorpos QSOX1, Ki67 e PTEN (Determinado através da Curva ROC) e para a caspase 8, Bcl2 e Bax estabelecido padrão focal/multifocal.

Marcadores	Ponto de corte
QSOX 1	62,98 (63) μm^2 /CGA
Ki67	158,67 (159) núcleos positivos
PTEN	637,33 (637) núcleos positivos
Caspase - 8	Focal (Negativo); Multifocal (Difuso)
Bcl2	Focal (Negativo); Multifocal (Difuso)
Bax	Focal (Negativo); Multifocal (Difuso)

* CGA: Campos de grande aumento. Fonte: Autora.

5. RESULTADOS.

5.1. ANÁLISE DA POPULAÇÃO DO ESTUDO.

Não houve predomínio significativo entre sexo masculino e feminino. A maioria dos pacientes teve diagnóstico de neuroblastoma com idade abaixo de 18 meses 60,8%, sendo a maior parte das lesões de localização abdominal 60,8% e com grau histológico bem diferenciado 60,8%. Apenas 65% haviam realizado biópsia de medula óssea e, desses, 26,6% tinha a medula infiltrada pelo tumor. No seguimento, foi observado que 60% dos pacientes estavam vivos após três anos do diagnóstico, porém 57% apresentava doença em atividade (Tabela Geral - Anexo).

5.2. ANÁLISE DAS VARIÁVEIS CLÍNICAS EM RELAÇÃO AOS BIOMARCADORES TESTADOS.

Á imunexpressão do Ki67, PTEN e QSOX1 relacionou-se com o tipo de estroma tumoral, observando-se que o primeiro e o segundo biomarcador (Ki67 e PTEN) foram mais imunopositivos nos casos de estroma pobre ($p = 0,018$ e $p = 0,024$, respectivamente). Já a QSOX1, que é nosso biomarcador em teste, foi mais imunopositiva nos casos de tumores ricos em estroma, com uma tendência à relevância estatística ($p = 0,054$) (Tabela Geral - Anexo) .

Com relação ao Bcl2 e Bax, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias de imunopositividade destes anticorpos quando relacionados aos grupos definidos pelas variáveis clinicopatológicas e de evolução clínica. Já com relação a caspase 8, observou-se que este marcador foi mais imunopositivo nos casos com medula óssea negativa do que naqueles com medula óssea positiva ($p = 0,035$) (Tabela Geral – Anexo).

A partir dos pontos de corte (Quadro 7), foram realizadas novas comparações com os grupos definidos pelas variáveis clinicopatológicas e de evolução clínica.

Tabela 1– Correlação entre o marcador QSOX1 e as variáveis clínico-patológicas estudadas.

Variável	Imunopositividade da QSOX1		Total	Valor de p^*
	≤ 63 - baixa	> 63 - elevada		
Idade ao diagnóstico				
≤ 18 meses	08 (57,14%)	06 (42,86%)	14	
> 18 meses	05 (55,56%)	04 (44,44%)	09	1,000
Local da lesão				
Extra-abdominal	07 (77,78%)	02 (22,22%)	09	
Abdominal	06 (42,86%)	08 (57,14%)	14	0,197
Status Medula Óssea				
Negativa	06 (54,55%)	05 (45,45%)	11	
Positiva	03 (75,00%)	01 (25,00%)	04	0,604
Classificação Shimada				
Desfavorável	04 (80,00%)	01 (20,00%)	05	
Favorável	09 (50,00%)	09 (50,00%)	18	0,251
Diferenciação da lesão				
Pouco diferenciado	08 (88,89%)	01 (11,11%)	09	
Bem diferenciado	05 (35,71%)	09 (64,29%)	14	0,029

Legenda: (*) Teste exato de Fisher, $p < 0,05$. Imunopositividade média da QSOX1 para cada caso do estudo medida em micrômetros quadrados (área), por campo de grande aumento.

A imunomarcção para QSOX1 esteve diminuída em 8 amostras do tipo bem diferenciado e elevada em 5 amostras do tipo pouco diferenciado. E se apresentou elevada em 9 amostras de tumor bem diferenciado e diminuída em uma amostra de tumor pouco diferenciado, sendo este dado estatisticamente significativo, como demonstra a tabela 1 ($p = 0,029$). Sendo assim, houve uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão elevada de QSOX1 e os neuroblastomas bem diferenciados (Tabela 1).

Tabela 2 – Correlação entre o marcador Ki67 e as variáveis clínico-patológicas estudadas.

Variável	Imunopositividade do Ki67		Total	Valor de p^*
	> 159 - elevada	≤ 159 - baixa		
Idade ao diagnóstico				
≤ 18 meses	05 (35,71%)	09 (64,29%)	14	
> 18 meses	05 (55,56%)	04 (44,44%)	09	0,417
Local da lesão				
Extra-abdominal	04 (44,44%)	05 (55,56%)	09	
Abdominal	06 (42,86%)	08 (57,14%)	14	1,000
Status Medula Óssea				
Negativa	05 (45,45%)	06 (54,55%)	11	
Positiva	03 (75,00%)	01 (25,00%)	04	0,569
Classificação Shimada				
Desfavorável	04 (80,00%)	01 (20,00%)	05	
Favorável	06 (33,33%)	12 (66,67%)	18	<u>0,0886</u>
Diferenciação da lesão				
Pouco diferenciado	07 (77,78%)	02 (22,22%)	09	
Bem diferenciado	03 (21,43%)	11 (78,57%)	14	0,013

Legenda: (*) Teste exato de Fisher, $p < 0,05$. Imunopositividade média do Ki67 para cada caso do estudo, medida em número de núcleos positivos por campo de grande aumento.

A imunopositividade elevada para a proteína Ki67 ($p = 0,013$) apresentou uma correlação estatisticamente significativa com os casos de neuroblastoma pouco diferenciados (tabela 2) e em relação a classificação de Shimada, parece haver uma correlação entre os casos de tumores com comportamento desfavorável, e a elevada expressão deste marcador ($p = 0,0886$).

Tabela 3. Correlação entre o marcador PTEN e as variáveis clínico-patológicas estudadas.

Variável	Imunopositividade do PTEN		Total	Valor de p^*
	> 637 - elevada	≤ 637 - baixa		
Idade ao diagnóstico				
≤ 18 meses	05 (35,71%)	09 (64,29%)	14	1,000
> 18 meses	04 (44,44%)	05 (55,56%)	09	
Local da lesão				
Extra-abdominal	06 (66,67%)	03(33,33%)	09	0,077
Abdominal	03 (21,43%)	11(78,57%)	14	
Status Medula Óssea				
Negativa	04 (36,36%)	07 (63,64%)	11	1,000
Positiva	01 (25,00%)	03 (75,00%)	04	
Classificação Shimada				
Desfavorável	03 (60,00%)	02 (40,00%)	05	0,283
Favorável	06 (33,33%)	12 (66,67%)	18	
Diferenciação da lesão				
Pouco diferenciado	06 (66,67%)	03 (33,33%)	09	0,077
Bem diferenciado	03 (21,43%)	11 (78,57%)	14	

Legenda: (*) Teste exato de Fisher, $p < 0,05$. Imunopositividade média do PTEN para cada caso do estudo, medida em número de núcleos positivos por campo de grande aumento.

A imunopositividade elevada para proteína PTEN pareceu se correlacionar com os fatores de pior prognóstico como os casos pouco diferenciados e de localização extra-abdominal ($p = 0,077$) (Tabela 3).

O estudo das correlações dos pontos de corte do Bcl2, do Bax e da Caspase-8 com os grupos definidos pelas variáveis clinicopatológicas e de evolução clínica não revelou resultados estatisticamente significativos.

Quadro 8. Correlação entre o padrão do estroma da neoplasia (se rico ou pobre em matriz extracelular com células de Schwann) e as curvas ROC dos biomarcadores Ki67, PTEN e QSOX1 calculado pelo teste exato de Fisher.

Teste exato de Fisher	p -valor	Hipótese
Teste exato de Fisher Ki67	0,012*	Prob estroma rico>pobre para o Ki67
Teste exato de Fisher PTEN	0,042*	Prob estroma rico>pobre para o PTEN
Teste exato de Fisher QSOX1	0,017*	Prob estroma rico>pobre para a QSOX1

Teste exato de Fisher, $p < 0,05$

Prob = Probabilidade

Também foram avaliadas as correlações entre o padrão do estroma e as curvas ROC do Ki67, PTEN e QSOX1, sendo que a expressão imunoistoquímica elevada de Ki67 se relacionou com os casos de estroma pobre em células de Schwann diferenciadas ($p = 0,012$), o mesmo ocorrendo entre a imunoexpressão elevada de PTEN ($p = 0,042$). Também observamos correlação entre a expressão imunoistoquímica elevada de QSOX1 e os casos de estroma rico em células de Schwann diferenciadas ($p = 0,017$) (Quadro 8). Não foram observadas correlações estatisticamente significativas entre o padrão estromal da neoplasia e a imunoexpressão de Bax, Bcl2 e caspase 8.

5.3. CORRELAÇÃO ENTRE OS BIOMARCADORES TESTADOS.

Quadro 9. Correlação entre os níveis de marcadores através do Coeficiente de Correlação de SPEARMAN

Marcadores	N	Coeficiente de correlação de Spearman	Valor de p
Ki67 vs PTEN	23	0,22	0,314
Ki67 vs QSOX1	23	-0,66	0,001
Ki67 vs Bcl2	23	0,00	0,999
Ki67 vs caspase 8	23	0,14	0,526
Ki67 vs Bax	23	0,24	0,260
PTEN vs QSOX1	23	-0,16	0,468
PTEN vs Bcl2	23	0,52	0,012
PTEN VS caspase 8	23	-0,15	0,502
PTEN vs Bax	23	0,38	0,076*
QSOX1 vs Bcl2	23	-0,03	0,906
QSOX1 vs caspase 8	23	-0,31	0,153
QSOX1 vs Bax	23	-0,23	0,283
Bcl2 vs caspase 8	23	0,03	0,877
Bcl2 vs Bax	23	0,66	0,001
caspase 8 vs Bax	23	0,26	0,234

Legenda: O coeficiente de correlação positivo indica associação direta entre os marcadores, ou seja, valores baixos (ou altos) de um deles correspondem a valores baixos (ou altos) do outro. Coeficiente de correlação negativo indica associação inversa entre os marcadores.

Avaliou-se a correlação entre os níveis de imunoexpressão dos marcadores, estimando o coeficiente de correlação de Spearman. No quadro 9, estão apresentados os valores dos coeficientes de correlação estimados e o valor de p dos testes estatísticos, evidenciando-se a existência ou não de correlação entre os marcadores Ki67, QSOX1, PTEN, Bax, Bcl2 e caspase 8. Houve correlação negativa entre o Ki67 e a QSOX1 ($p = 0,001$) e houve correlação positiva entre o Bcl2 e o PTEN ($p = 0,012$) e entre o Bcl2 e o Bax ($p = 0,001$).

5.4. ANÁLISE DE SOBREVIDA E RECIDIVA VERSUS DOENÇA RESIDUAL.

Seguindo-se a análise da sobrevida, observamos que:

Gráfico 1: Curva de sobrevida geral dos pacientes do estudo.

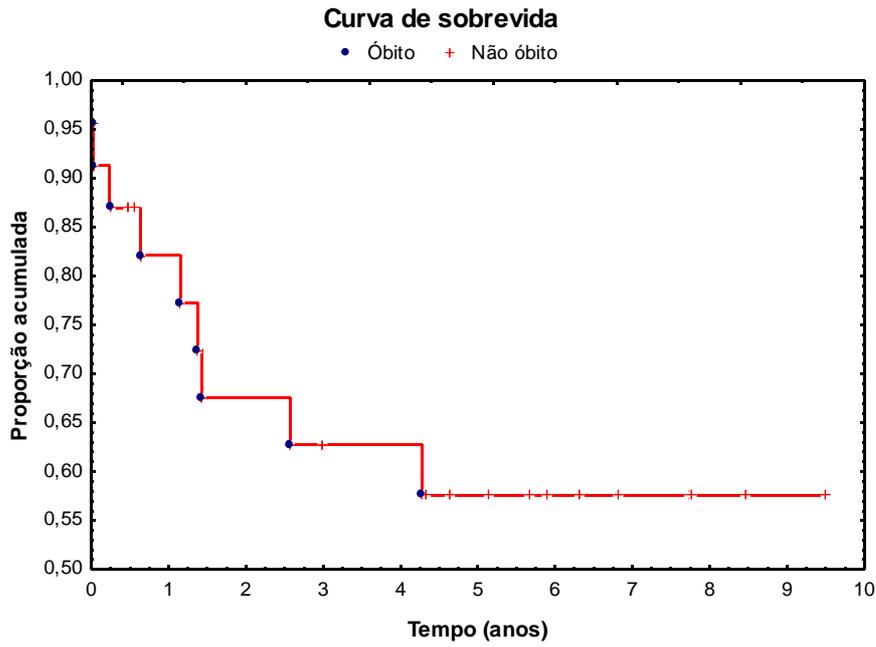
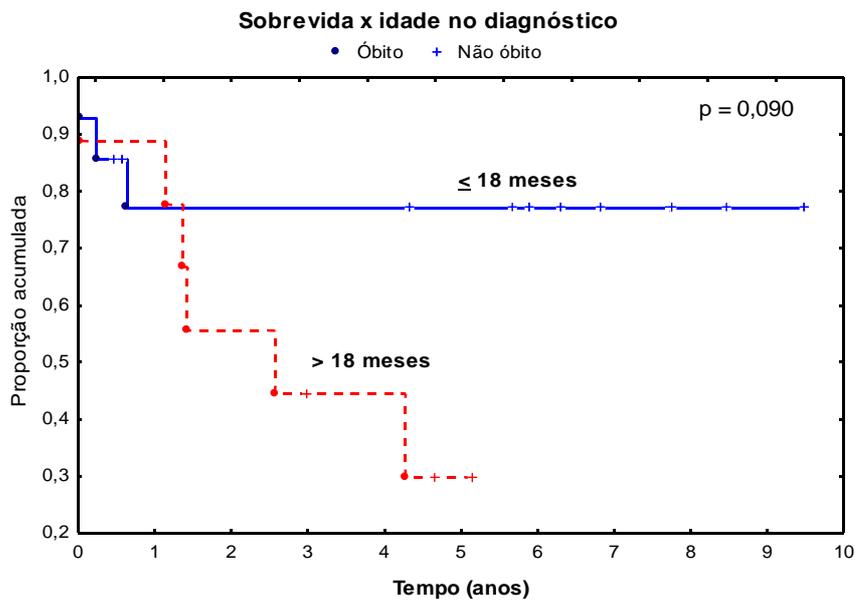
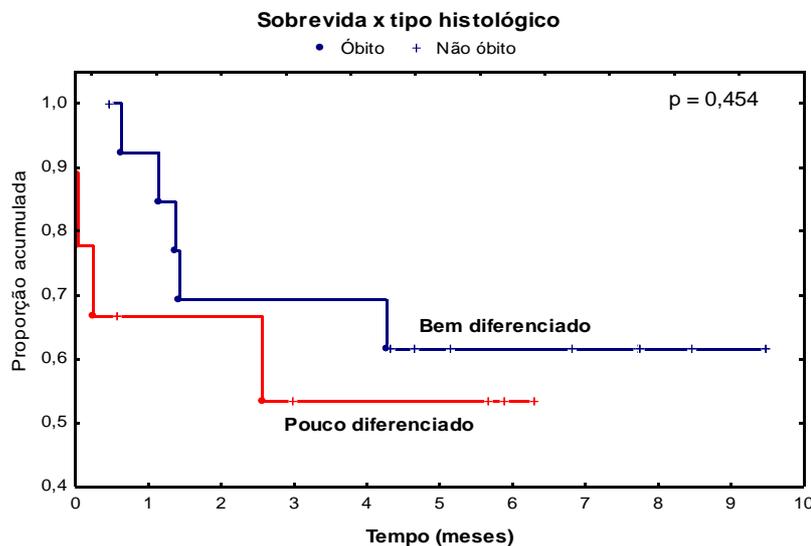


Gráfico 2 – Curva de sobrevida dos pacientes do estudo em relação à idade no diagnóstico.



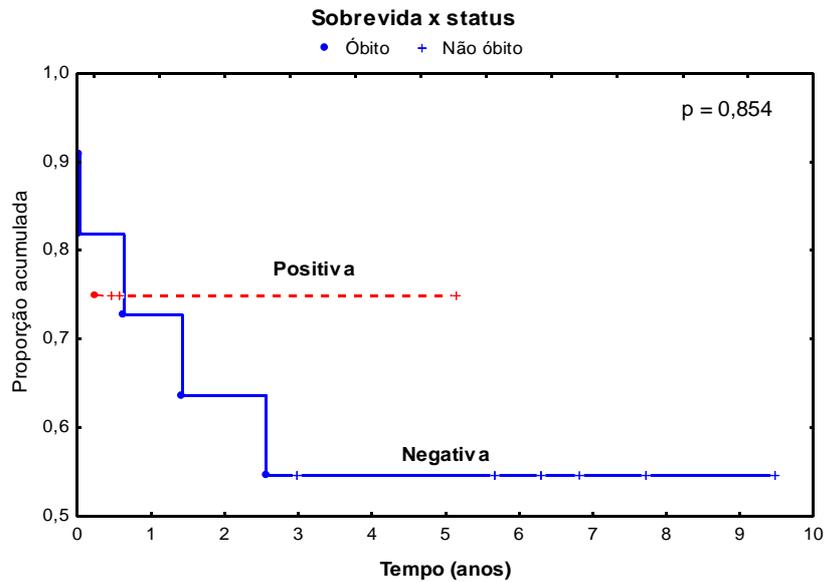
1. A curva geral da sobrevida do estudo está representada pelo gráfico 1. Na análise da sobrevida em relação à idade no diagnóstico, constatou-se três óbitos entre as crianças que foram diagnosticadas com neuroblastoma com idade inferior (ou igual) a 18 meses, e onze permaneceram vivas. Naquelas diagnosticadas com idade superior a 18 meses, os óbitos ocorreram em seis casos e três permaneceram vivos. Encontramos uma tendência à relevância estatística para este parâmetro clínico com o valor de $p = 0,090$ (vide gráfico 2).

Gráfico 3 – Curva de sobrevida dos pacientes do estudo em relação ao tipo histológico.



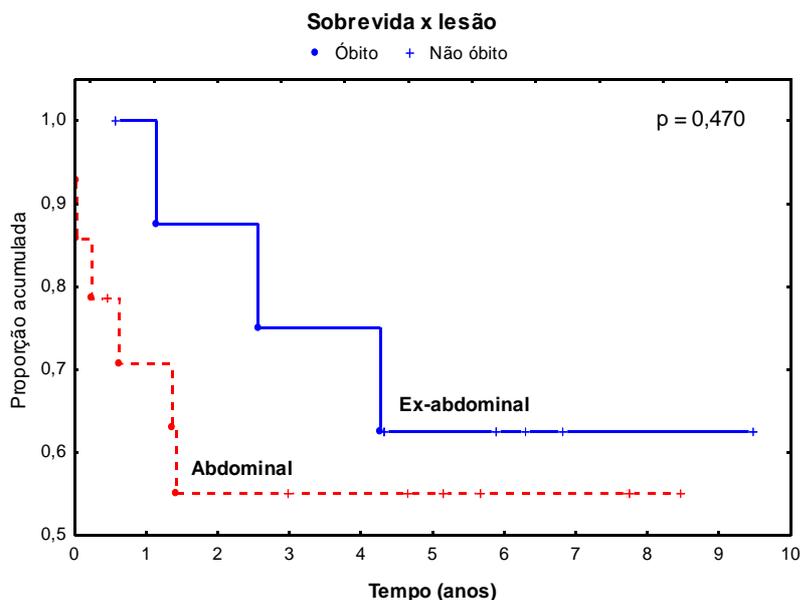
2. Na análise do grau de diferenciação histológica como determinante da sobrevida encontramos que cinco pacientes que foram a óbito apresentavam tumores bem diferenciados e nove, que permaneceram vivos com este mesmo grau de diferenciação. Dentre aqueles com grau histológico pouco diferenciado, tivemos quatro pacientes que foram a óbito e cinco que permaneceram vivos ($p = 0,454$) (Gráfico 3).

Gráfico 4 – Curva de sobrevida dos pacientes do estudo em relação a infiltração da medula óssea ao diagnóstico.



3. Comparamos também o acometimento da medula óssea pela neoplasia e sobrevida e, dos quinze pacientes do nosso estudo que realizaram biópsia de medula óssea, apenas quatro apresentaram infiltração pelo neuroblastoma, sendo que apenas um faleceu. Dos onze que não tinham o acometimento, tivemos cinco óbitos ($p = 0,854$) (Gráfico 4).

Gráfico 5 – Curva de sobrevida dos pacientes do estudo em relação a localização da lesão ao diagnóstico.



4. Quanto à localização da lesão foram nove pacientes com localização extra-abdominal e, desses, três faleceram. Dos catorze pacientes com lesão intra-abdominal apenas seis faleceram ($p = 0,470$) (Gráfico 5).

5. Não houve correlação entre a Classificação de Shimada e a sobrevida dos pacientes.

6. Comparamos os marcadores Ki67, PTEN, QSOX1, caspase 8, Bcl2 e Bax com a sobrevida dos pacientes e não houve correlação estatisticamente significativa entre os marcadores e a variável sobrevida.

5.5. ANÁLISE RESTRITA DOS PACIENTES QUE NÃO FORAM A ÓBITO.

1. Seguindo-se as análises de recidiva e doença residual, observamos que: Houve tendência a uma correlação estatística entre os pacientes com estroma pobre e uma maior taxa de doença residual ($p = 0,063$)

Tabela 8. Relação entre a imunopositividade do biomarcador QSOX1 e recidiva da doença.

QSOX área	Recidiva		Total
	0	1	
≤ 63	6 66,67%	3 33,33%	9
> 63	1 20,00%	4 80,00%	5

Teste exato de Fisher. ($p=0,266$)

2. Em relação ao biomarcador QSOX1, dos nove pacientes com valor de imunopositividade baixo, três apresentaram recidiva da doença e entre os cinco que apresentaram um valor elevado de imunopositividade, quatro não apresentou recidiva ($p = 0,266$) (Tabela 8).

Tabela 9. Relação entre a imunopositividade do biomarcador PTEN e recidiva da doença.

PTEN	Recidiva		Total
	0	1	
> 637	4	0	4
	100,00%	0,00%	
≤ 637	3	7	10
	30,00%	70,00%	

Teste exato de Fisher. ($p=0,070$)

3. O marcador PTEN apresentou uma boa correlação com a recidiva. Dos quatro pacientes que apresentaram um valor elevado para a imunopositividade do PTEN nenhum apresentou recidiva. E dos dez pacientes que apresentaram um baixo valor para positividade deste mesmo marcador sete apresentaram recidiva. Esses resultados indicam uma tendência estatística com $p = 0,070$ (Tabela 9).

Tabela 10. Relação entre a imunopositividade do biomarcador Ki67 e recidiva da doença.

Ki67	Recidiva		Total
	0	1	
> 159	5	1	6
	83,33%	16,67%	
≤ 159	2	6	8
	25,00%	75,00%	

Teste exato de Fisher. ($p=0,103$)

4. Analisando o marcador Ki67 e relacionando-o às recidivas, tivemos que dos oito pacientes que apresentaram baixa imunopositividade para o Ki67, seis apresentaram recidiva. Dos seis pacientes que tinham um valor de imunopositividade elevado, cinco não apresentaram recidiva ($p = 0,103$) (Tabela 10).

Com relação aos marcadores caspase 8, Bax e Bcl2, não houve correlação estatisticamente significativa dos resultados desses biomarcadores com as taxas de recidivas das lesões.

5.6. ANÁLISE DA AMPLIFICAÇÃO DO *MYCN*.

A amplificação do proto-oncogene *MYCN* foi realizada pelo método de FISH e não foi observada em nenhum dos casos do estudo.

5.7 - FOTOMICROGRAFIAS DAS REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS.

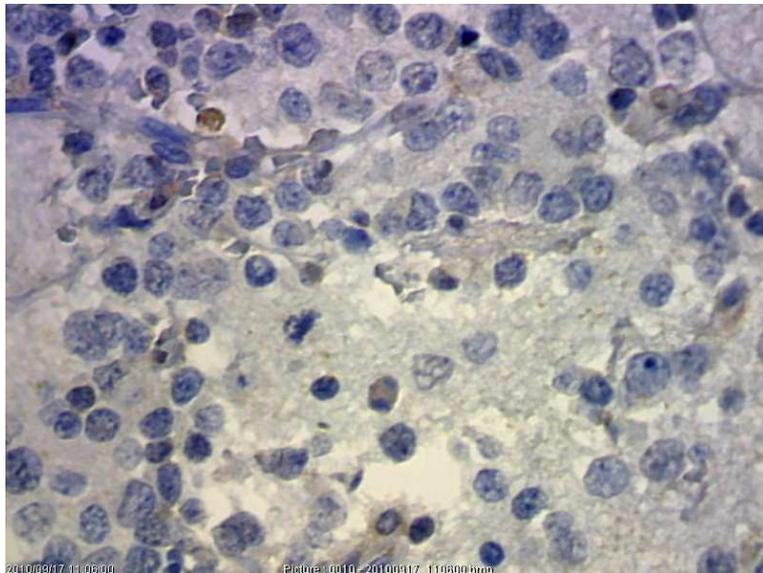


Figura 8: Coloração imunoistoquímica pelo biomarcador QSOX1 em lâminas de neuroblastoma. Observe a positividade citoplasmática e de matriz

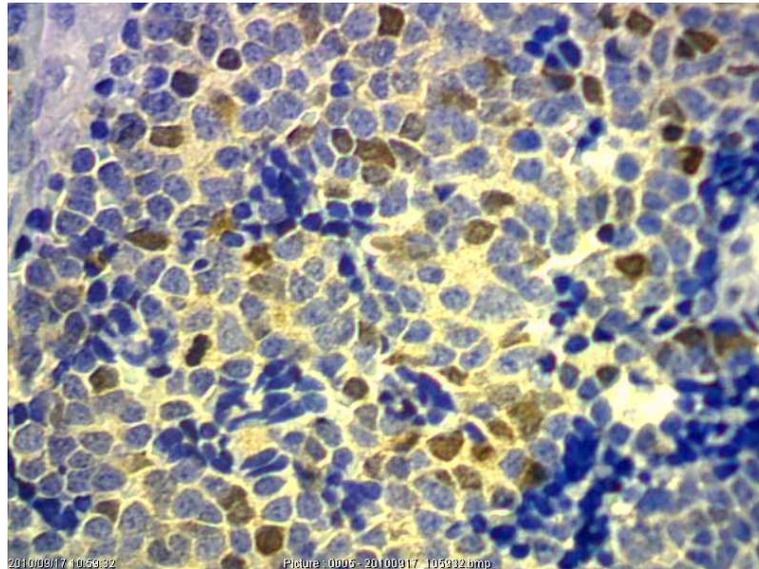


Figura 9: Coloração imunoistoquímica pelo biomarcador Ki67 em lâminas de neuroblastoma. Observe a positividade nuclear.

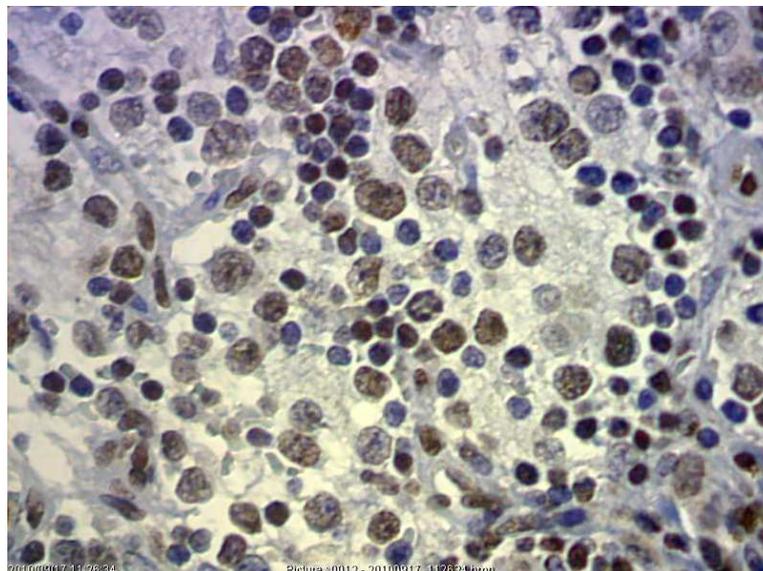


Figura 10: Coloração imunoistoquímica pelo biomarcador PTEN em lâminas de neuroblastoma. Observe a positividade nuclear.

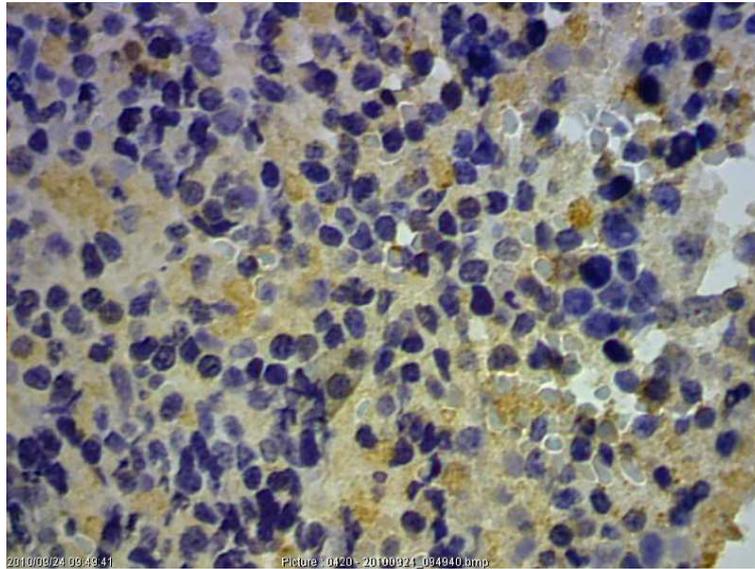


Figura 11: Coloração imunoistoquímica pelo biomarcador Bcl2 em lâminas de neuroblastoma. Observe a positividade perinuclear.

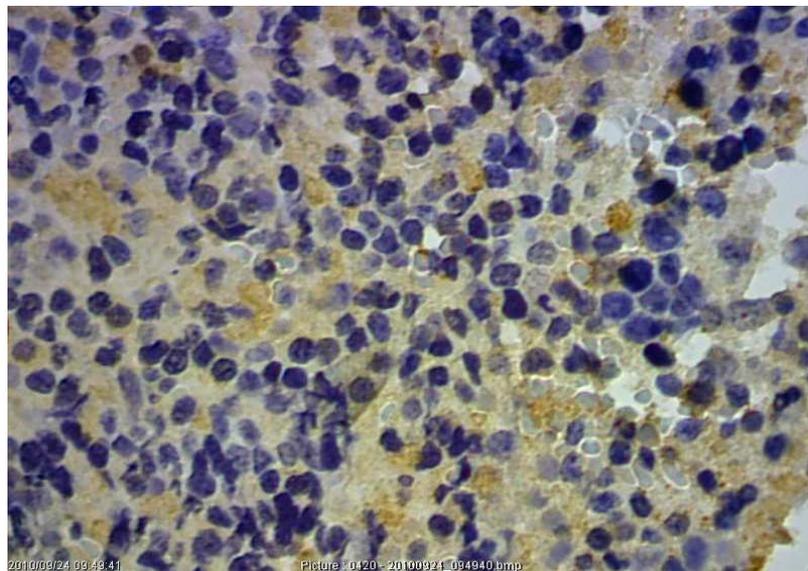


Figura 12: Coloração imunoistoquímica pelo biomarcador caspase-8 em lâminas de neuroblastoma,. Observe a positividade citoplasmática.

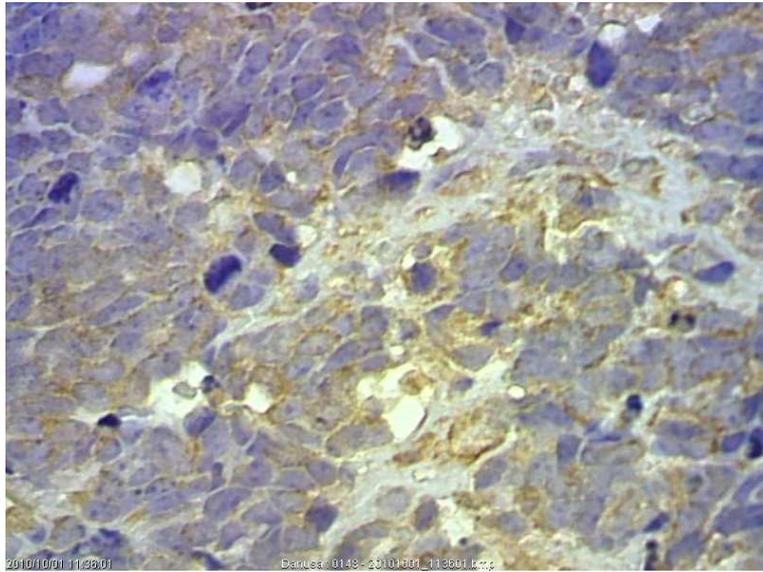


Figura 13: Coloração imunoistoQUÍMICA pelo biomarcador Bax em lâminas de neuroblastoma. Observe a positividade citoplasmática.

6. DISCUSSÃO.

6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.

O câncer infanto-juvenil compreende a faixa etária de pacientes abaixo de 19 anos e representa 2 a 3% de todos os tumores malignos (80, 81, 82, 83). Entre zero e 14 anos, o neuroblastoma corresponde a 7,7% dos tumores do sistema nervoso (periférico ou central). Nos Estados Unidos entre 2001 e 2003, foram 166 casos novos de neuroblastoma/1.000.000 de crianças e adolescentes de 0 a 19 anos (80). De acordo com dados dos registros hospitalares de câncer no Brasil, entre 2000 e 2004, foram registrados 436 casos de câncer em pacientes entre zero e 19 anos no Hospital Erasto Gaetner em Curitiba, sendo 2,4% em pacientes menores de 15 anos e 1,5% entre 15 e 19 anos (80). Neuroblastomas e ganglioneuroblastomas por sua vez correspondem a 7,8% de todos os cânceres em crianças menores de 15 anos, sendo o mais frequente o neuroblastoma (80,81).

O progresso na cura das crianças portadoras de neuroblastoma não foi tão acentuado como o registrado em outros tumores e continua sendo um grande desafio no mundo inteiro para os oncologistas pediátricos, já que 50% destes casos apresentam doença avançada ao diagnóstico e a sobrevida não ultrapassa a 40% (80,82,83).

Dados de registros hospitalares de câncer para crianças abaixo de 15 anos, em três hospitais do estado do Paraná (que juntos contemplaram 76% dos casos de todos os cânceres registrados para esta faixa etária no estado), compilados no período de 1990-2000, foram analisados quanto às características clínicas e a sobrevida. Foram diagnosticados 125 casos de neuroblastomas neste período (33 casos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná, 33 casos no Hospital Erasto Gaetner e 59 casos no Hospital Pequeno Príncipe) e, de acordo com o estadiamento, 102 casos apresentaram doença avançada ao diagnóstico. Destes, 62% estavam abaixo de 2 anos e 25% abaixo de 1 ano (80,82).

Em nossa pesquisa realizamos um levantamento dos casos de neuroblastoma do Hospital Pequeno Príncipe de Curitiba, no período de 08 anos (1998 e 2004), com um

número total de casos de 41 crianças, correspondendo a aproximadamente 69,5% dos casos registrados no período de 10 anos entre 1990 e 2000. Desses, 23 casos foram selecionados para compor nossa amostra por apresentarem blocos parafinados de biópsia em boas condições de uso para análise imunoistoquímica e prontuários com todas as informações adequadas para fazer parte deste estudo.

A maioria dos pacientes foi diagnosticada com idade abaixo de 18 meses (60,86%), como descrito na literatura científica, sem haver predomínio significativo em relação ao gênero, apesar de haver, segundo alguns autores, leve prevalência para gênero masculino (1,2 meninos:1 menina). Observou-se um percentual considerável de casos com medula óssea infiltrada e doença extra-abdominal, ou seja, já com estádios clínicos avançados piorando o prognóstico conforme observado em diversos estudos (12,13).

Dados epidemiológicos revelam que o neuroblastoma apresenta aspectos clinicopatológicos que exercem influência negativa na resposta ao tratamento, elevando a probabilidade a quimiorresistência e taxas de sobrevida mais baixas.

Analisando o processo de tumorigênese do neuroblastoma e seus mecanismos de proliferação celular e de resistência a apoptose, idealizou-se um modelo comparativo com biomarcadores proliferativos e apoptóticos já conhecidos e bem consolidados na literatura (PTEN, Ki67, Bax, Bcl2 e caspase - 8), com o biomarcador testado, a quiescina sulfidril oxidase-1 (QSOX1), cuja expressão imunoistoquímica no momento do diagnóstico, pudesse servir como mais uma ferramenta para avaliação do grau de agressividade do tumor, direcionando a conduta terapêutica e melhorando o prognóstico, que é tão reservado.

Escolhemos a imunoistoquímica por se tratar de um método de diagnóstico complementar útil, ágil, de fácil execução e relativamente barato (84, 85,86, 87) Diversas pesquisas já utilizaram a imunoistoquímica para análise de marcadores como Bcl2, Bclx, Bax, entre outros, e tem se mostrado eficiente (66,71,73, 88,89,90).

A pesquisa foi realizado através da técnica de TMA (tissue microarray) já bem fundamentada e incluída na rotina do Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR com aplicação em diversas pesquisas no departamento e com sua aplicabilidade e eficácia comprovadas (74, 75,76)

O Ki67 é considerado um dos melhores marcadores de proliferação estudados atualmente. Apresenta forte correlação entre sua alta positividade e o prognóstico mais reservado em diversos tumores, tais como melanomas, astrocitomas, câncer de mama e carcinomas de tireóide e de células escamosas de boca (66, 69, 91, 92, 93, 94, 95). Estudos demonstraram que quanto maior a expressão do Ki67, pior o prognóstico dos tumores. Isso porque esta alta expressão do Ki67 revelaria as células com maior potencial de proliferação e que responderiam por altas taxas de agressividade. Quando analisamos a expressão do Ki67 nas amostras de neuroblastomas e comparamos cada uma das variáveis clínicas e patológicas, observamos que houve relação inversa (estatisticamente significativa) entre este marcador proliferativo (Ki67) e a diferenciação tumoral isto é, lesões bem diferenciadas tinham menores taxas de Ki67. Encontramos uma correlação estatisticamente significativa entre o Ki67 e o padrão de estroma das lesões, sendo que a expressão deste marcador proliferativo (Ki67) foi maior nos casos pobres em estroma. Entretanto, não conseguimos estabelecer uma boa relação com outras variáveis conhecidamente de mau prognóstico (idade dos pacientes, infiltração de medula óssea, doença extra-abdominal e classificação de Shimada e amplificação do *MYNC*). Isolan et al (2004), também, procuraram estabelecer correlação entre o Ki67 com o grau de malignidade de neoplasias astrocitárias e fatores clínicos (tais como sexo e idade) e da mesma forma não conseguiram estabelecer esta correlação, mas demonstraram boa relação entre a taxa de proliferação dada pelo Ki67 e o grau de malignidade das lesões (69).

Em dois estudos, Korja e Graham analisando a expressão do Ki67 em neuroblastomas, observaram associação entre altas taxas deste marcador e tumores classificados como indiferenciados, demonstrando um aumento do índice proliferativo em casos com pior prognóstico. Diversos autores defendem que este marcador é importante como índice proliferativo e que, apesar de muitas vezes não poder ser considerado isoladamente como preditor prognóstico, pode ser incorporado na rotina de diversos tipos de tumores para evidenciar a agressividade tumoral (69, 92, 93,94,95,96,97).

Outro marcador avaliado foi o PTEN e, neste caso, foi observada alta taxa deste marcador nos pacientes com localização extra-abdominal das lesões e com tumores

pouco diferenciados evidenciando tendência estatística nestes casos. As taxas de expressão imunohistoquímica do PTEN foram maiores nos casos pobres em estroma que teriam pior prognóstico. Estes achados parecem ser contrários aos observados por diversos autores onde as altas expressões do PTEN estão geralmente relacionadas a fatores de bom prognóstico (98), dado que PTEN é um gene supressor de tumor. Porém, as alterações em suas vias de sinalização (principalmente a via PI3-K) poderiam levar à modificação da via normal de apoptose celular. O PTEN também parece funcionar como controlador do ciclo celular, evitando proliferação excessiva (4,41,59,63,99,100). Uma baixa expressão do PTEN geralmente leva a uma desestabilização em sua função de regulação celular e, conseqüentemente, a uma evolução pior, fato que já foi evidenciado em alguns tumores como glioblastomas e carcinomas de pâncreas, além dos neuroblastomas (04, 59,100,101,102,103,104,105,106). O fato de que tivemos expressão imunohistoquímica mais alta do PTEN em casos de estroma pobre (casos com pior prognóstico segundo Shimada) poderia representar apenas um epifenômeno, isto é, a expressão da proteína PTEN estaria alta porque as taxas proliferativas destes tumores estariam muito mais altas, e o PTEN funcionaria como regulador do ciclo celular e indutor de apoptose, uma vez que a indiferenciação favorece a proliferação e a apoptose. À medida que o neuroblastoma se diferencia, tanto as taxas proliferativas como as apoptóticas tendem a cair e talvez assim, a expressão do PTEN. Já é conhecido na literatura que os neuroblastomas pouco diferenciados têm alta taxa apoptótica (representadas pelos altos índices mitoses/cariorraxis), sendo que esta seria um critério proposto por Shimada para classificação destes tumores em histologia favorável ou desfavorável. Além disso, o marcador PTEN apresentou uma tendência à correlação com as recidivas/doença residual, sendo que os casos com imunopositividade baixa do PTEN apresentaram taxas maiores de recidiva ($p = 0,070$), corroborando a hipótese que baixa imunopositividade do PTEN pode representar uma resposta pobre ao tratamento.

A QSOX1 (Quiescência sulfidril oxidase 1) é uma enzima tem como papel principal promover a maturação da matriz extracelular uma vez que um número de processos extracelulares aparecem modulados pela criação ou redução de títulos de dissulfetos, ligados ao processo redox (46, 43, 46). Em relação ao neuroblastoma humano, esta

proteína teria papel, tanto na maturação do estroma primitivo do tipo neurópilo imaturo em estroma rico em células de Schwann diferenciadas, como também na apoptose, aumentando a susceptibilidade destas células à morte celular (107, 108,109). Além disso, esta proteína possui a propriedade de geração de pontes de hidrogênio levando a formação de dissulfetos e reação redox com acúmulo de água (51, 110, 111, 112), estando envolvida com estresse oxidativo induzindo a apoptose pela catálise destas pontes de dissulfetos (113). Este evento foi observado em fibroblastos (52, 114) e células progenitoras do sistema nervoso periférico (115). A QSOX1 está envolvida nos processos neurodegenerativos, quando apresenta disfunções na regulação de crescimento e diferenciação celular (116, 117), na maturação de matriz de neurônios e na produção de fatores de crescimento, entre outros (118, 119, 120,121). Em nosso caso, como a QSOX1 como é um marcador relacionado à regeneração celular, a maturação de matriz extracelular, especial a do tipo neural (neurópilo) e a apoptose, seria de se esperar uma maior imunopositividade em amostras de tumores com padrões histológicos e/ou fatores clinicopatológicos de melhor prognóstico, uma vez que a diferenciação do neuroblastoma está intimamente relacionada às modificações de maturação da sua matriz extracelular e na redução de suas taxas apoptóticas e proliferativas, segundo Shimada (13). Em nossa amostra foi observada correlação direta e estatisticamente significativa entre a imunopositividade elevada de QSOX1 e tumores bem diferenciados e ricos em estroma.

Quando comparamos os biomarcadores entre si, houve correlação inversa (estatisticamente significativa) entre o Ki67 e a QSOX1, o que está de acordo com diversas pesquisas, pois enquanto o Ki67 é um marcador proliferativo a QSOX1 é, por sua vez, um marcador de apoptose e diferenciação celular. Apesar de ter sido observada a correlação da imunopositividade da QSOX1 com amostras de tumores com histologia favorável, não foi encontrada correlação estatística com relação à evolução clínica dos pacientes.

A família do gene Bcl2 exerce importante papel na regulação da apoptose, pois atua diretamente a via das caspases, tendo como participantes desta família moléculas pró-apoptóticas (Bax) e antiapoptóticas (Bcl2) (37, 59, 71, 90, 122, 123, 124, 125, 126). A análise desses dois marcadores nas amostras de neuroblastomas selecionadas, não

revelou nenhuma correlação estatisticamente significativa entre eles e quaisquer das variáveis estudadas, tanto clínica como patológicas. Subramanian *et al.* (2007) observaram que drogas que ativam a expressão da Bax proporcionaram melhor resposta citotóxica em neuroblastomas e ganglioneuromas (127, 128). Chesler *et al.* (2008) estudaram a relação entre quimiorresistência e expressão das proteínas Bcl2 e Bax em neuroblastomas, sendo que altas taxas de Bcl2 estão relacionadas com altas taxas de resistência a quimioterapia (129,130,131, 132).

Em relação às caspases, não encontramos em nosso estudo, correlação estatisticamente significativa quando comparamos os achados imunoistoquímicos da caspase 8, com as variáveis clinicopatológicas do estudo, exceto, quando analisamos a imunopositividade da caspase 8 com os casos onde não houve infiltração de medula óssea e observamos que a expressão deste marcador é maior nestas amostras. De reconhecida importância na programação de morte celular, vários estudos relacionam a inibição das caspases, principalmente a caspase 8, com neoplasias tais como adenocarcinomas, carcinomas de pulmão e neuroblastomas (39, 66, 70,133,134). Trata-se de uma protease pró-apoptótica que em neuroblastomas induziria a morte celular programada, sendo, então, relacionada com melhor prognóstico, fato também observado em nosso estudo. Mas esta proteína também promove migração de células não apoptóticas e pode contribuir com metástases quando a apoptose estiver comprometida. A caspase 8 interage com complexos multiproteínas que incluem adesão focal da quinase (FAK) e calpaina 2 (CPN2), aumenta a clivagem de substratos da FAK e promove a migração celular. A ausência de expressão de caspase 8 pode estar relacionada à resistência a quimioterapia (70, 135, 136,137).

O fato de ter sido encontrada correlação inversa em nosso estudo entre o Bax e o Bcl2 e entre o PTEN e o Bcl2, poderia ser representativo de pior prognóstico, pois, mesmo com a elevação da expressão do Bax e do PTEN estivesse aumentando a cascata apoptótica, a igual elevação da expressão do Bcl2 estaria inibindo a mesma cascata (122,123,124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132).

Na análise da sobrevida em relação à idade do paciente, idade inferior a 18 meses favoreceu melhor taxa de sobrevida ($p = 0,090$) o que está de acordo com demais

autores (12, 13).

Houve uma tendência à correlação estatística entre os pacientes com estroma pobre e uma maior taxa de recidiva/doença residual ($p = 0,063$), o que também está de acordo com a literatura, pois a classificação de Shimada coloca os casos pobres em estroma como desfavoráveis (12, 13).

A pesquisa de amplificação do *MYCN* foi realizada pelo Serviço de Patologia do Hospital A C Camargo, em São Paulo, através da técnica de FISH, (138,139) em nossa amostra, não revelou amplificação do *MYCN* em nenhum de nossos casos. Sabemos que a desregulação do *MYNC* é um fator crucial na progressão do neuroblastoma (6, 12,15,17,19, 23,24,96,140,141,142).

6.2. CONSIDERAÇÕES FINAIS.

A elevada expressão de QSOX1 esteve estatisticamente relacionada aos casos neuroblastoma de histologia favorável (bem diferenciados com estroma rico), estando de acordo com demais autores estudados, ou seja, uma proteína cujas funções mais relevantes são de maturação de matriz e indução de apoptose. Esta proteína pode ser mais um marcador de boa diferenciação e evolução destas lesões.

As altas taxas de expressão do Ki67 estiveram estatisticamente relacionadas aos tumores de histologia desfavorável (pouco diferenciados com estroma pobre). Sendo assim, esta proteína pode ser mais um marcador de pouca diferenciação e péssima evolução destas lesões.

Os valores elevados das taxas de expressão do PTEN estiveram estatisticamente relacionadas aos tumores de histologia desfavorável (pouco diferenciados com estroma pobre), o que não confere com outras pesquisas desenvolvidas.

A caspase 8 foi mais imunopositiva nos pacientes com medula óssea negativa e relacionada ao melhor prognóstico, como já demonstrado.

Há uma correlação inversamente proporcional entre a QSOX1 e o Ki67 e diretamente proporcional entre Bcl2 e Bax e Bcl2 e PTEN, o que já apresenta

embasamento na literatura médico científica.

7. CONCLUSÕES.

1. A expressão imunoistoquímica elevada da QSOX1 foi mais freqüente nos casos de crianças abaixo de 18 meses, com tumores bem diferenciados ($p = 0,029$) e naqueles casos ricos em estroma ($p = 0,017$), que são fatores histopatológicos de bom prognóstico para os casos de neuroblastoma.

2.a. A imunopositividade do Ki67 apresentou uma relação estatisticamente significativa com neuroblastomas ricos em estroma, sendo menos positivo nestes casos ($p = 0,018$) e também teve imunopositividade elevada nos casos pouco diferenciados e de estroma pobre ($p = 0,013$ e $0,012$, respectivamente).

2.b. A positividade do PTEN apresentou uma relação estatisticamente significativa com neuroblastomas ricos em estroma, sendo menos positivo nestes casos ($p = 0,024$), sendo que a imunopositividade alta do PTEN foi mais freqüente nos casos de estroma pobre ($p = 0,042$).

2.c. A caspase 8 foi mais positiva nos pacientes com medula óssea negativa.

3. Houve uma correlação inversamente proporcional entre a QSOX1 e o Ki67 e diretamente proporcional entre Bcl2 e Bax e Bcl2 e PTEN.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1 Kushner BH, Cheung NV. Neuroblastoma — from genetic profiles to clinical challenge. *N Engl J Méd.* 2005, 353:2215-17.
- 2 Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins - Patologia Estrutural e Funcional. 6ª. Edição. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2000. 434-7.
- 3 Hopkins-Donaldson S, Bodmer JL, Bourfoud KB, et al. Loss of caspase 8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2000, 60(16):4315-19.
- 4 Qiao J, Kang J, Cree J, Evers BM, Chung DH. Gastrin-releasing peptide-induced down-regulation of tumor suppressor protein PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) in neuroblastomas. *Annals of Surgery.* 2005, 241(5):684-92.
- 5 Oue T, Fuzukawa M, Kusafuka T, et al. In situ detection of DNA fragmentation and expression of Bcl2 in human neuroblastoma: relation to apoptosis and spontaneous regression. *J. Pediatr. Surg.* 1996, 31:251-57.
- 6 Wittke I, Wiedemeyer R, Pillmann A, et al. Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase/Quiescin6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 2003, 63:7742-52.
- 7 Casciano I, Banelli B, Croce M, et al. Caspase 8 gene expression in neuroblastoma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004, 1028:157-67.
- 8 Islam A, Kageyama H, Takada N, et al. High expression of survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene.* 2000, 19(5):617-23.
- 9 Casciano II, Mazzocco K, Boni L, et al. Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ.* 2002, 9(3):246-51.
- 10 Barrette S, Bernstein ML, Leclerc J, et al. Treatment complications in children diagnosed with neuroblastoma during a screening program. *J. Clin. Oncol.* 2006, 24:1542-45.
- 11 Cohn SL. Diagnosis and classification of the small round-cell tumors of childhood. *AJP.* 1999, 155(1):11-15.

- 12 Lanzkowsky P. Neuroblastoma. In: Manual of Pediatric Hematology and Oncology. 4th Edition. United States of America: Elsevier Academic Press; 2005. p.530-47.
- 13 Brodeur GM, Castleberry RP. Neuroblastoma. In: Pizzo, PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 2nd Ed. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1993. p. 739-67.
- 14 Yong MH, Hwang WS, Knight LA, Fung W, Chan MY, Seow WT , Chui CH. Comparing histopathological classification with *MYCN*, 1p36 and 17q status detected by fluorescence in situ hybridisation from 14 untreated primary neuroblastomas in Singapore. Singapore Med J. 2009. 50(11):1090-1094.
- 15 Dyer MA. Mouse models of childhood cancer of the nervous system. J Clin Pathol.2004, 57:561-76.
- 16 Kushner BH, Cheung N-KV. Neuroblastoma – from genetics profiles to clinical challenge. N Engl J Med. 2007, 353(21): 2215-18.
- 17 Rounbehler RJ, Li W, Hall MA, Yang C, Fallahi M, Cleveland JL. Targeting Ornithine Decarboxylase Impairs Development of *MYCN*-Amplified Neuroblastoma. Cancer Res. 2009, 69(2):547-553.
- 18 Maris JM, Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. J. Clin Oncol. 1999, 17(7): 2264-79.
- 19 Bagatell R, Beck-Popovic M, London WB, Zhang Y, Pearson ADJ, Matthay DD, Monclair T, Ambros PF e Cohn SL. Significance of *MYNC* Amplification in International Neuroblastoma Staging System Stage 1 and 2 Neuroblastoma: A report From the International Neuroblastoma Risk Group Database. J Clin Oncol. 2009, 27 (3): 365-370.
- 20 Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B. Terminology and Morphologic Criteria of Neuroblastic Tumors. Recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. Cancer. 1999, 86(2): 349-363.
- 21 Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machim D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V e Matthay KK. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report. J Clin Oncol. 2008, 27(2):289-297.
- 22 Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP. The International Neuroblastoma Pathology Classification. Câncer. 1999, 86(2): 364-372.

- 23 Sung KW, Yoo KH, Koo HH, Kim JY, Cho EJ, Seo YL, Kim J e Lee SK. Neuroblastoma Originating from Extra-abdominal Sites: Association with Favorable Clinical and Biological Features. *J Korean Med Sci.* 2009, 24:461-467.
- 24 Mora J, Gerald WL, Quin J, Cheung N-KV. *Câncer.* 2002, 94(10):2756-65.
- 25 Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Ichara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: Na INRG Task Force Report. *J Clin Oncol.* 2009. 27(2): 289-297.
- 26 Navarro S, Amann G, Beiske K, Cullinane CJ, D'Amore ESG, Gambini C, Mosseri V, Bernardi BD, Michon J, Peuchmaur M. *J Clin Oncol.* 2006, 24(4): 695-99.
- 27 Rilley RD, Burchill SA, Abrams KR, et al. Tumour markers in neuroblastoma. In: A systematic review and evaluation of use of tumour markers in pediatric oncology: Ewing's Sarcoma and neuroblastoma. *Health Technology Assessment .York, UK: Queen's Printer and Controller of HMSO.* 2003, 7(5):21-57
- 28 Cartum J, Cristófani LM, Bendit I, Filho VO. Aspectos clínicos, terapêuticos e variáveis de prognóstico em crianças maiores de um ano portadoras de neuroblastoma não disseminado. *Pediatria (São Paulo).* 2004, 26(3): 159-71.
- 29 Strachan T, Read AP. Genética do câncer. In: *Genética molecular humana.* 2a. Edição. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda; 2002. p.427-44.
- 30 Garay HM, Alves J, Ochiucci JM, Belizário JE. Degradação seletiva de proteínas e suas Implicações no Câncer. Papel do sistema ubiquitina-proteasoma e enzimas caspases. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* 2003, 30: 60-70.
- 31 Rudolph P, Lappe T, Hero B, et al. Prognostic significance of the proliferative activity in neuroblastoma.1997, *AJP* 150(1): 133-44.
- 32 Soares FD. Avaliação da expressão das proteínas p53, Bcl2 e antígeno de proliferação celular Ki67 em lesões hiperplásicas, cancerizáveis e carcinomas de células escamosas bucais. [Dissertação]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2005. 223 p. Mestrado em Patologia Buco-Dental.
- 33 Tortelli Júnior TC. Avaliação do papel de proibitina no desenvolvimento de resistência à cisplatina em linhagens de melanoma humano. [Dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008. 106p. Mestrado em Ciências.
- 34 Bernardi A. Nanocápsulas contendo indometacina: avaliação dos efeitos antitumoral, neuroprotetor e antiinflamatório. [Tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009. 169p. Doutorado em Bioquímica.

- 35 Brignole C, Marimpietri D, Pastorino F, et al. Effect of bortezomib on human neuroblastoma cell growth, apoptosis, and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2006, 98(16): 1142-57.
- 36 Piccoli FS. Componente blastematoso do tumor de Wilms: comparação entre sensibilidade e resistência à quimioterapia. [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente. 2005. 96p. Mestrado em Ciências.
- 37 MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO reports.* 2004, 5(7): 674-78.
- 38 Anazetti MC, Melo PS. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa.* 2007, 1(1): 37-58.
- 39 Kurek AG. Efeitos do agente antiproliferativo de origem marinha ET-743 sobre o ciclo celular, apoptose e conteúdo de proteína Hsp 70 em culturas de glioma humano. [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005. 85p. Mestrado em Bioquímica.
- 40 Batista JJ. Análise morfológica e de expressão de genes na apoptose induzida pelo vírus de doença de Gumboro.[Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2007. 75p. Doutorado em Patologia. Área de concentração: Patologia Geral.
- 41 Westphal S, Kalthoff H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer. *Mol Cancer.* 2003, 2:6 .
- 42 Morel C. Etudes de la regulation de la sulfhydryl oxydase QSOX1 et de son implication dans l'apoptose induite par les stress oxydants. [Thèse] Besançon: Université de Franche-Comté e UFR des Sciences et techniques de Besançon. 2007. 214fls. Doctorat de L'Université de France-Comté.
- 43 Thorpe C, Hooper KL, Raju S, et al. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002, 405:1-12.
- 44 Morel C, Adami P, Musard J-F, Duval D, Radom J, Jouvenot M. Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 2007, 313:3971-3982.
- 45 Chakravarthi S, Jessop CE, Willer M, Stirling CJ, Bulleid NJ. Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1. *Biochem. J.* 2007 404:403-411.
- 46 Inaba K. Structural basis of protein disulfide bond generation in the cell. *Genes to Cells.* 2010, 15:935-943.

- 47 Heckler EJ, Rancy PC, Kodali VK, Thorpe C. Generating disulfides with the quiescin sulfhydryl oxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2008 1783(4): 567-577.
- 48 Margittai E, Sitia R. Oxidative Protein Folding in the Secretory Pathway and Redox Signaling Across Compartments and Cells. *Traffic*. 2011 12:1-8.
- 49 Malinouski M, Zhou Y, Belousov VV, Hatfield DL, Gladyshev VN. Hydrogen Peroxide Probes Directed to Different Cellular Compartments. *Plos One*. 2011 6(1):1-10.
- 50 Heckler EJ, Alon A, Fass D, Thorpe C. Human Quiescin-Sulfhydryl Oxidase, QSOX1: Probing internal Redox Steps by Mutagenesis. *Biochemistry*, 2008, 47(17): 4955-4963.
- 51 Thorpe C, Coppock DL, Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family. *J. Biol. Chem*. 2007. 282 (19): 13929-33.
- 52 Benayoun B, Èsnard-Fève D, Castella S, et al. Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase. *J. Biol. Chem*. 2001, 276:13830-37.
- 53 Hooper KL, Joneja B, White HB, et al. A Sulfhydryl oxidase from chicken egg white. *Biol. Chem*. 1996, 271:30510-16.
- 54 Hooper KL, Glynn NM, Burnside J, et al. Homology between egg white sulfhydryl oxidase and quiescin Q6 defines a new class of flavin-linked sulfhydryl oxidases. *J. Biol. Chem*. 1999, 274:31759-62.
- 55 Coppock DL, Kopman D, Scandalis S, et al. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. *Cell Growth Differ*. 1993, 4:483-93.
- 56 Coppock DL, Cina-Poppe D, Gilleran S, et al. The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1. *Genomics*. 1998, 54:460-68.
- 57 Wittke I, Wiedemeyer R, Pillman A, et al. Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase/quiescin6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 2003, 15:7742-52.
- 58 Hoshijima K, Metherall JE, Grunwald DJ, et al. A protein disulfide isomerase expressed in the embryonic midline is required for left/right asymmetries. *Genes Dev*. 2002,16: 2518-29.
- 59 Silva TFA. A expressão de proteínas de proliferação e diferenciação celular em cardiomiócitos durante a transição da circulação fetal a vida extra-uterina. [Tese]. Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2009. 82 fls. Doutorado em Ciências da Saúde.

- 60 Lázcoz P, Muñoz J, Nistal M, et al. Loss of heterozygosity and microsatellite instability on chromosome arm 10q in neuroblastoma. *Cancer Genetic Cytogenet.* 2007, 174(1):1-8.
- 61 Nagata Y, Lan KH, Zhou X, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell.* 2004, 6: 117-27.
- 62 Guha M, Altieri DC. Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks. *Cell Cycle.* 2009, 8(17): 2708-14.
- 63 Zhou Y, Hess KR, Liu L, et al. Modeling prognosis for patients with malignant astrocytic gliomas: Quantifying the expression of multiple genetic markers and clinical variables. *Neuro Oncol.* 2005, p. 485-95.
- 64 Lu T, Chang J, Liang C, et al. Tumor spectrum, tumor latency and tumor incidence of the Pten-deficient mice. *PLoS One.* 2007, 2(11): 1237.
- 65 Knobbe CB, Merlo A, Reifenberger G. Pten signaling in gliomas. *Neuro Oncol.* 2002, 4(3):196-211.
- 66 Terzian ACB, Zuccari DAPC, Pereira RS, et al. Avaliação da caspase-3 e Ki67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.* 2007, 44 (2): 96-102.
- 67 Vieira RP, Ribeiro Júnior U, Alves VA, et al. Correlação das Proteínas p53 e Ki67 com o prognóstico de pacientes com Adenocarcinoma do Reto Distal. *Rev Bras Colo-proctol.* 2000, 20(4): 248-56.
- 68 Scholzen T, Gerdes J. The Ki67 Protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 2000, 182:311-22.
- 69 Isolan G. R., Relação ente Imunomarcção das Proteínas Ki67 E p53 com Grau de Malignidade Variante Histológica em Neoplasias Astrocíticas. [Tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2004. 84 fls. Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde.
- 70 Raguénez G, Mühlethaler-Mottet A, Méier R, et al. Fenretinide-induced caspase 8 activation and apoptosis in an established model of metastatic neuroblastoma. *BMC Câncer.* 2009, 9(97): 1-13.
- 71 Balassiano KZ. Estudo comparativo da expressão Imuno-histoquímica das proteases Bcl2, p53, caspase-3 e Ki67 em hiperplasias fibrosas inflamatórias, queilites actínicas e carcinomas de células escamosas no lábio inferior. [Dissertação] Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2004. 244 fls. Mestrado em patologia. Área de concentração: patologia buco-dental.

- 72 Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte celular por apoptose. Rev. bras. cancerol. 2007, 53(3): 335-43.
- 73 Faria MHG, Patroínio RMSV, Filho MOM, et al. Expressão das proteínas Bcl2 e Bax em tumores astrocíticos humanos. J Brás Patol Méd Lab. 2006, 42(4): 271-78.
- 74 Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, Ayala F, Sato Y, Ferreira SS, Nascimento CF, Soares FA. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. J Brás Patol Méd Lab. 2007, 43(1):55-60.
- 75 Singh A, Sal AK. Tissue Microarray: A powerful and rapidly evolving tool for high-throughput analysis of clinical specimens. IJCRI. 2010, 1(1):1-6.
- 76 Monnerat ALC, Caldas MLR, Pires ARC. Validação de construção de tissue microarray para estudo de displasia intraepitelial tubular renal. J Bras Patol Méd Lab. 2010, 46 (6):471-478.
- 77 Matos LL, Machado LN, Sugiyama MM, Bozzetti RM, Pinhal MA. Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. 2005, 30(1):19-25.
- 78 <http://genetica.ufcspa.edu.br/biomedic/conteudo/citogenetica/03tecnicascitogeneticas.PDF>
- 79 Naoum PC. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. 2001, 23(2):15-23.
- 80 Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Câncer na criança e no adolescente no Brasil. Dados dos registros de base populacional e de mortalidade. Rio de Janeiro: SOBOPE/INCA; 2008.
- 81 INCA, Instituto Nacional de Câncer / Ministério da Saúde. Estimativas/2010. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. 2009
- 82 Ferreira RM. Tumores do sistema nervoso central: fatores prognósticos relacionados à sobrevida em crianças e adolescentes em duas coortes. [Tese]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz;1999.183fls. Doutorado em Saúde Pública.
- 83 Instituto Ronald Mcdonald. Diagnóstico precoce do câncer na criança e no adolescente. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde/ Instituto Nacional de Câncer (INCA); 2009.
- 84 Werner B, Campos AC. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica. J Brás Patol Lab. 2005, 41(5): 353-64.
- 85 Alves MTS, Roman LCM. Estudo do efeito de distintos períodos de fixação em formalina e métodos de recuperação antigênica na técnica de imuno-histoquímica. J Bras Patol Lab. 2005, 41(1): 43-49.

- 86 Barra MB. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. *Revista da AMRIGS*. 2006, 50(2): 173-84.
- 87 Saikia B, Gupta K, Saikia UN. The modern histopathologist: in the changing face of time. *Diagn Pathol*. 2008, 3(25): 1-5.
- 88 Krajewski S, Krajewska M, Ehrmann J, et al. Immunohistochemical analysis of Bcl2, Bcl-X, Mcl-1, and Bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. *AJP*. 1997, 150(3): 805-14.
- 89 Coelho J. Avaliação da caspase-3 e Ki67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci*. 2007, 44 (2): 96-102.
- 90 Mireskandari M, Shafaii AF, Kayser G, et al. Lack of CD 117 and rare Bcl2 expression in stomach cancer by immunohistochemistry. An immunohistochemical study with review of the literature. *Diagn Pathol*. 2006, 1(7): 1-8.
- 91 Vieira FLD, Vieira B, Guimarães MAM, et al. Cellular profile of the peritumoral inflammatory infiltrate in squamous cells carcinoma of oral mucosa: Correlation with the expression of Ki67 and histologic grading. *BMC Oral Health*. 2008, 8(25):1-8.
- 92 Kim D-K, Kim D-W, Kim S-W, et al. Ki67 antigen as a predictive factor for prognosis of sinonasal mucosal melanoma. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2008, 1(4): 206-10.
- 93 Zheng Y, Wang L, Zhang J-P, et al. Expression of p53, c-erbB and Ki67 in intestinal metaplasia and gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2010, 16(3): 339-44.
- 94 Tissel LE, Oden A, Muth A, et al. The Ki67 index a prognostic marker in medullary thyroid carcinoma. *British Journal of Cancer*, 2003, 89(11): 2093-97.
- 95 Dowsett M, A'Hern R, Salter J, et al. Who would have thought a single Ki67 measurement would predict long-term outcome? *Breast Cancer Res*. 2009, Suppl.3:S15.
- 96 Korja M, Finne J, Salmi TT, et al. Chromogenic in situ hybridization detected hotspot *MYCN* amplification associates with Ki67 expression and inversely with nestin expression in neuroblastomas. *Mod Pathol* 2005, 18(12):1599-605.
- 97 Graham D, Magee H, Kierce B, et al. Evaluation of Ki67 reactivity in neuroblastoma using paraffin embedded tissue. *Pathol Res Pract*. 1995, 191(2): 87-91.
- 98 Lai J-P, Daltme JT, Knoell DL. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN) as a molecular target in lung epithelial wound repair. *Br J Pharmacol*. 2007, 152(8):1172-84.

- 99 Saala LH, Johanssonc P, Holmb K, et al. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104(18): 7564-69.
- 100 Broch MCJ. Vias de sinalização celular ativadas por receptores porinérgicos em astrócitos normais e gliomas. [Tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.126 fls Doutorado em Bioquímica.
- 101 Wen S, Stolarov J, Myers MP, et al. PTEN controls tumor-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, 98(8): 4622-27.
- 102 Maccario H, Perera NM, Davidson L, et al. PTEN is destabilized by phosphorylation on Thr³⁶⁶. *Biochem. J*. 2007, 405: 439-44.
- 103 Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JFM, et al. PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis*. 2007, 28(7): 1379-86.
- 104 Perona R, Sánchez-Pérez I. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Br J Cancer*. 2004. 90 (3): 573-77.
- 105 Hollander MC, Baolgh AR, Liwanag J, et al. Straim-specific spontaneous and NNK-mediated tumorigenesis in Pten+/-Mice. *Neoplasia*. 2008, 10(8): 866-72.
- 106 Fraser MM, Bayazitov IT, Zakharenko SS, et al. Pten deficiency in brain causes defects in synaptic structure, transmission and plasticity, and myelination abnormalities. *Neuroscience*. 2008, 151(2): 476-88.
- 107 Pelizzari JV. Presença e atividade da proteína quiescina sulfidril oxidase no soro fetal e neonatal. [Dissertação]. Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2005. 23 fls. Mestrado em Ciências da Saúde.
- 108 Ikegami CM. Produção de bioferramentas para o estudo das proteínas semaforina 5B e QSOX. [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006. 107 fls. Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
- 109 Amiot C, Musard JF, Hadjiyiassemis M, et al. Expression of the secreted FAD-dependent sulfhydryloxidase (QSOX) in the guinea pig central nervous system. *Mol Brain Res*. 2004, 125:13-21.
- 110 Cline DJ, Thorpe C, Schneider JP. Structure-based of a fluorimetric redox active peptide probe. *Anal Biochem*. 2004, 325(1):144-50.
- 111 Bardwell JCA. The dance of disulfide formation. *Nat Struct Mol Biol*. 2004, 11(7): 582-83.
- 112 Morel c, Adami P, Musard JF, et al. Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res*. 2007, 313(19):3971-82.

- 113 Haddad JJ. Oxygen – sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir. Res.* 2002, 3(26):1-27.
- 114 Coppock D, Kopman C, Scandalis S, et al. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. *Cell Growth Differ.* 1991, 4:483-91.
- 115 Pevny L, Placzek. SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol.* 2005, 15(1):7-13.
- 116 Radom J, Colin D, Thiebault F, et al. Identification and expression of a new splicing variant of FAD-sulfhydryl oxidase in adult rat brain. *Biochim et Biophys Acta.* 2006, 1759: 225-33.
- 117 Tury A, Mairet-Coello G, Lisowsky T, et al. Expression of the sulfhydryl oxidase ALR (Augmenter of Liver Regeneration) in adult rat brain. *Brain Res.* 2005, 1048: 87-97.
- 118 Heckler E J, Rancy PC, Kodali VK, et al. Generating disulfides with the quiescin-sulfhydryl oxidases. *Biochim et Biophys Acta.* 2008, 1783(4):567-77.
- 119 Tury A, Mairet-Coello G, Poncet F, et al. QSOX. Sulfhydryl oxidase in rat adenohypophysis: localization and regulation by estrogens. *J Endocrinol.* 2004, 183(2):353-63.
- 120 Coppock DL, Thorpe C. Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. *Antioxid Redox Signal.* 2006, 8 (3-4):300-11.
- 121 Thorpe C, Hooper KL, Raje S, et al. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002, 405:1-12.
- 122 Parikh N, Koshy C, Dhayabaran X, et al. The N-terminus and alpha-5, alpha-6 helices of the pro-apoptotic protein Bax, modulate functional interactions with the anti-apoptotic protein Bcl-XL. *BMC Cell Biology.* 2007, 8(16):1-16.
- 123 Brambilla E, Negoescu A, Gazzeri S, et al. Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *AJ P,* 1996,149:1941-52.
- 124 Chan HW, Liu T, Verdile G, et al. Copper induces apoptosis of neuroblastoma cells via post-translational regulation of the expression of Bcl2-family proteins and the tx^l mouse is a better model of hepatic than brain Cu toxicity. *Int J Clin Exp Med.* 2008, (1): 76-88.
- 125 Makin GWJ, Corfe BM, Griffiths GJ, et al. Damage – induce Bax N-terminal change, translocation to mitochondria and formation of Bax dimers/complexes occur regardless of cell fate. *EMBO J.* 2001, 20(22): 6306-15.

126 Ghatan S, Lerner S, Kinoshita Y, et al. P38 MAP kinase mediator Bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis. *The Journal of Cell Biology*. 2000, 150(2):335-47.

127 Subramanian C, Jarzembowski JA, Opipari Jr. et al. CREB – Binding protein via mediator of neuroblastoma cell death induced by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A¹. *Neoplasia*. 2007, 9(6): 495-503

128 Benadiba M. Análise de expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, apoptose, angiogênese, invasão e migração de células C6 in vitro e in vivo após o tratamento com o ácido γ -Linoléico (GLA) e com um novo complexo dirutênico contendo Ibuprofeno (Ru-Ibp). [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008. 160fls. Doutorado em ciências.

129 Chesler L, Goldemberg DD, Collins R, et al. Chemotherapy – Induced apoptosis in a transgenic model of neuroblastoma proceeds through p53 induction. *Neoplasia*. 2008, 10(11):1268-74.

130 Fang J, Gu L, Zhu N, et al. Tissue factor/FVIIa activater Bcl2 and prevents doxorubicin-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *BMC Cancer*. 2008, 8(69):1-11.

131 Cescato VAS. Expressão dos genes relacionados a apoptose, Bcl2, Bax, e caspase – 3 nos adenomas hipofisários clinicamente não funcionantes e seu potencial como marcador do comportamento tumoral. [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2010. 80fls. Doutorado em Ciências.

132 Zimmer AS. Perfil imunohistoquímico das proteínas da família Bcl2 e evolução clínica de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/ Brasil (1996-2004). [Dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007. 197 fls. Mestrado em Ciências Médicas.

133 Loucks FA, Shroeder EK, Zommer AE, et al. Caspases indirectly regulate cleavage of the mitochondrial fusion GTPase OPA1 in neurons undergoing apoptosis. *Brain Res*. 2009, 1250:63-74.

134 Mazunder S, Almasan A. Is caspase 8 a neuroendocrine lung tumor suppressor? *Cancer Biol Ther*. 2002, 1(1):70-71.

135 Barbero S, Mielgo A, Torres V, et al. Caspase 8 association with the focal adhesion complex promoter tumor cell migration and metástases. *Cancer Res*. 2009, 69(9): 3755-63.

136 Li CL, Sheng JR, Mulherkan NN, et al. Regulation of apoptosis and caspase 8 expression in neuroblastoma cells by isoforms of the IG20 Gene. *Cancer Res*. 2008. 68(18):7352-61.

137 Rogers D, Nylander KD, Mi Z, et al. Molecular predictors of human nervous system cancer responsiveness to enediyne chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2008, 62(4):699-706.

138 Ribeiro TC. Análise do número de cópias dos genes *IGF1R*, *SF1* E *FGR4* em tumores adrenocorticais de crianças e adultos. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina de São Paulo (USP); 2010. 94fls. Mestrado em Ciências. Programa de Endocrinologia.

139 Mello MCR. O papel da hibridação in situ por fluorescência (FISH) na leucemia mielóide crônica durante o tratamento com mesilato de imatinibe. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2006, 28(2):81-87.

140 Faria MHC, Rabenhorst SHB. Impacto do onogene C-MYC no câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2006, 52(2): 165-171.

141 Krams M, Heidebrecht H-J, Hero B, Berthold F, Harms D, Panwaresch R, Rudolph P. repp 86 Expression and outcome in patients with neuroblastoma. *J clin oncol.* 2003, 21:1810-18.

142 Bilke S, Chen G-R, Wei JS, Khan J. Whole Chromosome alterations predict survival in high risk neuroblastoma without *MYNC* amplification. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(17):5540-5547.

Anexos

Tabela Geral. Relação entre os resultados dos biomarcadores em valores médios e as variáveis clínico-patológicas do estudo.

Variável	n	Ki67	PTEN	QSOX1	Caspase-8	Bcl2	Bax	
Sexo	Feminino	12	188,78	475,49	58,38	41.668.619,83	4.271,71	32.939.678,76
	Masculino	11	183,76	649,58	48,17	37.843.054,17	5.843,30	25.279.502,44
Idade ao Diagnóstico	≤18 meses	14	153,81	526,37	60,85	38.878.699,41	5.005,19	30.434.898,82
	> 18 meses	09	237,04	609,11	42,07	41.332.804,68	5.133,07	27.473.565,38
Local da lesão	Extra-abdominal	09	197,63	649,93	45,58	38.850.179,00	4.996,59	24.460.117,90
	Abdominal	14	179,14	500,13	58,59	40.474.673,06	5.099,68	32.372.115,06
Estado da Medula Óssea	Negativa	11	189,15	524,29	54,52	<u>++41.411.751,7</u>	4.882,30	32.089.747,91
	Positiva	04	205,17	563,83	48,70	<u>++41.338.283,5</u>	3.921,56	36.510.520,00
Diferenciação da Lesão	Pouco	09	276,00	724,74	43,94	39.761.505,47	5.725,10	37.807.537,58
	Bem	14	128,76	452,04	59,65	39.888.820,33	4.595,33	23.791.630,98
Classificação de Shimada	Favorável	18	146,56	522,81	57,43	39.096.447,3	4.882,79	26.532.881,30
	Desfavorável	5	329,73	688,13	39,36	42.512.196,63	5.651,56	39.151.761,70
Estroma do tumor	Pobre	9	<u>**276,00</u>	<u>***724,74</u>	<u>+43,94</u>	38.518.567,52	5.139,15	42.853.898,15
	Rico	14	<u>**128,76</u>	<u>***452,04</u>	<u>+59,65</u>	39.888.820,33	4.595,33	23.791.630,98
Óbito	Sobrevida 5,45a*	09	192,96	685,11	55,26	43.099.546,44	4.947,69	24.848.126,88
Vivos	Seguimento 1,3a*	14	182,14	477,51	52,36	37.742.936,85	5.133,53	32.122.680,72
Vivo com Recidiva/Doença Residual	Seguimento 3a*	08	155	350,89	64,79	37.161.213,84	5.128,72	24.074.267,64
Vivo sem Recidiva/Doença Residual	Seguimento 3a*	06	218,33	646,32	35,81	38.518.567,52	5.139,15	42.853.898,15

Legenda: As médias do Ki67 e do PTEN estão expressas em número médio de núcleos positivos por campo histológico (em seis campos de grande aumento). As médias da QSOX1, do Bcl2, da Caspase-8 e do Bax estão expressas em área média de positividade (micrômetros quadrados) por campo histológico. (*) = Tempo de seguimento ou de sobrevida (em anos) considerado em cada variável da evolução clínica, se morto, se vivo com recidiva ou se vivo sem recidiva. As diferenças estatisticamente significativas nestas comparações estão em negrito e sublinhadas, sendo que: **++p = 0,035**; ****p = 0,018**; *****p = 0,024**; **+p = 0,054**.

Curitiba, 27 de novembro de 2007.

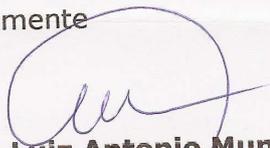
Deli Grace de Barros Araújo
Pesquisadora Responsável

Prezada Senhora,

Comunicamos que o projeto de pesquisa intitulado **Expressão Imunohistoquímica da Quiescina/Sulfidril Oxidase (QSOX) em neuroblastomas e sua correlação com fatores prognósticos**, registro no CEP 0518-07, avaliado em reunião plenária em 26 de novembro de 2007, chegou-se ao seguinte parecer: **foi aprovado**, e está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução 196/96 do Ministério da Saúde.

Lembramos que conforme as normas da CONEP/MS o pesquisador deverá enviar ao CEP relatórios trimestrais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador em caso de relevância. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Atenciosamente



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



ASSOCIAÇÃO HOSPITALAR DE PROTEÇÃO À INFÂNCIA DR. RAUL CARNEIRO
HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE . HOSPITAL DE CRIANÇAS CÉSAR PERNETTA
INSTITUTO DE ENSINO SUPERIOR PEQUENO PRÍNCIPE - IESPP
INSTITUTO PELÉ PEQUENO PRÍNCIPE - Pesquisa em Saúde da Criança e do Adolescente
Atendendo crianças desde 1919

R. Desembargador Motta, 1070 • Água Verde • Curitiba-PR • 80250-060
Tel.: 41 3310-1010 • Fax: 41 3225-2291 • info@hpp.org.br • www.pequenoprincipe.org.br
C.N.P.J.: 76.591.569/0001-30 • Inscrição Estadual: isento • Inscrição Municipal: 04 03 035.943-2

