

**ESTUDO DAS PROTEÍNAS QUE REGULAM A
APOPTOSE NO RETINOBLASTOMA DE
PACIENTES SUBMETIDOS À ENUCLEAÇÃO
OU EXENTERAÇÃO AO DIAGNÓSTICO**

RENATO JOSÉ MENDONÇA NATALINO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra. Célia Beatriz Gianotti Antoneli
Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Natalino, Renato José Mendonça

Estudo das proteínas que regulam a apoptose no retinoblastoma de pacientes submetidos à enucleação ou exenteração ao diagnóstico / Renato José Mendonça Natalino – São Paulo, 2009.

115p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Célia Beatriz Gianotti Antoneli

Descritores: 1. RETINOBLASTOMA. 2. APOPTOSE. 3. PROTEINA SUPRESSORA DE TUMOR p53. 4. PROTEINAS BCL-2 PROTO-ONCOGENICAS. 5. IMUNOHISTOQUÍMICA. 6. CASPASE 3.

DEDICATÓRIA

*À minha esposa Sheila,
minha vida, meu amor...*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Célia Beatriz Gianotti Antoneli pelas orientações, apoio e entusiasmo durante todo o período do mestrado. Suas palavras foram essenciais na elaboração desta dissertação. Seu apoio foi fundamental nos momentos mais difíceis. Seu entusiasmo foi o grande estímulo desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares pelas orientações norteadoras ao longo desta dissertação. Agradeço também pelo seu entusiasmo constante e por disponibilizar toda a estrutura do departamento para a realização do mestrado.

À Dra. Karina de Cássia Ribeiro pela ajuda na estatística e nos ensinamentos sobre método sempre com preciosismo e inteligência.

Ao Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto por participar da banca de qualificação desde a elaboração do projeto até a entrega dos resultados. Seus conselhos e críticas foram muito importantes na elaboração da dissertação.

À Dra. Maristela Amaral Palazzi pela sua participação da banca de qualificação. Foram essenciais suas orientações e críticas ao projeto. A Dra Maristela também foi a principal motivadora desta dissertação. Foi minha primeira orientadora nos estudos sobre o retinoblastoma.

Ao Dr. Antônio Hugo Antônio Hugo José Froes Marques Campos, responsável pela patologia ocular do Departamento de Patologia, pela ajuda e apoio.

A todos os amigos e colegas do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo.

A todos os colegas da pós-graduação, especialmente a Yukie e Luciana pela importante ajuda no trabalho com o ACIS III®.

Aos técnicos José Ivanildo Neves, Sueli Nonogaki, Carlos F. Nascimento e Severino da Silva Ferreira pela perfeição e presteza na construção da TMA e na realização das reações imunoistoquímicas.

Aos funcionários Marcelo e Glauber pela ajuda na separação dos blocos de parafina contendo as amostras.

A equipe do Serviço de Arquivo Médico (SAME), especialmente aos Sr Luis e Sr Luciano pela presteza na separação dos prontuários dos pacientes deste estudo.

Aos Departamentos de Oftalmologia e Pediatria do Hospital A.C. Camargo que fizeram o seguimento destes pacientes.

À secretária da pós-graduação, especialmente à Ana Kurinari e Luciana Pitombeira pelas orientações e paciência.

À todos os colaboradores da Biblioteca, que disponibilizaram os livros e periódicos essenciais na realização deste trabalho. E especialmente à Suely Francisco pela diagramação final deste trabalho

Ao Christopher Mack pela correção dos textos de língua inglesa.

Aos meus amigos Héverton e Andressa pela inestimável amizade.

Aos amigos do setor de Patologia do Laboratório Diagnósticos da América e especialmente aos meus chefes, Dr Antônio C. Alves e Dr Marcelo A. Gianotti.

Aos meus sogros Dorgival e Adélia e minhas cunhadas Michelle e Kelly.

Aos meus pais Geraldo e Márcia e minhas irmãs Marina e Alaide pelo apoio, amor e incondicional compreensão. E aos meus cunhados Nilvan e André. Aos meus afilhados: Jorge, Nicolas e João Francisco. Vocês são a minha maior fortuna.

À minha amada esposa Sheila. A sua beleza, graça, espirituosidade e inteligência foram a minha inspiração. Sem a sua ajuda, seu carinho, sua compreensão e seus conselhos não seria possível a realização desta dissertação.

Ao apoio financeiro concedido pela CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior através do programa de bolsa no ano de 2007 para a realização de parte do projeto de Mestrado.

RESUMO

Natalino RJM. **Estudo das proteínas que regulam a apoptose no retinoblastoma de pacientes submetidos à enucleação ou exenteração ao diagnóstico.** São Paulo; 2009. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O Retinoblastoma é a neoplasia intraocular mais comum na infância e é resultado da inativação parcial ou total dos dois genes do retinoblastoma (RB1). Com os tratamentos utilizados atualmente, há um excelente prognóstico; e os desafios atuais são a preservação da visão e a cura do retinoblastoma que se estende para sistema nervoso central. O estudo das vias de apoptose é fundamental porque muitos dos tipos de tratamentos contemporâneos resultam em apoptose. Bloqueios nesta via podem estar associados à pior prognóstico. CASUÍSTICA E MÉTODOS: as proteínas relacionadas à apoptose foram avaliadas pela imunoistoquímica em plataformas de “tissue microarray” contendo tumores de 93 pacientes sem nenhum tratamento prévio à cirurgia. As reações imunoistoquímicas foram avaliadas tanto pela microscopia óptica quanto pela plataforma ACIS III®. O índice apoptótico foi avaliado pela contagem de células marcadas pela caspase-3 clivada em 1000 células. RESULTADOS: As proteínas pró-apoptóticas foram expressas mais frequentemente do que as proteínas antiapoptóticas. A diminuição da expressão de p53 foi associada à extensão tumoral extraocular. A mediana do índice apoptótico (AI) foi de 0,085. Houve uma tendência a associação entre tumores com $AI > 0,17$ (p75) e um pior prognóstico ($p=0,057$). Extensão extraocular, comprometimento pós lâmina crivosa e da esclera foram associados a pior sobrevida em análise univariada. CONCLUSÃO: As células tumorais parecem estar susceptíveis à apoptose, entretanto não houve correlação entre AI e a intensidade de expressão de proteínas pró-apoptóticas como p53, Bax, PUMA e Smac/DIABLO. A proteína Bcl-x_L apresentou correlação negativa com AI o que pode sugerir que esta proteína tenha um papel central no bloqueio da apoptose e houve uma tendência de associação entre $AI > 0,17$ e pior prognóstico no retinoblastoma.

SUMMARY

Natalino RJM. **[Study of the proteins that regulate the apoptosis in the retinoblastoma of patients who underwent enucleation at diagnosis]**. São Paulo; 2009. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Retinoblastoma is the most common intraocular malignant neoplasia during childhood and is a result of the partial or total inactivity of two copies of the retinoblastoma genes (RB1). Under the treatment currently used, there is a good prognosis, and the current challenges are the preservation of eyesight and the cure of retinoblastoma which spreads to the central nervous system. The study of apoptotic pathways is fundamental because many contemporary forms of treatment result in apoptosis. Blockages in this pathway can be associated with poor prognosis. METHODS: Related apoptosis proteins were evaluated using immunohistochemistry on tissue microarrays which contained samples of tumors taken from ninety-three patients without any treatment previous to surgery. The immunohistochemistry reactions were evaluated using an optical microscope as well as the ACIS III® platform. The apoptotic index was assessed by counting cells marked with cleaved caspase-3 in 1000 cells. RESULTS: The pro-apoptotic proteins were more frequently expressed than the anti-apoptotic proteins. The lower p53 expression was associated with extra ocular tumor extension. The median of the apoptotic index (AI) was 0.085. There was a trend towards the association between tumors presented with AI > 0.17 and poorer survival (p=0.057). Extra ocular extension, scleral and post laminar optic nerve involvement were associated with poor survival in a univariate analysis. CONCLUSIONS: The tumor cells seemed to be susceptible to apoptosis, but there was no correlation between AI and the intensity of pro-apoptotic protein expression, such as p53, Bax, PUMA and Smac/DIABLO. The protein Bcl-x_L had a negative correlation with AI. Then, Bcl-x_L could be implicated in the apoptosis block. Also, there was an association tendency between AI > 0.17 and a poorer prognosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tipos de estruturas observadas em retinoblastomas e retinomas.....	4
Figura 2	Foto de microscopia eletrônica demonstrando um “fleurette”.....	5
Figura 3	Fotomicroscopia de rosetas e “fleurettes”.....	6
Figura 4	Características do segundo evento somático em pacientes com tumores germinativos.....	14
Figura 5	Vias moleculares onde a ausência de pRb pode levar à apoptose através da liberação de E ₂ F.....	17
Figura 6	Diagrama do modo de ação da proteína Bcl-x _L	19
Figura 7	p53 pode induzir tanto parada do ciclo celular quanto apoptose.....	26
Figura 8	M.E. e fotomicroscopia das células do retinoblastoma viáveis, necróticas e apoptóticas.....	32
Figura 9	Fotografia de lâmina obtida da plataforma de “tissue microarray” submetidas à reações imunoistoquímicas.....	41
Figura 10	Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de p53.....	54
Figura 11	Expressão de p53, PUMA e Bax em áreas com hipóxia.....	54
Figura 12	Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de Bax.....	54
Figura 13	Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de PUMA.....	56

Figura 14	Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de Bak.....	56
Figura 15	Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de Bim _{LONG}	56
Figura 16	Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de Smac/DIABLO....	57
Figura 17	Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de APAF-1.....	57
Figura 18	Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de pró-caspase-3.....	57
Figura 19	Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de Bcl-x _L	58
Figura 20	Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de Bcl-2.....	58
Figura 21	Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de MDM2.....	58
Figura 22	Curva ROC demonstrando a comparação entre as medidas do ACIS III® e as medidas da microscopia óptica.....	63
Figura 23	Fotomicroscopia de reação imunoistoquímica para caspase-3 clivada.....	67
Figura 24	Distribuição dos valores do índice apoptótico medido.....	68
Figura 25	Correlação entre expressão de Bcl-x _L e caspase-3 clivada.....	71
Figura 26	Fotomicroscopia demonstrando a expressão das proteínas relacionadas à apoptose estudadas no retinoma.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais estudos que quantificaram a apoptose no retinoblastoma.....	33
Tabela 2	Anticorpos utilizados, clones e origem em relação às proteínas controladoras da apoptose.....	43
Tabela 3	Gradação da reação imunoistoquímica de acordo com a intensidade.....	43
Tabela 4	Gradação da reação imunoistoquímica de acordo com o número de células coradas.....	44
Tabela 5	Características demográficas e clínicas.....	48
Tabela 6	Estadiamento clínico e anátomo patológico do retinoblastoma.....	49
Tabela 7	Seguimento dos pacientes.....	50
Tabela 8	Análise univariada de sobrevida segundo variáveis clínicas e demográficas.....	51
Tabela 9	Análise univariada da sobrevida segundo variáveis anátomo patológicas.....	52
Tabela 10	Expressão à imunoistoquímicas das proteínas avaliadas por microscopia óptica.....	59
Tabela 11	Expressão imunoistoquímica das proteínas de expressão citoplasmática avaliadas na plataforma ACIS III®.....	60

Tabela 12	Expressão imunoistoquímica das proteínas de expressão nuclear avaliadas na plataforma ACIS III®.....	60
Tabela 13	Comparação das áreas sob a curva ROC para cada marcador citoplasmático e escolha do ponto de corte baseado no ponto da curva ROC mais próximo do ponto (0,1).....	62
Tabela 14	Comparação das áreas sob a curva ROC dos marcadores imunoistoquímicos de padrão nuclear.....	63
Tabela 15	Índice kappa de concordância entre os valores obtidos na microscopia óptica e os valores obtidos através da estratificação dos resultados obtidos no ACIS III® para os marcadores citoplasmáticos.....	65
Tabela 16	Índice kappa de concordância entre os valores obtidos na microscopia óptica e os valores obtidos através da estratificação dos resultados obtidos no ACIS III® para os marcadores nucleares.....	66
Tabela 17	Índice Apoptótico.....	67
Tabela 18	Correlação de AI e medidas da caspase 3 clivada feitas no ACIS III®.....	69
Tabela 19	Correlação entre caspase 3 clivada e proteínas relacionadas à apoptose.....	70
Tabela 20	Correlação entre expressão de p53 com a expressão das demais proteínas.....	72
Tabela 21	Verificação de associação entre índice apoptótico e extensão tumoral.....	72

Tabela 22	Expressão imunoistoquímica e extensão tumoral.....	73
Tabela 23	Extensão tumoral e a expressão imunoistoquímica medida no ACIS III®.....	74
Tabela 24	Sobrevida segundo as medidas semi quantitativas feitas através da microscopia óptica.....	75
Tabela 25	Sobrevida global segundo as medidas obtidas na plataforma ACIS III®.....	77
Tabela 26	Análise univariada de sobrevida segundo o índice apoptótico.....	78

LISTA DE ABREVIACÕES

AI	índice apoptico
APAF-1	“apoptotic activation factor-1”
Bak	“Bcl-2 homologous antagonist/ killer”
Bax	“Bcl-2–associated X protein”
Bcl-2	“B-Cell Lymphoma/Leukemia-2”
Bcl-x_L	“B-Cell Lymphoma/Leukemia-x large”
BH3	“Bcl-2 homology domain”
Bim	“Bcl-2 interacting mediator of cell death”
Bim_{EL}	“Bcl-2 interacting mediator of cell death extra long”
Bim_L	“Bcl-2 interacting mediator of cell death long”
Bim_S	“Bcl-2 interacting mediator of cell death short”
Caspase	“cysteine-aspartic-acid-proteases”
CCSG	“Children Cancer Study Group”
DIABLO	“Direct IAP Binding Protein with low isoelectric point”
DNA	“Deoxyribonucleic acid”
DP	desvio padrão
EGFR	“Epidermal Growth Factor Receptor”
H&E	coloração de hematoxilina & eosina
HIF	“Hypoxia inducible transcription factor”
IAP	inibidores de apoptose (ou “inhibitor of apoptosis protein family”)
IL-3	interleucina-3
ISEL	“in situ end-labeling technique”
MDM2	“murine double minute – 2”
M.E.	microscopia eletrônica
NO	xido ntrico
p53	proteína 53 ou “tumor protein 53”
pRb	proteína Rb
PUMA	“p53 upregulated modulator of apoptosis”
Rb1	genes do retinoblastoma

rNTP	ribonucleotídeos trifosfato
SG	sobrevida global
Smac	“Second mitochondria-derived activator of caspases”
ROC	curva “Receiver operating characteristic”
TMA	“tissue microarray”
TNF-1	“tumoral necrosis factor-1”
TNM	Classificação de Tumores Malignos TNM (T descreve o tamanho do tumor; N, linfonodo regional; e M, metástases)
TTT	termoterapia transpupilar
TUNEL	“terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling”
VEGF	“Vascular endothelial growth factor”

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Epidemiologia.....	1
1.2	Apresentação Clínica.....	2
1.3	Aspectos Anátomo-Patológicos.....	2
1.4	Terapêutica do Retinoblastoma.....	7
1.5	Estadiamento.....	10
1.6	Prognóstico do Retinoblastoma.....	11
1.7	O Modelo de Knudson.....	12
1.8	Gene do Retinoblastoma.....	14
1.9	A proteína Retinoblastoma (pRb).....	15
1.10	Apoptose.....	16
1.10.1	Definição, funções e mecanismos.....	16
1.10.2	Moléculas envolvidas na apoptose.....	20
1.10.3	Métodos de detecção da apoptose.....	30
2	OBJETIVOS E HIPÓTESES.....	35
2.1	Objetivos.....	35
2.2	Hipóteses.....	35
2.3	Objetivos <i>post hoc</i>	36
2.4	Hipóteses <i>post hoc</i>	36
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	37
3.1	Seleção das Amostras.....	37
3.2	Coleta de dados no prontuário.....	37
3.3	Avaliação histológica.....	38
3.4	Confecção da “Tissue Array”.....	39
3.5	Imunoistoquímica.....	41
3.6	Análise Estatística.....	44
3.7	Comissão de ética.....	45

4	RESULTADOS.....	46
4.1	Características dos pacientes incluídos no estudo.....	46
4.2	Análise univariada de sobrevida a partir dos dados clínicos e anátomo- patológicos.....	51
4.3	Imunoistoquímica.....	52
4.4	Comparação dos resultados da avaliação pela microscopia óptica e das medidas obtidas pelo ACIS III®.....	61
4.5	Índice Apoptótico e a expressão de Caspase-3 clivada.....	66
4.6	Correlação entre as medidas quantitativas do índice apoptótico e as medidas da caspase-3 clivada realizadas no ACIS III®.....	68
4.7	Correlação entre as medidas de expressão feitas pelo ACIS III® e o índice apoptótico.....	69
4.8	Verificação de associação entre o índice apoptótico e a extensão tumoral.....	72
4.9	Verificação de associação entre a expressão imunoistoquímica e a extensão tumoral.....	73
5	DISCUSSÃO.....	79
6	CONCLUSÕES.....	97
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

ANEXOS

Anexo 1 Classificação de REESE-ELLSWORTH

Anexo 2 ABC – CLASSIFICAÇÃO DE MURPHREE

Anexo 3 Classificação do CCSG-962

Anexo 4 Proposta de classificação do Retinoblastoma

Anexo 5 Dados clínicos, epidemiológicos, histopatológicos e
imunistoquímicos

Anexo 6 Protocolo de Imunoistoquímica

1 INTRODUÇÃO

Retinoblastoma é a neoplasia maligna que se origina de células embrionárias da retina. Estudos imunoistoquímicos, ultraestruturais e moleculares, além das características histopatológicas, corroboram o conceito de que o retinoblastoma surge de células totipotentes (DYER e BREMNER 2005).

1.1 EPIDEMIOLOGIA

É a neoplasia intraocular maligna mais freqüente na infância. Sua incidência é de aproximadamente 1:18000 nascidos vivos (DEVESA 1975) e tem havido poucas alterações nesta taxa nas últimas décadas (TAMBOLI et al. 1990). Acomete principalmente crianças entre o nascimento e 5 anos de idade embora também possa ocorrer em crianças mais velhas (DE AGUIRRE NETO et al. 2007) e até mesmo adultos (ODASHIRO et al. 2005). No Brasil, os dados do Registro de Câncer de Base Populacional apresentam uma incidência de 0,61/100.000 para o sexo masculino em São Paulo, e de 0,60/100.000 para o sexo feminino em Fortaleza (Ministério da Saúde 2003). Também não há evidências de diferenças na incidência entre raças, embora pareça ocorrer diferenças importantes na incidência entre países, com países em desenvolvimento na América Latina, África e Ásia apresentando maior incidência (HURWITZ et al. 2002).

1.2 APRESENTAÇÃO CLÍNICA

A apresentação clínica do retinoblastoma depende do tamanho e da localização do tumor. O principal sinal é a leucocoria. Outras freqüentes apresentações são: proptose, estrabismo, glaucoma e perda da visão. Endoftalmite, uveíte, hifema espontâneo, heterocromia de íris, anisocoria, neovasos de íris, deposição de tumor na íris e no cristalino são apresentações pouco freqüentes do retinoblastoma (BINDER 1974; BALASUBRAMANYA et al. 2004). Em tumores metastáticos ao diagnóstico, a sintomatologia depende do órgão ou tecido acometido (GUNDUZ et al. 2006).

Os Retinoblastomas podem ser classificados como: germinais ou esporádicos. Os pacientes portadores de tumores germinais geralmente apresentam retinoblastomas bilaterais ou unilaterais multifocais, enquanto os pacientes portadores de esporádicos apresentam tumores únicos e unilaterais. Ao diagnóstico, a média de idade dos pacientes com tumores germinais é de 12 meses, enquanto nos pacientes com tumores esporádicos é de 24 meses (AUGSBURGER et al. 2004).

1.3 ASPECTOS ANÁTOMO-PATOLÓGICOS

Macroscopicamente, o retinoblastoma pode apresentar diferentes padrões de crescimento. Retinoblastomas com padrão endofítico são tumores friáveis que crescem em direção ao corpo vítreo e podem apresentar inúmeras sementes vítreas. Os de padrão exofítico crescem em direção à coróide, acometendo primeiro o espaço subretiniano causando descolamento de retina, e depois ultrapassando a membrana

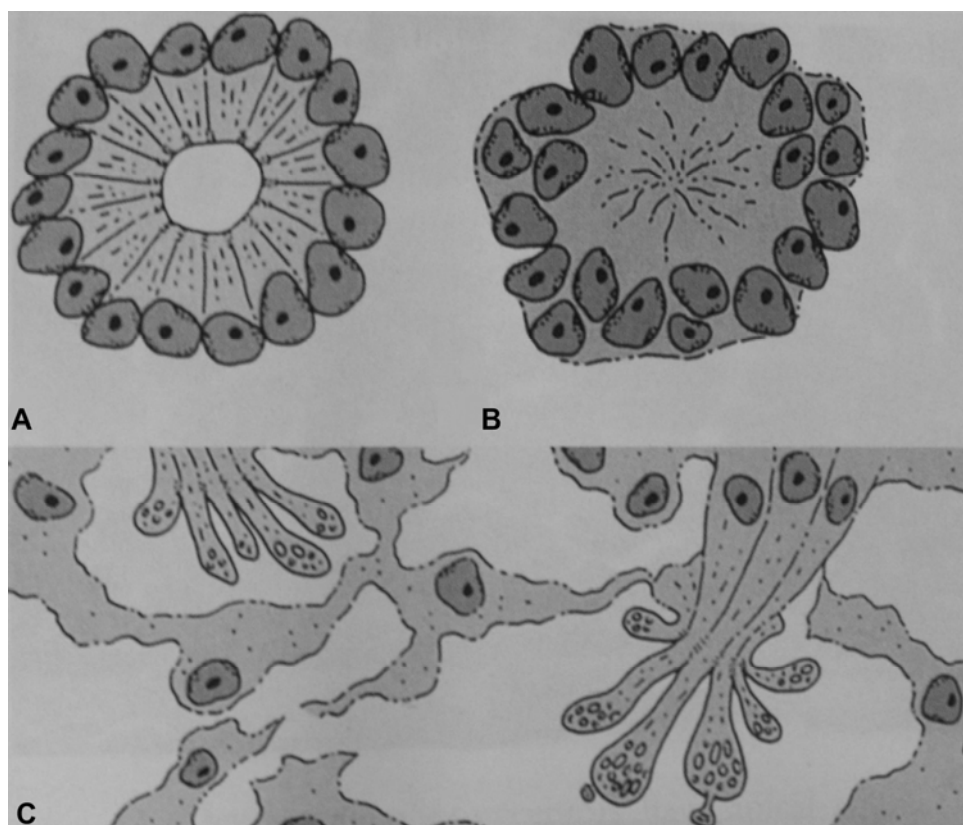
de Bruch e invadindo a coroide. Há ainda um padrão de crescimento mais raro que é o difuso, que causa espessamento da retina sem calcificações (BHATNAGAR e VINE 1991). Não parece haver importantes diferenças na evolução entre os retinoblastomas exofíticos e endofíticos, exceto que os tumores exofíticos apresentem maior taxa de invasão da coroide (PALAZZI et al. 1990). Contudo, um retinoblastoma de padrão difuso geralmente apresenta estadiamento mais avançado à enucleação (BHATNAGAR e VINE 1991).

Microscopicamente, o retinoblastoma é composto de células com um núcleo grande e basofílico, e citoplasma escasso. Apresenta áreas de necrose, inúmeras figuras de mitose e de apoptose. Há também calcificações que são vistas em áreas de necrose tumoral. Se a necrose é extensa, as células necróticas podem liberar seu DNA que se apresenta como um material basofílico na parede dos vasos sanguíneos.

A vascularização é proeminente, e cada vaso sanguíneo é circundado por um manguito de células viáveis. As células tumorais localizadas em uma distância maior que 90-110 micrometros podem sofrer necrose ou apoptose (MCLEAN et al. 1994). A quantificação da área vascular representa um fator prognóstico independente de fatores de evolução clássicos como invasão do nervo óptico e invasão da coroide, provavelmente porque a capacidade de recrutamento de vasos pelo tumor está relacionada à sua progressão (MARBACK et al. 2003).

A formação de rosetas é uma das características histológicas mais conhecidas do retinoblastoma (Figura 1). A roseta de Flexner-Wintersteiner é composta por células cuboidais que circundam um lúmen apical que contém mucopolissacarídes ácidos resistentes à hialuronidase de forma similar aos mucopolissacarídes existentes próximos a bastonetes e cones (MCLEAN 1996). Os “fleurettes” apresentam

diferenciação para fotorreceptor que lembram os segmentos internos dos cones. A Figura 2 apresenta as características ultraestruturais dos “fleurettes” com acúmulo de mitocôndrias nas suas projeções. As rosetas de Homer-Wright se assemelham às rosetas de Flexner-Wintersteiner, mas não apresentam lúmen (FONT et al. 2006). A Figura 3 demonstra o aspecto das rosetas e “fleurettes” nas colorações habituais.



Legenda: **A** – Roseta de Flexner-Wintersteiner; **B** - Roseta de Homer-Wright; **C** - “fleurettes”

Fonte: Adaptado de YANOFF e FINE (2002).

Figura 1 - Tipose de estruturas observadas em retinoblastomas e retinomas.

A quantificação da formação de rosetas está relacionada ao grau de diferenciação dos retinoblastomas, sendo adotada a classificação de bem, moderadamente e pouco diferenciado dependendo da porcentagem da área onde é observada a formação de rosetas de Flexner-Wintersteiner. Tumores com mais que

80% da área com formação destas rosetas são classificados como bem diferenciados, enquanto os que não apresentam formação de rosetas são classificados como pouco diferenciados; e os intermediários como moderadamente diferenciados. A diferenciação do retinoblastoma parece não ter importância prognóstica (KHELFAOUI et al. 1996) embora os estudos iniciais demonstrassem que os retinoblastomas pouco diferenciados apresentavam pior evolução (ANDERSEN 1971). No entanto, SCHOUTEN-VAN MEETEREN et al. (2001) demonstraram que os tumores pouco diferenciados têm maior sensibilidade *in vitro* a quimioterápicos tais como a carboplatina, doxorubicina e ifosfamida.

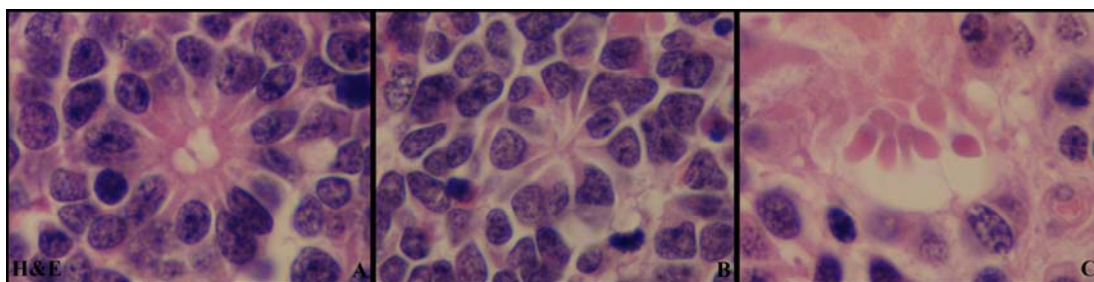


Legenda: fotomicroscopia eletrônica de um “fleurette”. Observar as inúmeras mitocôndrias (m) no ápice da estrutura.

Fonte: Adaptado de YANOFF e FINE (2002)

Figura 2 - Foto de microscopia eletrônica demonstrando um “fleurette”.

A principal forma de progressão do retinoblastoma é através do nervo óptico onde as células tumorais se espalham entre as fibras nervosas e infiltram o espaço subaracnoide através da pia-mater. Desta forma, um dos principais fatores prognósticos do retinoblastoma é o status do nervo óptico à enucleação (KHELFAOUI et al. 1996).



Legenda: Coloração de H&E: **A** – Roseta de Flexner-Wintersteiner; **B** - Roseta de Homer-Wright; **C** - “fleurettes”

Figura 3 - Fotomicroscopia de rosetas e “fleurettes”.

Em relação à invasão da coroide, há inúmeras formas de classificar e interpretar os achados histológicos. Em diferentes serviços, o conceito de invasão difusa da coroide pode variar desde: a invasão tem que ser maior que 3 mm; apresentar mais que 3 focos; invadir mais que 50% da espessura da coroide ou ter que invadir toda a espessura da coroide até tocar a esclera (CHANTADA et al. 2008). Entretanto, a maioria dos autores concorda que a invasão da coroide também é fator de pior prognóstico. KHELFAOUI et al. (1996), demonstraram que 7% dos pacientes tiveram recaídas da neoplasia no grupo dos pacientes sem invasão da coroide, enquanto cerca de 25% dos pacientes com invasão maciça da coroide recidivaram.

A invasão da câmara anterior é mais frequente nos pacientes com recaída, mas esse fator não foi significativo em uma análise multivariada (KHELFAOUI et al. 1996).

1.4 TERAPÊUTICA DO RETINOBLASTOMA

As modalidades de tratamento são variadas, sendo a mais antiga forma de tratamento a enucleação (ABRAMSON e SCHEFLER 2004), que ainda é utilizada em alguns casos específicos. Entretanto, a enucleação leva a perda definitiva da função visual e por isso houve uma busca por formas de tratamento conservadores do retinoblastoma.

Uma das primeiras opções utilizadas para o tratamento conservador foi a radioterapia externa. É ainda indicada para tumores maculares pequenos com o intuito de preservar a visão central. Há restrições ao uso de radioterapia principalmente pelo aumento do risco de segundas neoplasias nos casos de tumores germinais. Outras complicações são: catarata, lesões vasculares com possíveis hemorragias vítreas e hipoplasia de ossos faciais e temporais. Com as altas taxas de cura observadas nesses pacientes, o refinamento nas novas modalidades terapêuticas foram se impondo (ABRAMSON e SCHEFLER 2004).

A terapêutica oftalmológica utilizada em tumores intraoculares como a fototerapia, com a utilização de LASER, é indicada em tumores pequenos distantes da mácula ou da papila. O LASER é aplicado em torno da base do tumor com o objetivo de impedir o suprimento sanguíneo do tumor (ABRAMSON e SCHEFLER 2004).

A termoterapia transpupilar (TTT) é a utilização de energia em forma de raios infravermelhos. Ao contrário da fototerapia, a termoterapia é aplicada sobre o tumor, levando as células tumorais a uma temperatura em torno de 45-60°C, que não é capaz de causar necrose, mas leva à ativação direta da apoptose (ABRAMSON e SCHEFLER 2004). Por isso, a TTT pode ser utilizada em tumores peripapilares. Em lesões periféricas, os raios infravermelhos também podem ser aplicados através da conjuntiva por um “probe” especial.

A crioterapia pode ser usada como terapia primária para retinoblastomas quando o tumor é pequeno (menor que 3-4 diâmetros de papila) e periférico. Após a colocação do probe de crioterapia, o tumor é congelado rapidamente o que causa a formação de cristais de gelo, desnaturação de proteínas e alterações do pH que levam a ruptura da membrana das células tumorais. Além disso, a crioterapia causa morte das células tumorais pela destruição da circulação sanguínea através dos danos causados às células endoteliais e pela formação de trombos (ABRAMSON e SCHEFLER 2004).

A braquiterapia é utilizada principalmente em tumores medindo entre 4 e 10 diâmetros de disco e em tumores que não regrediram após a utilização de fototerapia ou crioterapia. O Iodo¹²⁵ é o isótopo mais comumente utilizado. O material radioativo pode ser colocado dentro de placas com tamanho correspondente ao tumor e a grande vantagem do uso destas placas é que há uma exposição mínima de radiação para os cuidadores. A placa é removida após 3-5 dias (ABRAMSON e SCHEFLER 2004).

A quimioterapia sistêmica é utilizada para tratamento de pacientes com retinoblastoma intraocular, com prognóstico visual, que se apresentam com tumores

muito grandes para serem controlados com os tratamentos locais (ABRAMSON e SCHEFLER 2004). É utilizada para a diminuição do volume do tumor, e então, o tratamento é complementado por tratamentos locais. A quimioterapia sistêmica para portadores de retinoblastoma intraoculares com o objetivo de preservação do globo ocular foi proposto nos anos 90 por SHIELDS et al. (1996). Além disso, a utilização da quimioterapia sistêmica pode ser responsável pela diminuição dos casos de retinoblastomas trilaterais (SHIELDS et al. 2001). A experiência do Hospital A.C. Camargo, com um esquema quimioterápico que utilizou carboplatina, etoposide e vincristina em 84 pacientes, apresentou como resultado a conservação de 49% dos globos oculares com retinoblastoma e 36% dos olhos com retinoblastoma foram tratados sem a necessidade de radioterapia externa. Neste grupo, não houve relatos de sérias complicações ao tratamento quimioterápico (ANTONELI et al. 2006).

Entretanto, a enucleação ainda é utilizada quando as formas de tratamento conservadoras como quimioterapia, fototerapia ou braquiterapia não apresentam resposta terapêutica. É ainda preconizada como tratamento primário em casos sem prognóstico visual e em casos de tumores avançados como: casos com envolvimento extenso da retina, *rubeosis iridis*, glaucoma secundário, ou extensa invasão da coróide e do nervo óptico (BALMER et al. 2006). Após a enucleação, não há um consenso sobre a necessidade de tratamento quimioterápico adjuvante em casos de doença envolvendo coróide e nervo óptico (STEINHORST 2006).

O tratamento de retinoblastomas extraoculares é complexo e depende principalmente do estadiamento (Anexo 2). Nos tumores extraoculares com envolvimento microscópico dos emissários esclerais, o tratamento preconizado é apenas quimioterapia sem a utilização de radioterapia. Para os pacientes com

margem do nervo óptico ou tecido orbitário comprometidos, o tratamento preconizado é quimioterapia e radioterapia externa. O esquema quimioterápico geralmente utilizado são ciclos de cisplatina e tenoposide alternado com ciclofosfamida, vincristina e doxorrubicina. Protocolo realizado neste hospital com a adição de ifosfamida e etoposide com a retirada da ciclofosfamida, vincristina e doxorrubicina apresentou melhora da sobrevida (ANTONELI et al. 2007a). A radioterapia externa é aplicada na órbita nesses pacientes com estadio II e III da classificação de CCSG. Nos pacientes com estadio IV, além do esquema de quimioterapia, é utilizada radioterapia em todo o cérebro e neuroeixo. Nos pacientes com estadio V, a radioterapia é aplicada na área da metástase (ANTONELI et al. 2003). Além deste tratamento, ciclos de quimioterapia intratecal com metrotexate, citarabina e dexametasona são utilizados. Mesmo assim, os pacientes com comprometimento de sistema nervoso central tem pequena resposta ao tratamento (ANTONELI et al. 2007b).

1.5 ESTADIAMENTO

Há diferentes formas de estadiamento do retinoblastoma e não foi estabelecido um sistema de estadiamento padrão. Devido às múltiplas formas disponíveis de tratamento do retinoblastoma, à complexidade da anatomia ocular e, principalmente, à diferença prognóstica entre tumores intra e extraoculares, muitos serviços adotam uma escala de estadiamento para tumores intraoculares e outra para tumores extraoculares. Somente os esquemas de estadiamento de St. Jude (PRATT et

al. 1997) e da Classificação de Tumores Malignos TNM (SOBIN e WITTEKIND 2004) contemplam tumores intraoculares e extraoculares.

Durante muitos anos, a escala de estadiamento mais utilizada nos retinoblastomas intraoculares foi a escala de Reese-Ellsworth (Anexo 3) publicada em 1963 (REESE e ELLSWORTH 1963). Esta escala foi criada para prever a resposta dos tumores à radioterapia de feixes externos.

Recentemente, com novas formas de tratamento do retinoblastoma intraocular, outras formas de classificação apareceram e a mais promissora é a International Classification of Intraocular Retinoblastoma (ABC Classification) (MURPHREE 2005). Esta classificação leva em conta as novas modalidades de tratamento passíveis de preservação do globo ocular e divide os tumores em 5 categorias (Letra A até E) dependendo do sucesso ou fracasso terapêutico (Anexo 2).

O estadiamento de tumores extraoculares pode ser estabelecido por diferentes esquemas como a classificação criada pelo Children Cancer Study Group segundo Wolff et al. (1978), citado por ANTONELI et al. (2003b, p.403), (Anexo 3) e a classificação internacional proposta por CHANTADA et al. (2006) envolvendo centros de tratamento do retinoblastoma em diferentes continentes (Anexo 4).

1.6 PROGNÓSTICO DO RETINOBLASTOMA

O prognóstico do Retinoblastoma depende principalmente do estadio da neoplasia ao diagnóstico. Enquanto pacientes com tumores que são diagnosticados quando ainda não apresentaram extensão para estruturas extraoculares apresentam sobrevida em 5 anos de até 99% (ABRAMSON e SCHEFLER 2004) as taxas de

sobrevida de pacientes com extensão extraocular estão em torno de 50-60% (ANTONELI et al. 2003).

No Brasil, observa-se um declínio das taxas de mortalidade do Retinoblastoma nos últimos anos (RIBEIRO e ANTONELI 2007). Essa taxa decresceu no sexo masculino de 0,14:100.000 em 1981 para 0,06:100.000 habitantes em 1994. Isto é provavelmente decorrente da melhora do tratamento do retinoblastoma, encaminhamento precoce dos pacientes e a campanhas educacionais direcionadas aos profissionais de saúde (RIBEIRO e ANTONELI 2007).

1.7 O MODELO DE KNUDSON

O Retinoblastoma sempre foi um modelo de estudo para outras neoplasias. KNUDSON (1971) propôs o modelo do duplo evento mutacional, para explicar a origem dos retinoblastomas, tanto os unilaterais quanto os bilaterais. Em 1975, KNUDSON estendeu este modelo para explicar a origem de outras neoplasias da infância.

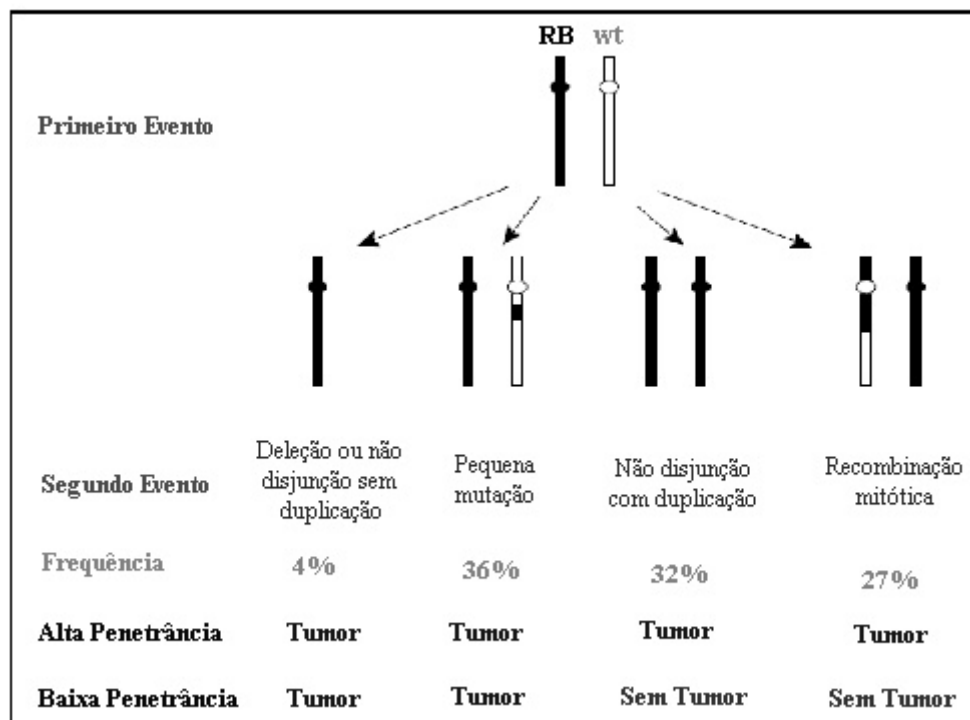
A partir dos estudos no retinoblastoma, foi também feita a descrição de um gene supressor de tumores. Esse gene está localizado no braço longo do cromossomo 13 e é denominado gene do Retinoblastoma (RB1) (FRIEND et al. 1986). Outras neoplasias como carcinoma urotelial ou carcinoma de pequenas células do pulmão também podem apresentar alterações nesse gene (SCAMBIA et al. 2006).

A proposta de Knudson foi de que os tumores unilaterais apresentavam maior tempo para o aparecimento porque necessitavam de dois eventos numa mesma célula para o seu aparecimento. Os tumores bilaterais, em alguns casos de pacientes com

história familiar positiva, necessitavam da metade do tempo para o desenvolvimento do tumor pois o primeiro evento teria sido herdado. O fato de todas as células do corpo terem herdado esse evento explicaria a presença de inúmeros focos do tumor, visto que o segundo evento poderia ocorrer em várias células da retina. Esse fato também justificaria a maior susceptibilidade desses pacientes a segundas neoplasias (HARBOUR 2006).

Os tumores bilaterais geralmente são consequência de mutações germinativas do gene do retinoblastoma (gene RB1). A possibilidade de um paciente desenvolver um retinoblastoma bilateral como consequências de mutações somáticas é em torno de 1:1.000.000.000 (MURPHREE 1998). Entretanto, aproximadamente 82% dos pacientes com tumores bilaterais não apresentam história familiar. Apresentam mutações germinativas novas ou mutações herdadas de baixa penetrância que não comprometeram o genitor afetado. Neste último caso, é comum ao exame de mapeamento da retina, o encontro de um retinocitoma assintomático neste genitor afetado (MURPHREE 1998).

Os tumores unilaterais, em sua maioria, são consequências de duas alterações somáticas. Entretanto, um terço dos pacientes com história familiar positiva apresenta doença unilateral (AUGSBURGER et al. 2004). Isso pode ser explicado porque alguns tipos de mutação do gene Rb1 (ou em seu promotor) podem produzir quantidades deficientes de proteína Rb (pRb) ou proteínas mutantes com atividade parcial (BREMNER et al. 1997; HARBOUR 2001). E a quantidade de atividade da pRb também depende do tipo de segundo evento que ocorre nas células precursoras (Figura 4). E mesmo pacientes com tumores unilaterais, unifocais e sem história familiar podem apresentar estas mutações germinativas (BRICHARD et al. 2006).



Legenda: características do segundo evento somático em pacientes com tumores germinativos, e como as mutações associadas a baixa penetrância se comportam dependendo de qual foi o segundo evento.

Fonte: Adaptado de HARBOUR (2001)

Figura 4 - Características do segundo evento somático em pacientes com tumores germinativos.

1.8 GENE DO RETINOBLASTOMA

O gene de susceptibilidade do Retinoblastoma Humano (RB1) é um gene com 27 éxons primeiramente descrito em 1986 (FRIEND et al. 1986). Apresenta inúmeras alterações catalogadas, desde mutações “nonsense”, “missense”, “splicing” e pequenas deleções e inserções que se acumulam em áreas denominada “hot spots” (VALVERDE et al. 2005). Esses “hot spots” coincidem com áreas preservadas da proteína durante a evolução denominadas “box a” e “box b” responsáveis pela ligação da pRb com o fator de transcrição E₂F (HARBOUR 2001). Há também perda do

gene RB1 consequente a deleções de parte do cromossomo 13, que podem causar além dos tumores oculares, deformações dos ossos do crânio, retardo mental e no desenvolvimento neuropsicomotor (BRICHARD et al. 2008).

1.9 A PROTEÍNA RETINOBLASTOMA (pRb)

O gene RB1 codifica uma fosfoproteína nuclear de 110 kDa com uma sequência de 928 aminoácidos, que é a proteína do retinoblastoma (pRb). Ela se liga a membros da família de fatores de transcrição E₂F inibindo sua ação. Esses fatores de transcrição regulam genes necessários durante a progressão do ciclo celular. O RB1 age então como gene supressor de tumor, em parte pela supressão do ciclo celular na transição G1/S. Isso explica porque a inativação dos dois genes RB1 retira o fator de inibição da progressão do ciclo celular na transição G1/S o que resulta em uma proliferação celular desregulada (CLASSON e HARLOW 2002).

A proteína pRb também apresenta importante papel na diferenciação celular. Havia um modelo teórico que a pRb atuava na diferenciação apenas retirando a célula do ciclo celular. Atualmente o consenso é que a pRb atua na diferenciação através de mecanismos diferentes daqueles da ligação com as proteínas E₂F, que fazem o controle do ciclo celular. Mesmo proteínas com alterações nos sítios de ligação com E₂F mantêm propriedades de promover a diferenciação celular (GOODRICH 2006).

A proteína pRb apresenta importante atuação na apoptose. Os camundongos sem as duas cópias do gene RB1 apresentam sérias anormalidades em sistema nervoso central e hematopoiese devido a intensa e aberrante apoptose nestes tecidos

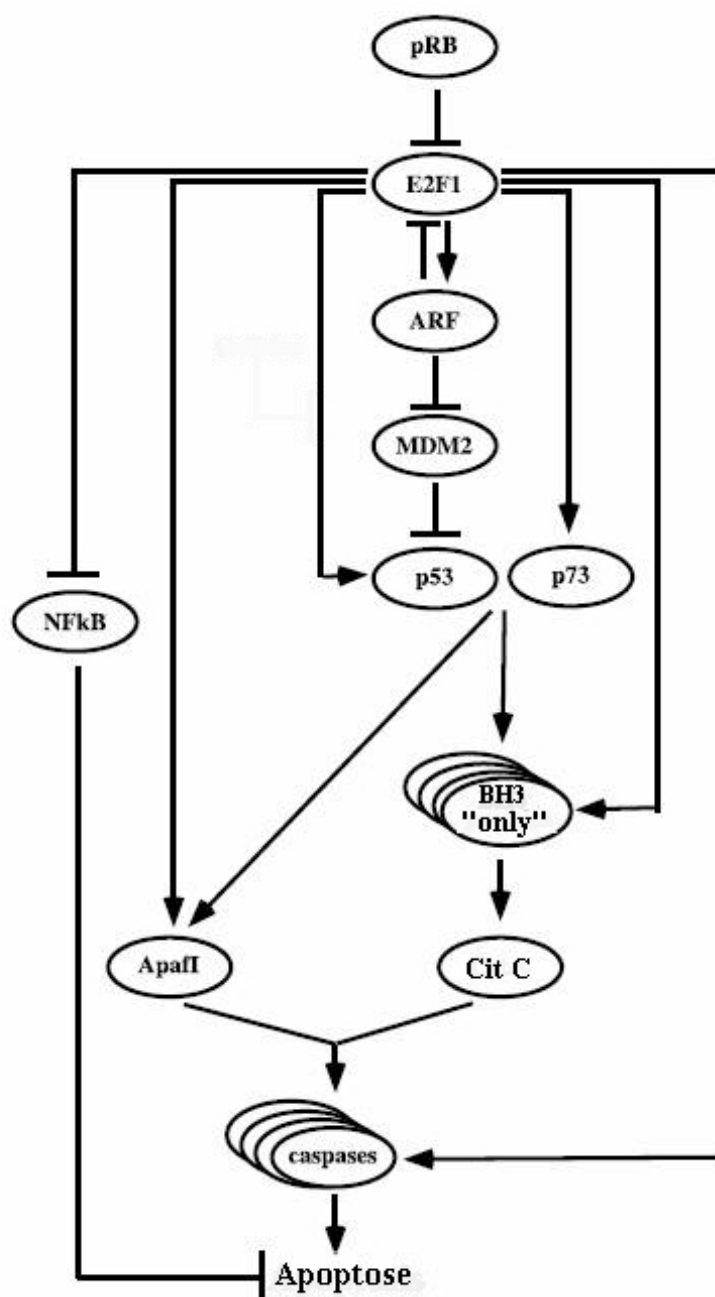
causando a morte do embrião antes do nascimento (CLARKE et al. 1992). Entretanto, foi observado que as placentas destes camundongos apresentavam alterações na sua arquitetura e função. E que os embriões RB1^{-/-} com placenta normal (RB1^{+/+}) não apresentaram a apoptose aberrante, ou seja, parece que na ausência de pRb, as células ficariam mais sensibilizadas à apoptose sob o estímulo isquêmico causado pelas alterações na placenta (DE BRUIN et al. 2003). Em muitos tecidos, a perda de pRb induz a expressão de grandes quantidades de p14^{ARF} que inibe a função das proteínas antiapoptóticas MDM2 (“murine double minute – 2”) e MDM4 e ativa o processo de apoptose dependente de p53 (GUO et al. 2008). Como observado na Figura 5, na ausência de pRb, os fatores de transcrição E₂F₁ são liberados e ativam a transcrição de proteínas como o “apoptotic activation factor-1” (APAF-1) (MORONI et al. 2001) e procaspases importantes na apoptose (GINSBERG 2002). E₂F₁ aumenta a atividade de p53 através de ligações diretas à proteína e do aumento de p53 quinases aumentando sua atividade de transcrição de proteínas pró-apoptóticas como Bax (“Bcl-2-associated X protein”), APAF-1, caspases, e inibindo a transcrição de Bcl-2 (HERSHKO e GINSBERG 2004).

1.10 APOPTOSE

1.10.1 Definição, funções e mecanismos

A apoptose é frequentemente definida como uma forma de morte celular que envolve uma sequência de ativação de proteínas denominadas caspases (DEGTEREV e YUAN 2008). É caracterizada por alterações morfológicas nas células como fragmentação do núcleo, formação de protusões na membrana

(“membrane blebbing”) e formação de corpos apoptóticos. Existem outras formas de morte celular “programada”: a morte celular autofágica (ou tipo II), necroptose, e morte celular mediada pela PARP-1.



Fonte: Adaptado de GINSBERG (2002)

Figura 5 - Vias moleculares onde a ausência de pRb pode levar à apoptose através da liberação de E₂F.

A apoptose está presente nos tecidos desde a embriogênese. É importante para os organismos pluricelulares para a eliminação de células redundantes, danificadas ou infectadas por patógenos (ADAMS e CORY 1998). Está presente nos tumores tanto na sua regressão quanto em sua fase de crescimento (COTRAN et al. 2005).

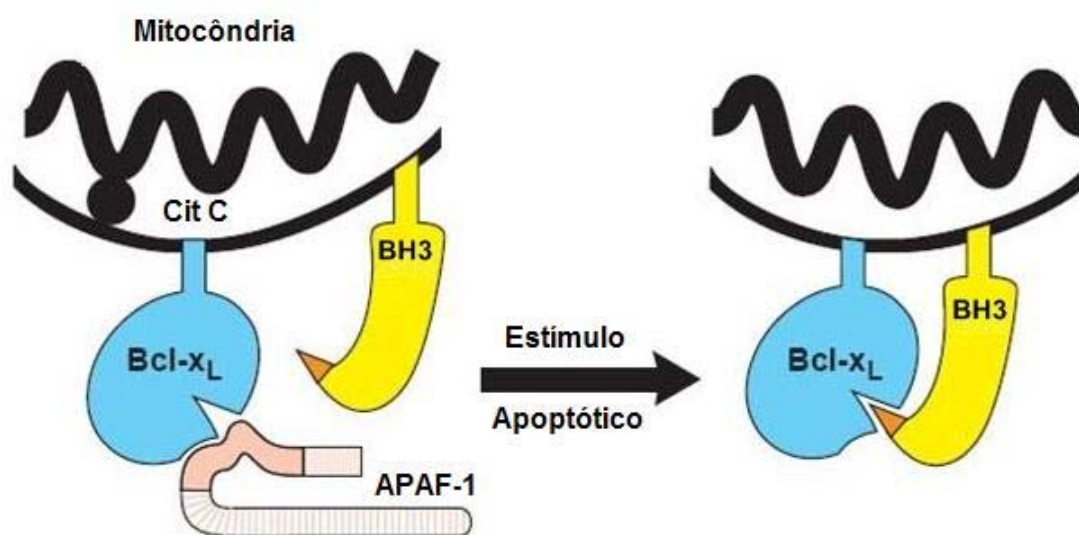
A apoptose é ativada por uma cascata de eventos moleculares que culmina numa fase executora pela ativação de proteínas de nome “caspases”. Essa cascata de eventos é dividida em via intrínseca e extrínseca (COTRAN et al. 2005).

A via extrínseca é ativada por mensageiros externos à célula. Os fatores de apoptose mais estudados nesta via é o receptor do “tumoral necrosis factor-1” (TNF-1) e o receptor Fas2.

A via intrínseca é controlada principalmente pela família de proteínas Bcl-2 (B-Cell Lymphoma-2), localizada nas mitocôndrias. A proteína Bcl-2 foi primeiramente isolada em células que perderam a capacidade de apoptose de uma linhagem obtida a partir de células neoplásicas de um paciente portador de leucemia mieloide. Esta família de proteínas está subdividida em 3 sub-famílias: sub-família Bcl-2 (antiapoptótica) constituída por Bcl-2 e Bcl-x_L; sub-família Bax (pró-apoptótica) constituída por Bax, Bak e Bok, e sub-família BH3 “only” (pró-apoptótica) constituída pelas proteínas Bik, Blk, Bim e PUMA. O equilíbrio dessas proteínas pró-apoptóticas e antiapoptótica funciona como um reostato para o início do programa de apoptose (ADAMS e CORY 1998).

As proteínas da família Bcl-2 atuam na integridade da membrana mitocondrial, impedindo ou estimulando a liberação do citocromo-C no citosol. Uma vez liberado no citosol, o citocromo-C forma com a APAF-1 (apoptosis activation

factor-1) um complexo proteico denominado apoptossomo que por sua vez, cliva a prócaspase-9 formando a proteína efetora caspase-9 (ZOU et al. 1999). Especificamente a proteína Bcl-X_L liga-se à proteína APAF-1 impedindo-a de ativar a procaspase-9. No caso de um sinal pró-apoptótico ser enviado (Figura 6), proteínas pró-apoptóticas do grupo BH3 “only” tentarão se ligar ao Bcl-X_L para que a proteína APAF-1 seja liberada (ADAMS e CORY 1998).



Legenda: Para bloquear a apoptose, Bcl-xL se liga à APAF-1. Um estímulo apoptótico que aumenta as proteínas do grupo BH3 “only” irá bloquear a função da proteína Bcl-xL.

Fonte: Adaptado de ADAMS e CORY (1998).

Figura 6 - Diagrama do modo de ação da proteína Bcl-xL.

A caspase-9 clivada atua sobre a pró-caspase-3 formando a caspase-3 clivada. A caspase-3 clivada, por sua vez, ativa a caspase-9 formando uma alça de retroalimentação positiva que amplifica o sinal apoptótico.

A partir da ativação das caspases, começa a fase efetora da apoptose. As caspases atuam sobre várias estruturas celulares. Elas clivam citoesqueleto e

proteínas da matriz nuclear, além de proteínas que fazem transcrição, replicação e reparo do DNA. Também ativam DNase pela clivagem de um inibidor desta enzima (COTRAN et al. 2005).

1.10.2 Moléculas envolvidas na apoptose

- **Bcl-2**

Bcl-2 tem função essencial na sobrevivência da célula através da inibição da liberação do citocromo C pela mitocôndria. O gene do Bcl-2 foi primeiro localizado através de estudos de linhagens de células de leucemia linfoblástica aguda de um paciente adulto que apresentava duas translocações: t(8;14) comum no linfoma de Burkitt e t(14;18) comum no linfoma folicular (PEGORARO et al. 1984). Para este gene no cromossomo 18, foi dado o nome de Bcl-2 (PEGORARO et al. 1984; TSUJIMOTO et al. 1984). Entretanto, somente após alguns anos de estudo, seu papel biológico foi ligado ao aumento da sobrevivência celular em experimentos em culturas de células da medula óssea. Estas células, que são dependentes de interleucina-3 (IL-3), foram infectadas por um retrovírus contendo a sequência de Bcl-2. Quando a IL-3 foi retirada, as células infectadas pelo vírus que continham excesso de Bcl-2 sobreviveram sem apresentarem proliferação (VAUX et al. 1988).

Os estudos que utilizaram imunistoquímica em amostras de retinoblastoma encontraram resultados divergentes: em alguns, não houve expressão imunistoquímica (YUGE et al. 1995; COUPLAND et al. 1998) enquanto em outros houve expressão fraca de Bcl-2 (TATLIPINAR et al. 2002) e expressão moderada de padrão membrana (FUJISAWA et al. 1998).

- **Bak**

A proteína Bak (“Bcl-2 homologous antagonist/ killer”) é um dos membros da família Bcl-2 que é capaz de ativar a apoptose. A descrição da proteína foi feita por três grupos de pesquisa diferentes que isolaram a proteína através de sua capacidade de interagir com a proteína do adenovírus E1B 19K. Esta proteína têm função de inibir a apoptose da célula infectada pelo vírus (FARROW et al. 1995; CHITTENDEN et al. 1995b; KIEFER et al. 1995).

É uma proteína de 211 aminoácidos que se localiza na mitocôndria e para induzir a apoptose, interage e acelera a abertura de um canal de amnios da membrana mitocondrial que leva a liberação de citocromo C no citosol. A proteína Bak possui um domínio diferente de BH1 e BH2 (o domínio BH3) que apresenta funções pró-apoptóticas e a capacidade de ligação com Bcl-x_L (CHITTENDEN et al. 1995a).

Bak parece ter papel importante na gênese tumoral. Em um estudo utilizando técnica imunoistoquímica, Bak apresentou diminuição de sua expressão em amostras de adenomas e adenocarcinomas do cólon em relação à expressão em mucosa normal (KRAJEWSKA et al. 1996).

- **Bax**

Bax é uma proteína pró-apoptótica que apresenta um papel chave na apoptose mediada pela via intrínseca ou mitocondrial (OLTVAI et al. 1993). Sob um estímulo apoptótico, Bax forma oligômeros que se agregam na membrana mitocondrial e interagem formando canais de íons dependentes de pH e de voltagem (ANTONSSON et al. 1997). Desta forma, Bax aumenta a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol (JURGENSEMEIER et al. 1998). Em linhagens celulares de retinoblastoma,

experimentos utilizando bloqueadores do fator de sobrevivência celular NFkB que induzem a apoptose nestas células, a transcrição do gene Bax aumenta demonstrando que esta proteína é um importante regulador da via de apoptose nestas linhagens (POULAKI et al. 2002).

A diminuição da expressão do gene Bax está associado à pior resposta à quimioterapia e pior sobrevida no câncer de mama (KRAJEWSKI et al. 1995).

A diminuição da expressão de Bax observada através da imunoistoquímica foi associada à pior prognóstico em pacientes portadores de câncer de pulmão não pequenas células (JEONG et al. 2008), em pacientes com câncer epidermoide da boca (KATO et al. 2008), carcinoma de esôfago (KANG et al. 2007), tumor de células germinativas da infância (ADDEO et al. 2007), carcinoma urotelial da bexiga (GONZALEZ-CAMPORA et al. 2007), adenocarcinoma da ampola de Water (SANTINI et al. 2005), carcinoma do ovário e carcinoma do colo uterino (WOOTIPOOM et al. 2004).

- **Bim**

Bim (“Bcl-2 interacting mediator of cell death”) foi identificado em experimentos que determinava quais proteínas se ligam a Bcl-2. Desta forma foi descoberta esta proteína que apresenta três variantes: Bim_{EL} (extra long), Bim_L (long) e Bim_S (short) que possuem respectivamente 198, 138 e 110 aminoácidos. A variante Bim_S parece ser o mais potente fator pró-apoptótico. Todas as variantes possuem localização em membranas citoplasmática como a membrana da mitocôndria, e todas apresentam a sequência BH3 (O'CONNOR et al. 1998).

Bim tem a capacidade de se ligar tanto a Bcl-2 quanto a Bcl-xL assim como as outras proteínas do grupo “BH3 only” (O'CONNOR et al. 1998).

O estudo de Bim em outras neoplasias apresentou interessantes resultados. Em experimentos com culturas celulares de carcinomas de pulmão, Bim apresentou papel fundamental na indução de apoptose em culturas submetidas à inibição de EGFR por erlotinib (GONG et al. 2007). Em estudos utilizando cultura de células de carcinoma de células renais, a perda de expressão de Bim estava associada com a resistência à apoptose (ZANTL et al. 2007).

- **MDM2**

A proteína MDM2 (“murine double minute – 2”) é um importante regulador negativo da p53. O gene correspondente, de mesmo nome, foi clonado a partir de RNA isolado de uma linhagem de células transformadas de camundongo (CAHILLY-SNYDER et al. 1987). MDM2 é considerado um proto-oncogene. A amplificação deste gene está associada com uma grande variedade de tumores incluindo até 20% dos sarcomas de partes moles (MOMAND et al. 1998).

MDM2 interage com um grande número de moléculas, mas sua principal função é a de inibir a atividade de fator de transcrição da p53 (CHEN et al. 1995). MDM2 é produzida no citoplasma e necessita voltar ao núcleo. Foi demonstrado que a PI3Kinase/AKT promove a entrada de MDM2 no núcleo (MAYO e DONNER 2001). No núcleo, MDM2 liga-se diretamente no sítio de transcrição da p53 e este complexo sai novamente do núcleo e é degradado por proteases (ubiquitininas) no citoplasma. Uma vez que p53 aumenta a expressão de MDM2, essas duas moléculas formam uma alça de autorregulação (WU et al. 1993).

A proteína MDM2, quando interage com a pRb, perde sua função de inibir a p53. A pRb também possui a capacidade de formar um complexo trimérico pRb-MDM2-p53 que protege o p53 da degradação por proteases e mantém a sua função apoptótica (HSIEH et al. 1999).

MDM2 encontra-se expresso na maioria dos retinoblastomas. A ausência de expressão de p14ARF, um importante modulador da MDM2, constitui uma evidência de que a MDM2, bloqueando a função da p53, promove o desenvolvimento do retinoblastoma (GUO et al. 2008). Reforçando esta hipótese, um estudo utilizando um inibidor da função da MDM2, uma pequena molécula denominada nutilina-3, demonstrou que esta molécula pode reativar a função da p53 e induzir apoptose nas células do retinoblastoma (LAURIE et al. 2006).

Utilizando-se a técnica de imunoistoquímica, MDM2 apresenta expressão nuclear em 37% dos sarcomas de partes moles (CORDON-CARDO et al. 1994), em 30% dos carcinomas uroteliais da bexiga (LIANES et al. 1994), em 85% dos linfomas de Hodgkin (CHILOSI et al. 1994), e em 40% dos carcinomas de mama (MARCHETTI et al. 1995). Entretanto, este último estudo demonstrou que a amplificação do gene foi observada apenas em 7,7% dos casos demonstrando que o aumento de MDM2 pode ocorrer por outros mecanismos além da amplificação gênica.

- **p53**

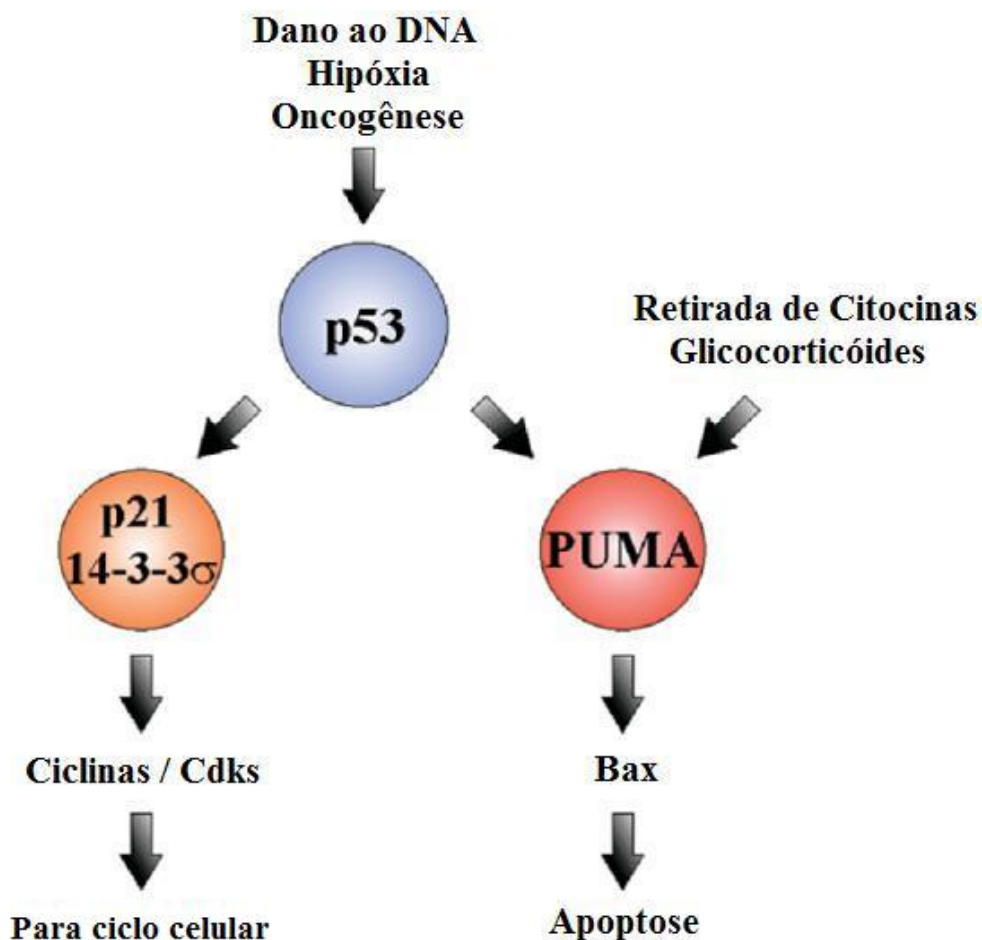
A p53 é uma proteína supressora de tumores que induz a apoptose em resposta a um estresse oncogênico (VOUSDEN e LU 2002). Essa proteína foi identificada por três grupos distintos de pesquisa que observaram a expressão

aumentada desta proteína em linhagens infectadas ou transformada pelo vírus SV40 (LINZER e LEVINE 1979; LANE e CRAWFORD 1979) ou em linhagem celulares de sarcomas de camundongo induzido por hidrocarbonetos policíclicos (DELEO et al. 1979).

A p53 funciona predominantemente como um fator de transcrição e é codificada pelo gene Tp53 localizado no braço curto do cromossomo 17 (MATLASHEWSKI et al. 1984; ISOBE et al. 1986). Este gene foi considerado pelo grupo de estudos coordenado por Prof. Dr. Bert Vogelstein em 1989, como um gene supressor de tumores (BAKER et al. 1989; NIGRO et al. 1989). Antes, acreditava-se que o Tp53 era um oncogene. Isto porque, experimentos demonstraram aumento transitório de seu transcrito quando células de cultura eram estimuladas a crescer (REICH e LEVINE 1984) e microinjeções de anticorpos anti-p53 inibiam a divisão celular se a aplicação fosse feita no período do estímulo de crescimento, sugerindo que a p53 era uma molécula necessária na transição da fase G0/G1 (MERCER et al. 1984). Além disso, os estudos imunoistoquímicos demonstram que em muitas neoplasias, há intensa positividade nuclear o que foi interpretado como um depósito desta proteína no núcleo das células malignas (DIPPOLD et al. 1981).

Inúmeros são os estímulos que podem aumentar a p53. Quebras nas cadeias de DNA são os principais estímulos (KO e PRIVES 1996). Entretanto, outros estresses como o choque térmico, a hipóxia, privação de nutrientes, depleção de ribonucleotídeos trifosfato (rNTP) e óxido nítrico (NO) também estimulam a p53 (LEVINE et al. 2006). A proteína p53 pode ativar inúmeros fenômenos celulares tais como diferenciação, senescência, parada do ciclo celular e principalmente a apoptose (VOUSDEN e LU 2002). Para executar estas funções, a p53 ativa a transcrição de

inúmeros genes, incluindo o gene do p21 que inibe a progressão do ciclo celular; e os genes APAF-1, Bax, NOXA, PTEN e PUMA (Figura 7) que estimulam a apoptose (KO e PRIVES 1996; VOUSDEN e LU 2002; YU e ZHANG 2003).



Legenda: Esquema demonstrando que p53 pode induzir tanto parada do ciclo celular quanto apoptose. Dependendo da intensidade do estímulo, do tipo celular de alterações subcelulares, p53 pode induzir tanto parada do ciclo celular quanto apoptose.

Fonte: Adaptado de YU e ZHANG (2003).

Figura 7 - p53 pode induzir tanto parada do ciclo celular quanto apoptose.

A progressão neoplásica depende da inativação da via da p53 que pode ser devidas tanto a mutações do gene Tp53, quanto a alterações nas vias de sinalização da proteína (VOUSDEN e LU 2002). As mutações do gene Tp53 ocorrem em mais que 50% de todos os tumores humanos com alguns tumores se desenvolvendo sem a

perda dos dois alelos selvagens do Tp53. Este é um comportamento diferente dos outros genes supressores de tumor como o RB1. Algumas mutações específicas do gene Tp53 apresentam uma alta frequência, com 28% das mutações afetando apenas seis códons de uma sequência de DNA que apresenta 393 códons. Uma explicação para esta alta incidência de mutações em pontos específicos do Tp53 nas neoplasias é que as p53 mutantes formadas a partir deste gene mutado funcionariam como inibidora da função da proteína normal. A proteína mutante forma tetrâmeros com outras proteínas mutantes ou com as proteínas normais. Desta forma, há um sequestro da proteína normal que para de executar sua função de parar o ciclo celular ou induzir a célula a apoptose quando é detectado um dano ao DNA. Isto explicaria porque muitas células neoplásicas mantêm um alelo selvagem do Tp53 (VOUSDEN e LU 2002). E como essas proteínas mutantes que formam esses tetrâmeros têm maior estabilidade que a proteína selvagem, os experimentos com imunoistoquímica, podem demonstrar positividade para p53 sem que a proteína esteja exercendo sua função normal (BARTEK et al. 1990; WANG et al. 1994).

Devido a estas inúmeras e importantes funções na célula, de sua importância na gênese das neoplasias malignas humanas, a p53 é uma das proteínas mais bem estudadas que existem. E foi eleita pela revista Science como a “molécula do ano” em 1993 (KOSHLAND 1993).

No retinoblastoma, a análise de perda de heterozigose do cromossomo 17 detectou alteração em apenas um de 23 pacientes, sugerindo que não há alterações do gene Tp53 no retinoblastoma (KATO et al. 1996). Utilizando-se imunoistoquímica, diferentes resultados são descritos na literatura. YUGE et al. (1995) relataram expressão de p53 em 75% das amostras e CHA et al. (2000) relataram positividade

em 85% das amostras, enquanto outros autores encontraram apenas positividade focal em 80% das amostras (SCHWIMER e PRAYSON 2001).

NORK et al. (1997) encontraram que a expressão imunoistoquímica de p53 nos retinoblastomas se correlacionava com a apoptose e DIVAN et al. (2001) encontraram que em retinoblastomas pouco diferenciados, a expressão de p53 era maior nas áreas mais distantes do vaso sanguíneo, onde o suprimento de oxigênio e nutrientes é menor e a apoptose é mais frequente.

- **PUMA**

A proteína PUMA (“p53 upregulated modulator of apoptosis”) foi descrita por dois diferentes grupos. O primeiro utilizou linhagens celulares de carcinoma colorretal e, após induzir a produção de p53, observaram quais transcritos estavam aumentados nestas células (YU et al. 2001). O segundo grupo comparou a expressão de RNA em células com e sem p53 no intuito de descobrir quais os genes são alvos da p53 (NAKANO e VOUSDEN 2001). PUMA é uma proteína do chamado grupo “BH3-only” que apresenta duas formas decorrentes de “splicing” alternativo: PUMA-alpha e PUMA-beta (NAKANO e VOUSDEN 2001). Alterações no sítio BH3 fazem com que estas proteínas percam sua função, pois este é o sítio de ligação com as proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-x_L (NAKANO e VOUSDEN 2001).

A p53 é o principal fator de transcrição do gene PUMA. E embora a p53 apresente diversas vias para estimular a apoptose nas células, quando os transcritos do gene PUMA são inibidos por oligonucleotídeos “antissense”, o índice de apoptose dependente de p53 cai (NAKANO e VOUSDEN 2001). E em camundongos sem o

gene PUMA, praticamente toda a apoptose mediada pela p53 desaparece (JEFFERS et al. 2003).

Estudos relacionando a expressão imunoistoquímica de PUMA com neoplasias apresentou interessantes resultados. Em carcinoma colorretal, PUMA foi expresso em todos os casos e em suas respectivas mucosas (KIM et al. 2007). Em tumores gástricos, PUMA foi positivo em 73% dos casos, mas não havia alterações no gene PUMA (YOO et al. 2007).

- **Smac/DIABLO**

Smac/ DIABLO (“Second mitochondria-derived activator of caspases/ direct IAP Binding Protein with low isoelectric point”) é uma proteína descrita por dois grupos distintos de pesquisadores. Um desses grupos percebeu que extratos celulares preparados com detergentes tinham mais capacidade de ativar a caspase-3. Desta forma, eles compararam as proteínas diluídas nos extratos preparados com e sem detergentes e identificaram uma proteína de 25 kDA. E, com anticorpos policlonais contra esta proteína, eles determinaram que a sua localização em células normais era no interior da mitocôndria e que sob o estímulo apoptótico, tanto citocromo C quanto esta proteína eram liberadas no citosol (DU et al. 2000).

O outro grupo estudou quais proteínas se ligavam aos inibidores de apoptose (IAP ou “inibitor of apoptosis protein family) e identificaram esta proteína de 23 kDA com baixo ponto isoelétrico e a denominaram de DIABLO (“Direct IAP Binding Protein with low isoelectric point”) (VERHAGEN et al. 2000). Estes inibidores de apoptose são proteínas altamente conservadas na evolução. Tanto que,

os inibidores dos IAP das drosófilas são capazes de induzir ativação das caspases em células de mamíferos (VERHAGEN e VAUX 2002).

Smac/DIABLO é expressa em diversos tecidos normais tais como coração, fígado, rim e testículos (VERHAGEN et al. 2000). O estudo desta proteína nas neoplasias malignas já apresenta alguns resultados interessantes. Em uma recente revisão, MARTINEZ-RUIZ et al. (2008) listaram artigos que demonstraram tanto aumento quanto diminuição da proteína ou do RNAm em diferentes neoplasias, o que pode ocorrer dependendo da via da carcinogênese utilizada. E também listaram artigos que demonstraram que a expressão da proteína estava associada à pior ou melhor prognóstico dependendo do tipo de neoplasia.

1.10.3 Métodos de detecção da apoptose

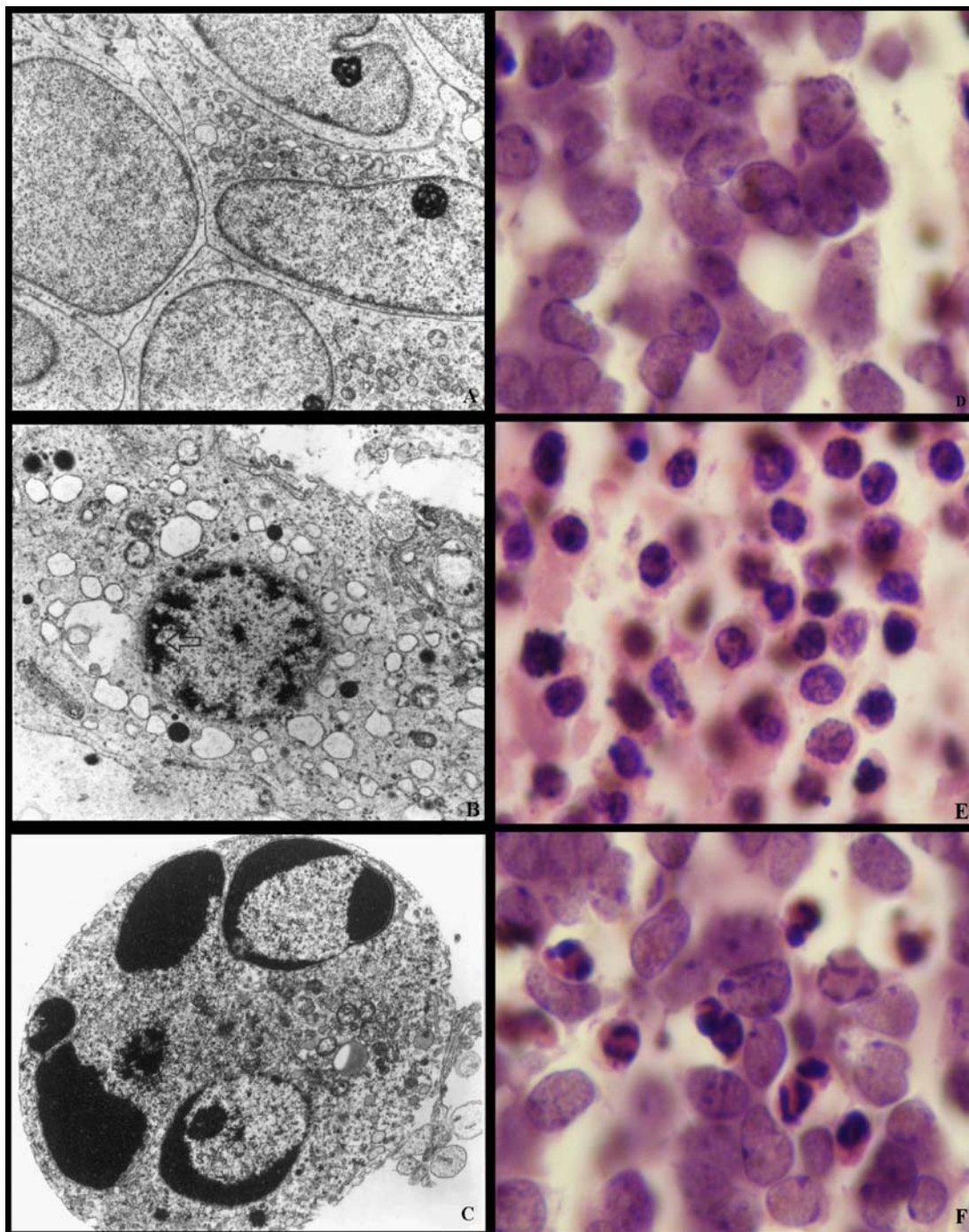
A apoptose pode ser observada e medida por inúmeros e variados métodos. O primeiro método descrito e ainda considerado por muitos como padrão ouro para a diferenciar apoptose de necrose é a avaliação das alterações morfológicas observadas à microscopia eletrônica. As alterações morfológicas, quando observadas à microscopia óptica e utilizando-se as colorações histoquímicas habituais tem pequena capacidade para medir a apoptose.

As alterações morfológicas são as últimas alterações observadas na célula. Quando uma célula recebe o estímulo apoptótico desencadeando toda a cascata de eventos, as alterações morfológicas só irão aparecer algum tempo depois que a célula já está comprometida com a apoptose. Desta forma, os métodos morfológicos têm a desvantagem de não detectar a apoptose nos seus estágios iniciais. A Figura 8 demonstra as características morfológicas da apoptose e necrose no retinoblastoma.

Em material biológico arquivado em blocos de parafina, há três principais técnicas de detecção da apoptose: TUNEL (“terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling”), ISEL (*in situ* end-labeling technique) e a detecção da caspase-3 clivada pela imunoistoquímica (GOWN e WILLINGHAM 2002).

As técnicas de TUNEL e ISEL utilizam uma das mais importantes características da apoptose, a fragmentação do DNA. O método TUNEL utiliza a enzima Tdt que se liga às extremidades dos fragmentos de DNA e incorpora um nucleotídeo marcado com um cromógeno ou uma molécula fluorescente (GAVRIELI et al. 1992). TUNEL tem a desvantagem de detectar também o DNA fragmentado na necrose. Já o método ISEL utiliza, ao invés de Tdt, DNA polimerase-1 para ligar nucleotídeos marcados nas falhas do DNA (WIJSMAN et al. 1993). ISEL tem a desvantagem de ser menos sensível que TUNEL além de ser um experimento mais demorado (HUERTA et al. 2007).

A detecção da caspase-3 clivada através da imunoistoquímica tem muitas vantagens. Grande parte dos laboratórios de patologia tem domínio sobre este método e a caspase-3 clivada parece detectar a apoptose nos seus momentos mais iniciais. É possível que o fenômeno da apoptose ocorra através de outras vias, sem a clivagem da caspase-3. Entretanto, essa desvantagem não supera as características de praticidade deste método que detecta a apoptose desde sua fase inicial.



Legenda: A e D retinoblastoma pouco diferenciado; B e E necrose das células malignas; C e F, apoptose das células malignas. A, B e C fotos de microscopia eletrônica; D, E e F fotos em H& E.

Fonte: Fotos Microscopia eletrônica: adaptado de CHA et al. (2000).

Figura 8 - M.E. e fotomicroscopia das células do retinoblastoma viáveis, necróticas e apoptóticas.

Há poucos trabalhos anteriores que quantificaram a apoptose no retinoblastoma e a correlacionaram com fatores prognósticos (Tabela 1). KERIMOGGLU et al. (2003) mediram o índice apoptótico obtido através da técnica TUNEL em uma pequena amostra ($n = 36$). Obtiveram uma correlação significativa entre índice apoptótico (AI) e metástases, e o AI e o tamanho do tumor. Também observaram uma correlação inversa significativa entre o AI e índice proliferativo (KERIMOGGLU et al. 2003). TATLIPINAR et al. (2002) não encontraram nenhuma associação entre AI com variáveis clínicas como tratamento prévio, grau de diferenciação do tumor, e tumores unilaterais vs bilaterais.

Tabela 1 – Principais estudos que quantificaram a apoptose no retinoblastoma.

Autores	Número de pacientes	Incluídos pacientes com tratamento anterior	Método de detecção da apoptose utilizado	Índice apoptótico	Objetivo principal
Kerimogglu et al. (2003)	$n = 53$	Sim	-TUNEL	$2,67 \pm 1,18$	Associar índice apoptótico com parâmetros clínico-patológicos.
Tatlipinar et al (2002)	$n = 31$	Sim	-TUNEL	$2,75 \pm 1,20$	Associar índice apoptótico com parâmetros clínico-patológicos.
Cha et al (2000)	$n = 13$	Não	-TUNEL -Microscopia eletrônica -Citometria de fluxo	Dif. $AI < 1$ Indif $AI > 8$	Associar índice apoptótico com grau de diferenciação
Bellan et al (2002)	$n=42$	Não	-ISEL	$p130 (+)AI = 3,26 \pm 2,23$ $P130(-) AI = 1,01 \pm 0,86$	Quantificar a apoptose segundo a expressão da proteína p130.

Em outro estudo utilizando a técnica de ISEL, comparando-se o índice apoptótico e a expressão de p130, o índice apoptótico foi menor no grupo dos retinoblastomas que não expressaram esta proteína e dentre os retinoblastomas que expressaram esta proteína, houve uma correlação positiva entre o número de células expressando p130 e o índice apoptótico (BELLAN et al. 2002).

O Retinoblastoma é uma neoplasia que sempre se desenvolve a partir da mesma alteração: a inativação parcial ou total do gene Rb1 que codifica uma proteína que tem papel central no controle do ciclo celular. Descrever a expressão imunoistoquímica de proteínas relacionadas à apoptose pode melhorar nosso entendimento sobre a progressão do retinoblastoma e de outras neoplasias. Pode demonstrar, para futuros estudos, possíveis alvos de tratamento naqueles pontos onde há um bloqueio da cascata apoptótica permitindo ao tumor maior resistência à apoptose e conseqüentemente, maior resistência a alguns dos tratamentos utilizados. E também, demonstrar importantes fatores prognósticos para o retinoblastoma.

2 OBJETIVOS E HIPÓTESES

2.1 OBJETIVOS

Descrever a expressão imunoistoquímica de proteínas envolvidas na apoptose, em sua via intrínseca e comum no Retinoblastoma

Verificar a associação entre o índice apoptótico e extensão tumoral do Retinoblastoma

Verificar a associação entre a expressão de cada proteína da via apoptótica e a extensão do tumor.

Comparar as taxas de sobrevida global segundo o índice apoptótico.

Comparar as taxas de sobrevida global segundo a expressão imunoistoquímica de cada proteína da via apoptótica.

2.2 HIPÓTESES

Haverá um predomínio da expressão de proteínas pró-apoptóticas em relação a expressão das proteínas antiapoptóticas

O índice apoptótico estará inversamente associado ao estadio do retinoblastoma

A expressão de proteínas antiapoptóticas se associará diretamente com a extensão do tumor enquanto a expressão de proteínas pró-apoptóticas se associará inversamente.

O índice apoptótico se associará diretamente com a melhor sobrevida global.

A expressão de proteínas antiapoptóticas se associará inversamente a sobrevida global enquanto a expressão das proteínas pró-apoptóticas se associarão diretamente.

2.3 OBJETIVOS *POST HOC*

Verificar o índice de concordância entre avaliação através da MO e parâmetros de leitura imunoistoquímica pelo ACIS III®.

Verificar a associação da expressão das proteínas estudadas com AI.

Verificar a associação entre a expressão do fator de transcrição p53 e as demais proteínas.

2.4 HIPÓTESES *POST HOC*

Métodos de avaliação da imunoistoquímica através da MO e através da plataforma do ACIS III® apresentarão boa concordância.

Expressão das proteínas pró-apoptóticas se associará diretamente ao AI.

Expressão das proteínas pró-apoptóticas se associará diretamente à expressão de p53.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram incluídas neste estudo amostras de pacientes portadores de retinoblastoma submetidos à enucleação ou exenteração logo após o diagnóstico no período 1986 a 2000 no Hospital A. C. Camargo.

Os critérios de exclusão foram:

- blocos de parafina não disponíveis no arquivo do departamento de patologia;
- ausência de tumor viável nos cortes histológicos examinados.
- amostras de tumores de segundo olho enucleado;
- amostras de pacientes submetidos a qualquer tratamento prévio à enucleação ou exenteração tais como quimioterapia ou radioterapia;
- amostras de pacientes com dados clínicos incompletos.

3.2 COLETA DE DADOS NO PRONTUÁRIO

Dados clínicos como idade, sexo, tempo de encaminhamento, bilateralidade, história familiar, tratamentos prévios à cirurgia, e estadiamento da neoplasia foram coletados dos prontuários.

As variáveis clínicas e anátomo-patológicas foram anotadas de acordo com o Anexo 5 a partir de dados do prontuário e da revisão sistemática das lâminas.

As escalas de estadiamento empregadas neste estudo foram REESE e ELLSWORTH (1963) e CCSG-92 (Wolff et al. 1978, citado por ANTONELI et al. 2003b, p.403), que eram utilizadas no serviço quando os pacientes foram tratados (Anexos 1 e 3).

Foram excluídos do estudo pacientes cujos prontuários não foram encontrados. E os pacientes que a data da última informação era superior a dois anos da data de consulta ao prontuário foram considerados como perda de seguimento.

3.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Todas as lâminas arquivadas dos pacientes incluídos neste estudo foram revisadas pelo autor. As avaliações de fatores histológicos de alto risco como invasão das túnicas oculares, invasão do nervo óptico, invasão de câmara anterior e presença de doença extraocular foram observadas.

A classificação quanto à diferenciação do retinoblastoma foi avaliada pela presença de formação de rosetas de Flexner-Winterstein. Assim como nos estudos de SCHOUTEN-VAN MEETEREN et al (2001) os tumores que apresentavam formação de rosetas em mais que 80% do tumor eram classificados como bem diferenciados, e os que não apresentavam formação de rosetas foram classificados como pouco diferenciados. Os demais foram classificados como moderadamente diferenciados.

A invasão dos folhetos oculares pela neoplasia foi avaliada de forma semelhante aos estudos de KHELFOUI et al. (1996) A presença de invasão da coroide foi avaliada pela presença de foco(s) tumorais além da membrana de Brunch.

Quando havia até três focos microscópicos além desta membrana, a invasão foi denominada focal. Em olhos com mais que três focos microscópicos ou invasão macroscópica, a invasão foi denominada maciça. A invasão da esclera foi considerado quando havia dissecação do tecido conjuntivo escleral pela neoplasia.

A invasão do nervo óptico foi avaliada nos cortes longitudinais do disco óptico e foi classificada como invasão pré-laminar, na lâmina crivosa e pós lâmina crivosa dependendo de onde foi observada a invasão das células tumorais no nervo óptico (FOLBERG et al. 2003), além do comprometimento ou não da margem de ressecção do nervo óptico pela neoplasia.

Foi considerado comprometimento da câmara anterior quando havia células tumorais anteriores ao cristalino e íris.

3.4 CONFECÇÃO DA “TISSUE ARRAY”

A montagem de uma “tissue microarray” (TMA) consiste na composição de pequenas amostras de tecidos de diferentes origens em uma mesma plataforma. As lâminas feitas a partir desta plataforma (Figura 9) podem ser submetidas a técnicas imunoistoquímicas ou de biologia molecular com menor custo e menos tempo de execução que se as amostras fossem analisadas em lâminas separadas. Desta forma, é possível analisar um marcador imunoistoquímico de forma rápida e barata em diferentes tipos de tecidos normais ou tumorais ou em grandes séries de um determinado tipo de neoplasia. Por isso, as TMA se tornaram uma importante ferramenta na patologia. Tanto na diminuição dos custos do controle de qualidade das reações imunoistoquímicas, como na avaliação da expressão imunoistoquímica

de novos marcadores nestas grandes séries de tumores (SAUTER e MIRLACHER 2002).

Para confecção da “Tissue Array” foram utilizadas amostras de retinoblastoma fixadas em formol e arquivadas em blocos de parafina no laboratório de anatomia patológica do Hospital A.C. Camargo no período de 1986 a 2000.

Na avaliação de lâminas coradas em H&E, foram selecionadas áreas de aproximadamente 1 mm evitando áreas com necrose ou calcificação e áreas de invasão da coróide onde o pigmento melânico presente poderia interferir na leitura semi-automatizada das reações imunoistoquímicas. As áreas correspondentes às áreas selecionadas foram marcadas nos blocos de parafina para a construção da “Tissue Array” semelhante ao descrito no artigo de HOOS e CORDON-CARDO (2001). E utilizando um “tissue microarrayer” (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) foi montada a matriz com amostras de tumor medindo 1 mm de diâmetro cada.

As principais vantagens da utilização em pesquisas de lâminas feitas a partir de TMA em reações imunoistoquímicas são: (1) as amostras são submetidas à condições idênticas de temperatura e tempo de exposição aos reagentes; (2) praticidade e menor custo das reações; (3) maior rapidez na avaliação de uma grande série de amostras. Há a desvantagem de que o tumor não é avaliado em uma maior extensão que nas lâminas tradicionais. Entretanto essa desvantagem pode ser minimizada com a amostragem de diversas áreas destes tumores (HOOS e CORDON-CARDO 2001).



Figura 9 – Fotografia de lâmina obtida da plataforma de “tissue microarray” submetidas à reações imunoistoquímicas.

3.5 IMUNOISTOQUÍMICA

Foram testados anticorpos listados na Tabela 2 pela técnica da imunoistoquímica (Anexo 1). Esses anticorpos são marcadores da expressão de proteínas envolvidas na via apoptótica intrínseca e na via apoptótica comum.

A reação imunoistoquímica foi analisada pelo autor via microscopia óptica, por método semiquantitativo de acordo com as Tabelas 3 e 4. O escore final foi estabelecido pela somatória dos graus, sendo considerados casos negativos aqueles cujo escore foi entre 0-2; e positivos, os casos cuja somatória foi maior ou igual a 3.

A intensidade de reação também foi avaliada pelo equipamento semi-automatizado DAKO ACIS III® *Image Analysis System*. Para marcadores imunoistoquímicos de padrão citoplasmático, o aparelho, através do “software” ACIS versão 3.0.1 “Cytoplasmic Application” fornece informações de intensidade de

coloração e da área de coloração. Para marcadores de padrão nuclear, o ACIS “Nuclear Application” fornece informações de intensidade e porcentagem de núcleos corados.

Somente a expressão da caspase-3 clivada, que tem relação direta com o índice apoptótico, foi avaliada por método quantitativo (expressão em 1000 células tumorais). O índice apoptótico foi avaliado pela expressão da caspase-3 clivada e foi definido como o número de células tumorais com coloração citoplasmática positiva dividido pelo número de células tumorais contadas por campo de microscopia em aumento de 400x. A contagem foi realizada pelo autor com o auxílio do programa de computador “Axion Vision” 3.1 (Carl Zeiss Vision, Germany) com o processo de captura de imagens digitais e marcação com cores diferentes das células positivas e negativas. E os campos de microscopia escolhidos para contagem correspondem às áreas mais densamente coradas pela caspase-3 clivada.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados, clones e origem em relação às proteínas controladoras da apoptose.

Anticorpo	Diluição	Marca	Clone	Recuperação	Amplificação
APAF-1	1/50	Novocastra	Policlonal	Eterna/CT/pH6,0	NovoLink Polymer(Novocastra)
Bak	1/150	DAKO	Policlonal	Pascal/CT/pH6,0	NovoLink Polymer(Novocastra)
Bax	1/400	DAKO	Policlonal	Pascal/CT/pH6,0	NovoLink Polymer(Novocastra)
Bcl-2	1/200	DAKO	124	Pascal/CT/pH6,0	NovoLink Polymer(Novocastra)
Bcl -x _L	1/500	DAKO	Policlonal	Pascal/CT/pH6,0	NovoLink Polymer(Novocastra)
Bim-long	1/100	Chemicon	5E5	Pascal/CT/pH6,0	NovoLink Polymer(Novocastra)
Caspase-3 clivada (Asp 175)	1/300	Cell Signaling	Policlonal	Eterna/CT/pH6,0	NovoLink Polymer(Novocastra)
MDM2	1/150	DAKO	SMP14	Pascal/CT/pH6,0	NovoLink Polymer(Novocastra)
p53	1/2000	DAKO	D07	Pascal/CT/pH6,0	NovoLink Polymer(Novocastra)
procaspase3	1/4000	Epitomics	E61	Pascal/CT/pH6,0	NovoLink Polymer(Novocastra)
PUMA	1/250	Epitomics	EP512Y	Pascal/CT/pH6,0	NovoLink Polymer(Novocastra)
Smac/DIABLO	1/100	Epitomics	Y12	Pascal/CT/pH6,0	NovoLink Polymer(Novocastra)

Tabela 3 - Gradação da reação imunoistoquímica de acordo com a intensidade.

Característica da Coloração	Grau
Negativa	0
Intensidade fraca	1
Intensidade Moderada	2
Intensidade Forte	3
Intensidade Muito Forte	4

Tabela 4 - Gradação da reação imunoistoquímica de acordo com o número de células coradas.

Células Positivas	Grau
Nenhuma	0
Menos de 10%	1
10-50%	2
51-90%	3
Mais de 90%	4

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A tabulação dos dados foi feita no programa estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 13 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Primeiro, foi realizada a estatística descritiva, com cálculo de medidas de posição e dispersão e frequências absolutas e relativas.

Para a associação de variáveis categóricas, foi utilizado o teste de associação do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher (quando pelo menos uma das frequências esperadas era menor que 5).

Para a associação das variáveis não categóricas, foram utilizados os testes de t de Student ou teste de Mann-Whitney, quando a distribuição não era normal. Para a avaliação se uma variável apresentava distribuição normal foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para analisar possíveis associações, foram usados os coeficientes de correlação de Pearson ou os coeficientes de correlação de Spearman, quando as variáveis não apresentaram uma distribuição normal.

Foi realizada a comparação dos valores obtidos a partir da microscopia óptica e da plataforma ACIS III®. Para tal, a categorização a partir dos valores obtido pela microscopia óptica foi utilizado como referência. Foram construídas curvas ROC (“Receiver Operating Characteristics”) e o ponto mais próximo do vértice (0,1) foi considerado o ponto de corte (AKOBENG 2007). Após a determinação do ponto de corte, foi estabelecido um índice kappa de concordância. Dependendo do valor de kappa, o nível de concordância foi classificado como: mínimo, baixo, moderado, bom e excelente.

A análise de sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan-Meier e a comparação entre as curvas foram feitas pelo teste de log-rank.

Para todos os testes estatísticos, foi estabelecido um erro $\alpha = 5\%$.

3.7 COMISSÃO DE ÉTICA

Este protocolo de pesquisa foi aprovado no dia 29/05/2007 pela Comissão de Ética do Hospital A. C. Camargo (Projeto de Pesquisa 931/07).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO

Foram selecionados para o estudo 93 pacientes portadores de retinoblastoma admitidos nos departamentos de Pediatria e Oftalmologia do Hospital AC Camargo no período de 1986 a 2000 e que suas amostras estavam incluídas na “tissue microarray” já disponível no departamento de patologia. Todos foram submetidos à cirurgia como primeira opção. A média de idade dos pacientes à admissão era de 27 meses (2-80 meses), sendo que 29% apresentavam tumores bilaterais e aproximadamente 5% apresentavam história familiar positiva. Os dados sócio-demográficos e clínicos destes pacientes estão descritos na Tabela 5.

No mesmo período, foram admitidos 418 pacientes para o tratamento de retinoblastoma. A média de idade do grupo completo à admissão era de $24,3 \pm 18,4$ meses, 222 (53,1% dos pacientes) eram do sexo masculino e 39% dos pacientes apresentaram tumores bilaterais. A sobrevida do grupo foi de 87,9 %. Destes 418 pacientes, 33 pacientes (7,9%) fizeram tratamento conservador e dois pacientes não fizeram nenhum tratamento na instituição. Não foram encontrados no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica os blocos de parafina de 92 pacientes (22,1%). As amostras de 28 pacientes (6,7%) não apresentaram nenhuma área de tumor viável.

Dos 263 blocos de parafina encontrados, foram selecionados aleatoriamente 119 amostras para a construção da TMA já disponível no departamento. Seis amostras pertenciam a pacientes que foram submetidos a tratamentos antes da cirurgia (cinco pacientes submetidos à quimioterapia e um submetido à fototerapia). Destes, dois pacientes foram a óbito durante o seguimento. Não foram encontrados os prontuários de 14 pacientes que também foram excluídos do estudo. Entretanto, em banco de dados de trabalhos anteriores, havia a informação que três destes pacientes foram à óbito. Mais seis pacientes foram excluídos do estudo por não apresentaram nenhuma amostra positiva para qualquer dos marcadores estudados ou ausência de tumor viável na lâmina de TMA. Destes, dois pacientes foram à óbito. Em resumo, dos 119 pacientes cujas amostras foram incluídas na TMA, 26 pacientes foram excluídos. Destes, havia informação que pelo menos sete (27%) foram à óbito. E destes 26 pacientes, dez pacientes (38%) eram portadores de tumores bilaterais.

Dos 93 pacientes incluídos no estudo, 13 pacientes (18,3%) apresentavam tumores extraoculares. Mais que 80% dos pacientes apresentaram tumores intraoculares Reese Ellsworth V e entre os pacientes com tumores extraoculares, 11 pacientes apresentaram estadio II na CCSG-92 (pacientes apresentando nervo óptico com margem cirúrgica comprometida). Nesta amostra, há poucos pacientes com retinoblastoma intraocular em estadio inicial e nenhum paciente com tumor extraocular com estadio avançado (CCSG 92 III, IV e V). Em relação aos pacientes excluídos após a confecção da TMA, dois pacientes apresentavam tumor extraocular grau III e foram excluídos porque fizeram quimioterapia prévia à enucleação e um paciente apresentava tumor extraocular grau IV e foi excluído da amostra porque não havia tumor viável na TMA (Tabela 6).

Tabela 5 - Características demográficas e clínicas.

Dados demográficos e clínicos	Estatística	
Idade (meses)	26,7 ± 16,5 (n = 93)	
Unilaterais	30,3 ± 15,5 (n = 66)	
Bilaterais	18,0 ± 15,9 (n = 27)	
Sexo	Masculino	54,8% (n = 51)
	Feminino	45,2% (n = 42)
Raça	Branca	88,2% (n = 82)
	Negra	11,8% (n = 11)
Olho incluído no estudo	Olho direito (OD)	45,2% (n = 42)
	Olho esquerdo (OE)	54,8% (n = 51)
Primeiro procedimento realizado	Enucleação OD	45,2% (n = 42)
	Enucleação OE	53,8% (n = 50)
	Enuc. ambos olhos (AO)	1,1% (n = 01)
	Exenteração	0% (n = 0)
História Familiar	Não	87,1% (n = 81)
	Sim	5,4% (n = 5)
	Ignorada	7,5% (n = 7)
Lateralidade	Unilaterais	71,0% (n = 66)
	Bilaterais	29,0% (n = 27)

Dos 93 pacientes incluídos no estudo, 13 pacientes (18,3%) apresentavam tumores extraoculares. Mais que 80% dos pacientes apresentaram tumores intraoculares Reese Ellsworth V e entre os pacientes com tumores extraoculares, 11 pacientes apresentaram estadio II na CCSG-92 (pacientes apresentando nervo óptico com margem cirúrgica comprometida). Nesta amostra, há poucos pacientes com retinoblastoma intraocular em estadio inicial e nenhum paciente com tumor extraocular com estadio avançado (CCSG 92 III, IV e V). Dos pacientes excluídos após a confecção da TMA, dois pacientes apresentavam tumor extraocular grau III e foram excluídos porque fizeram quimioterapia prévia à enucleação e um paciente apresentava tumor extraocular grau IV e foi excluído da amostra porque não havia tumor viável na TMA (Tabela 6).

Tabela 6 - Estadiamento clínico e anátomo-patológico do retinoblastoma

Variáveis clínicas e anátomo-patológicas		Frequência	
Extensão do tumor	Intraocular	86,0%	(n = 80)
	Extraocular	14,0%	(n = 13)
Estadiamento intraocular (Reese-Ellsworth)	Estadio I	0%	(n = 0)
	Estadio II	1,1%	(n = 1)
	Estadio III	2,2%	(n = 2)
	Estadio IV	1,1%	(n = 1)
	Estadio V	81,7%	(n = 76)
Estadiamento extraocular (CSG-92)	Estadio I	2,2%	(n = 2)
	Estadio II	11,8%	(n = 11)
	Estadio III	0	
	Estadio IV	0	
	Estadio V	0	
Diferenciação	Bem/ moderadamente diferenciado	36,6%	(n = 34)
	Pouco diferenciado	63,4%	(n = 59)
Comprometimento do nervo óptico	Sim	37,6%	(n = 35)
	Pré lâmina crivosa	11,8%	(n = 11)
	Até lâmina crivosa	6,4%	(n = 6)
	Pós lâmina crivosa	19,4%	(n = 18)
	Não	49,5%	(n = 46)
Margem do nervo óptico	Ignorado	12,9%	(n = 12)
	Comprometida	11,2	(n = 11)
	Livre	77,6	(n = 72)
	Ignorado	10,2	(n = 10)
Invasão coróide	Sim	36,6%	(n = 34)
	Focal	10,8%	(n = 10)
	Maciça	25,8%	(n = 24)
Invasão de esclera	Não	63,4%	(n = 59)
	Sim	9,7%	(n = 9)
	Não	90,3%	(n = 84)
Comprometimento da câmara anterior	Sim	9,7%	(n = 9)
	Não	90,3%	(n = 84)
Comprometimento de vasos episclerais	Sim	2,2%	(n = 2)
	Não	93,5%	(n = 87)
	Ignorado	4,3%	(n = 4)

Os pacientes foram acompanhados no serviço por uma média de 11,5 anos (0 – 22 anos) após a cirurgia. Após 5 anos de seguimento, 93,5% dos pacientes estavam vivos e apenas dois (2,2%) pacientes haviam sido perdidos de seguimento. As mortes por retinoblastoma ocorreram nos dois primeiros anos após o início do tratamento. O aparecimento de segundos tumores ocorreu em quatro pacientes, sendo que dois pacientes desenvolveram osteossarcomas, um desenvolveu pinealoblastoma (tumor trilateral) e um desenvolveu tumor de células de Leydig em um teratoma mediastinal (Tabela 7).

Tabela 7 - Seguimento dos pacientes.

Variável do seguimento		Frequência
“Status” na última informação	Vivo sem doença	77,4% (n = 72)
	Morte (pelo retinoblastoma)	4,3% (n = 4)
	Morte (outras causas)	1,1% (n = 1)
	Perda de seguimento	17,2% (n = 16)
Tempo de seguimento (meses).	Total	168,3 ± 66,5 (0 – 266)
	Vivo sem doença	190,0 ± 46,9 (91 – 266)
	Morte pelo retinoblastoma:	11,8 ± 4,3 (8 – 18)
	Morte por outras causas:	63,0
	Perda de seguimento:	116,5 ± 65,9 (0 – 218)
“Status” aos 60 meses de seguimento	Vivo	93,5% (n = 87)
	Morte (pelo retinoblastoma)	4,3% (n = 4)
	Perda de seguimento	2,2% (n = 2)
Recidiva	Sim	6,5% (n = 6)
	Não	74,2% (n = 69)
	Ignorado	19,4% (n = 18)
Segundo tumor	Sim	4,3% (n = 4)
	Não	77,4% (n = 69)
	Ignorado	18,3% (n = 17)

4.2 ANÁLISE UNIVARIADA DE SOBREVIDA A PARTIR DOS DADOS CLÍNICOS E ANÁTOMO-PATOLÓGICOS

A análise da sobrevida global câncer específica segundo variáveis clínicas e anátomo-patológicas são apresentadas nas Tabelas 8 e 9. A sobrevida é menor entre os pacientes da raça negra e entre aqueles pacientes com intervalo entre aparecimento dos sintomas e início do tratamento maior que 1 ano. A sobrevida também é menor entre os pacientes com tumores extraoculares, com invasão de esclera, com invasão pós-laminar do nervo óptico e comprometimento dos vasos episclerais.

Tabela 8 - Análise univariada de sobrevida segundo variáveis clínicas e demográficas.

Variável clínica		Sobrevida global	Significância
Sexo	Feminino	95,1% (n=42)	p = 0,82
	Masculino	96,1% (n=51)	
Raça	Branca	97,5% (n=82)	p = 0,015
	Negra	81,8% (n=11)	
Tempo de encaminhamento	≤ 1 ano	97,6% (n=85)	p < 0,001
	> 1 ano	66,7% (n=6)	
História Familiar	Sim	100,0% (n=5)	p = 0,61
	Não	95,0% (n=81)	
Retinoblastoma bilateral	Sim	100,0% (n=27)	p = 0,19
	Não	93,8% (n=66)	

Tabela 9 - Análise univariada da sobrevida segundo variáveis anátomo-patológicas.

Variáveis anátomo-patológicas		Sobrevida Global	Significância
Extensão tumoral	Intraocular	97,5%	p = 0,023
	Extraocular	83,3%	
Diferenciação tumoral	Bem	97,1%	p = 0,60
	Pouco	94,8%	
Margem do nervo óptico	Comprometida	90,0%	p = 0,27
	Livre	97,2%	
Comprometimento pré-laminar nervo óptico	Não	97,8%	p = 0,39
	Sim	93,9%	
Comprometimento da lâmina crivosa nervo óptico	Não	98,2%	p = 0,14
	Sim	90,9%	
Comprometimento pós-laminar nervo óptico	Não	98,4%	p = 0,049
	Sim	87,5%	
Comprometimento câmara anterior	Não	96,4%	p = 0,26
	Sim	87,5%	
Comprometimento esclera	Não	97,6%	p = 0,002
	Sim	75,0%	
Comprometimento da Coróide	Não	96,6%	p = 0,93
	Focal	100,0%	
	Maciço	91,3%	
Comprometimento de Vasos episclerais	Não	96,5%	p < 0,001
	Sim	50,0%	

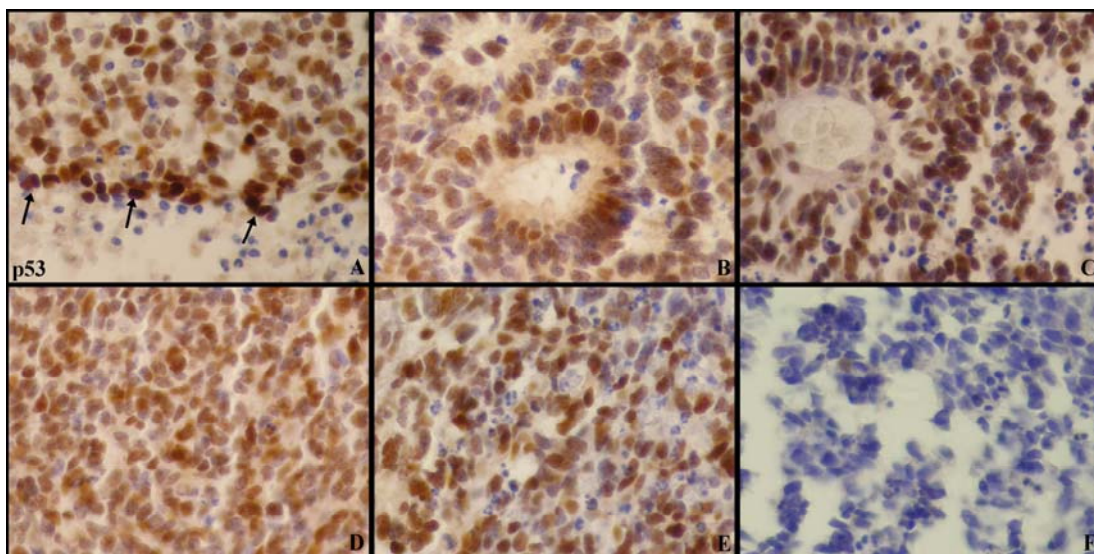
4.3 IMUNOISTOQUÍMICA

A observação das amostras de retinoblastoma após a realização da imunoistoquímica demonstraram um predomínio da expressão das proteínas pró-apoptóticas. APAF-1, Bax, p53, PUMA e Smac/DIABLO foram expressas em grande parte das amostras. Das proteínas antiapoptóticas, apenas Bcl-x_L apresentou expressão em parte das amostras. Bcl-2 e MDM2 apresentaram positividade focal.

A proteína p53, como comandante da apoptose apresentou diferentes formas de expressão (Figura 10). De um modo geral, p53 foi difusamente expressa no retinoblastoma. Podemos observar que p53 foi positivo nos retinoblastomas tanto em áreas diferenciadas ou pouco diferenciadas, em áreas com muitas figuras de apoptose e em áreas sem apoptose, em células tumorais próximas aos vasos sanguíneos e apresentando um reforço na intensidade de coloração em células que estão no limite entre tumor viável e necrose. A figura 11 demonstra a positividade para p53 e para Bax e PUMA, outras duas importantes proteínas pró-apoptóticas, em áreas limítrofes de tumor viável e necrose.

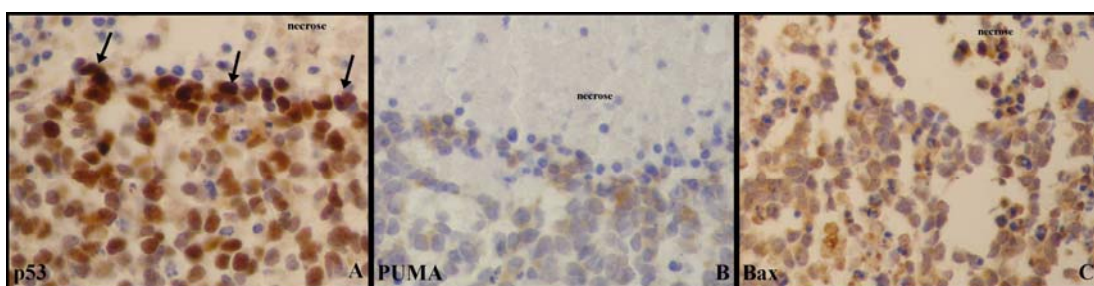
A proteína Bax apresentou positividade citoplasmática difusa na maior parte das amostras (Figura 12). Bax não apresentou padrão de expressão, com as células apresentando citoplasma difusamente corado (Figuras 11 e 12).

A proteína PUMA apresentou também difusa positividade citoplasmática, demonstrando uma discreta intensificação da reação nas rosetas (Figura 13). PUMA apresentou em alguns casos, padrão semelhante à p53 com intensificação da expressão no limite entre tumor viável e áreas de necrose (Figuras 11 e 13)



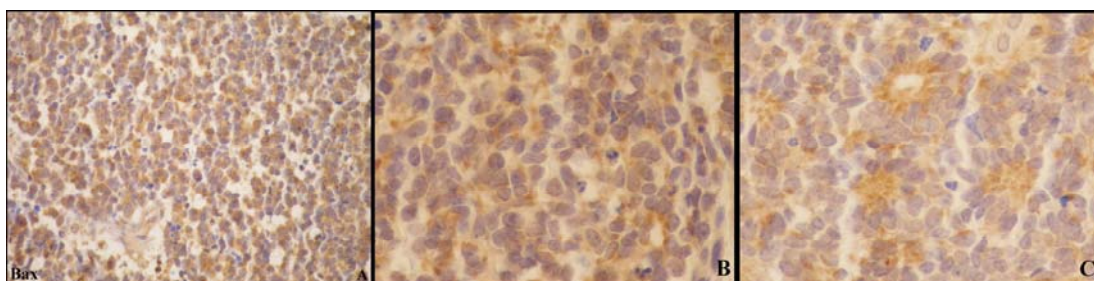
Legenda: A - p53 com reforço de positividade nas células próximas à necrose (setas); B - positividade em rosetas; C - positividade próximo aos vasos; D e E - positividade em áreas sem e com apoptose respectivamente; F - amostra negativa.

Figura 10 - Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de p53 (clone DO7).



Legenda: A - p53 apresentando reforço de expressão no limite entre tumor viável e necrose; B - este aumento de positividade é acompanhado por PUMA; C - Bax apresenta expressão difusa.

Figura 11 - Expressão de p53, PUMA e Bax em áreas com hipóxia.



Legenda: A e B - expressão difusa de Bax; C - expressão de Bax nas rosetas.

Figura 12 - Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de Bax (anticorpo policlonal)

A proteína Bak foi negativa em quase todas as amostras, apresentando expressão difusa no citoplasma das células tumorais em apenas um caso (Figura 14).

A proteína Bim_{LONG} apresentou também positividade citoplasmática difusa nas células tumorais (Figura 15), enquanto Smac/DIABLO apresentou positividade no citoplasma com intensificação nas rosetas e padrão “dot” nas áreas pouco diferenciadas (Figura 16).

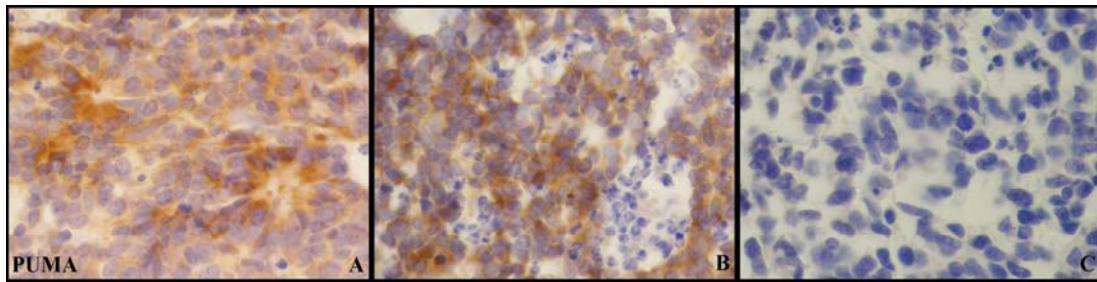
A proteína APAF-1 também foi difusamente expressa no retinoblastoma (Figura 17) tanto em áreas próximas aos vasos como em áreas com hipóxia, em áreas bem e pouco diferenciadas.

A proteína caspase-3 em seu estado inativo (pro-caspase-3) foi expressa difusamente no retinoblastoma, com fraca intensidade e sem reforços de intensidade (Figura 18).

Das proteínas antiapoptóticas, a proteína Bcl-x_L foi a mais expressa nas amostras (Figura 19). Sua expressão apresentou padrão reforço na intensidade nas rosetas e padrão “dot” paranuclear nas áreas pouco diferenciadas.

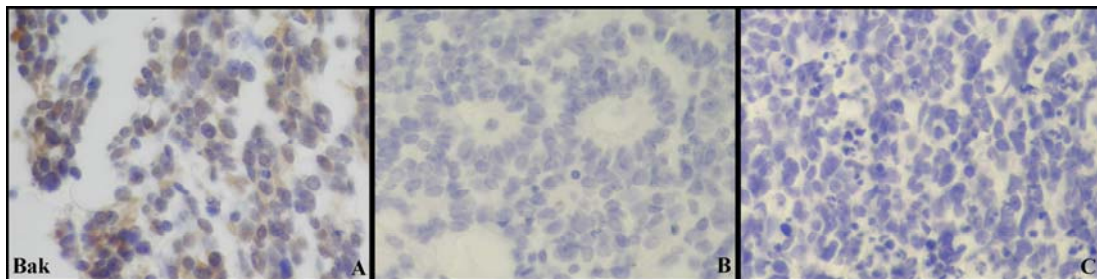
A proteína Bcl-2 apresentou fraca e difusa positividade citoplasmática em apenas uma amostra. Uma das amostras apresentava inúmeros astrócitos reativos que foram positivos para esta proteína antiapoptótica (Figura 20).

A proteína MDM2 apresentou fraca positividade de padrão nuclear em algumas amostras (Figura 21) e não apresentou em nenhuma amostra o padrão de positividade nas áreas tumorais próximas às áreas de necrose observadas em p53.



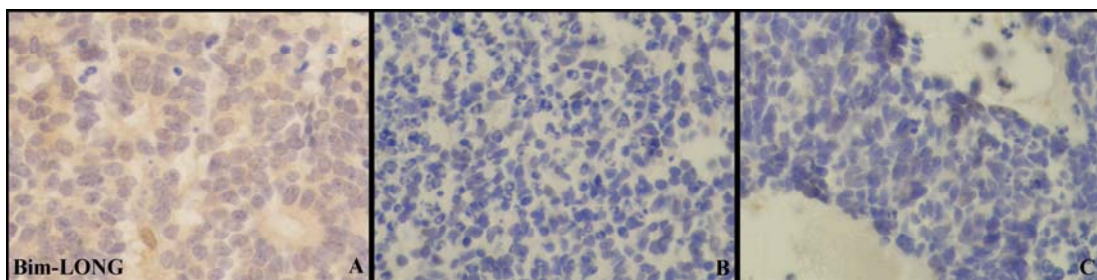
Legenda: A - discreta intensificação da reação nas rosetas; B - reação difusa em áreas de retinoblastoma pouco diferenciado; C - amostra negativa.

Figura 13 - Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de PUMA (clone EP512Y)



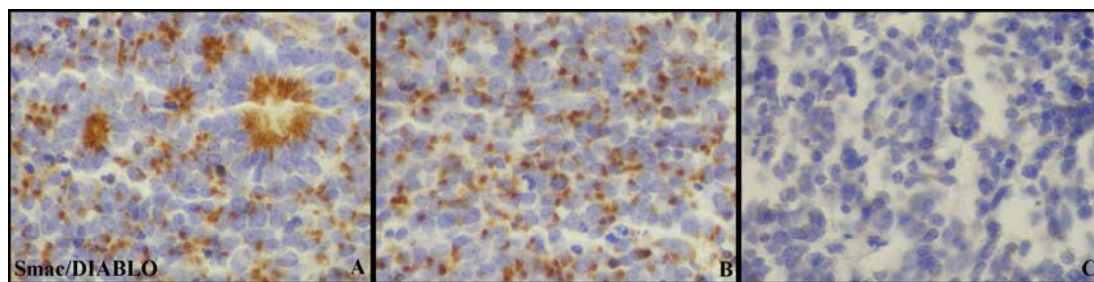
Legenda: A - positividade citoplasmática difusa no único caso que foi Bak positivo; B e C - amostras negativa.

Figura 14 - Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica para Bak (policlonal)



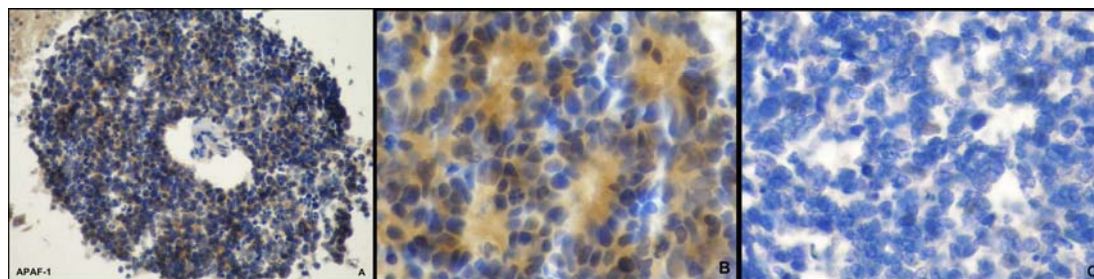
Legenda: A - positividade difusa de Bim_{LONG}; B e C - amostras negativas.

Figura 15 - Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de Bim_{LONG} (clone 5E5).



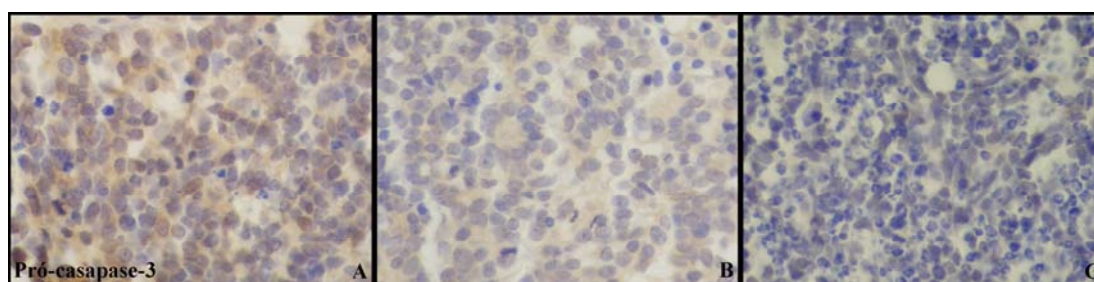
Legenda: Intensificação da expressão de Smac/DIABLO nas rosetas em **A** e em padrão “dot” paranuclear em **B**. Reação imunoistoquímica negativa em **C**.

Figura 16- Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de Smac/DIABLO (clone Y12).



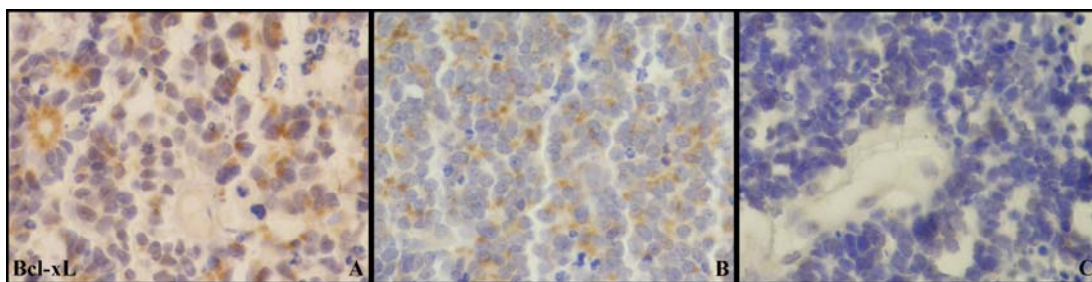
Legenda: **A** - positividade difusa de APAF-1, tanto nas células próximas ao vaso quanto nas distantes; **B** - detalhe da positividade difusa de APAF-1 nas rosetas; **C** - amostra negativa

Figura 17 - Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de APAF-1 (policlonal).



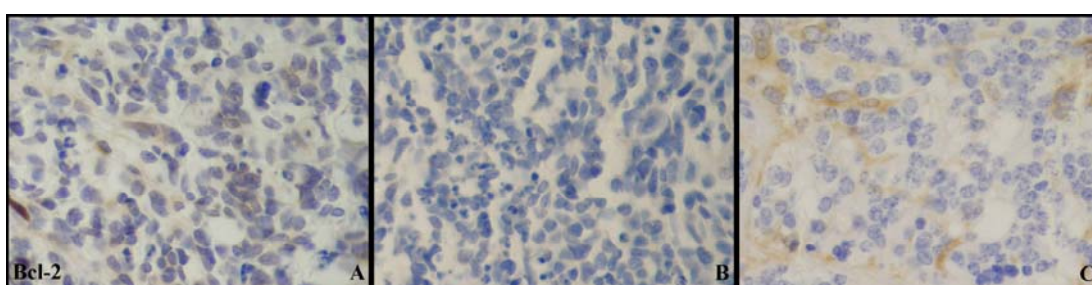
Legenda: **A** e **B** - expressão pouco intensa e difusa de pró-caspase-3; **C** - amostra negativa.

Figura 18 - Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de pro-caspase-3 (clone E61).



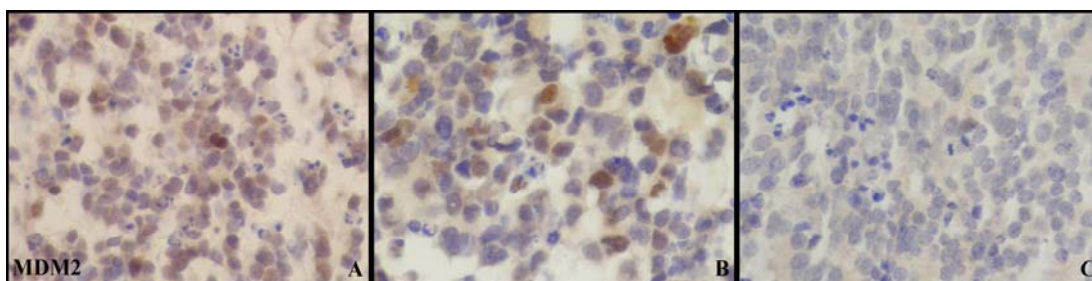
Legenda: A e B - expressão de Bcl-x_L com reforço da intensidade nas rosetas em A e padrão “dot” paranuclear em B. C - amostra negativa.

Figura 19 - Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de Bcl-x_L (policlonal).



Legenda: A - única amostra positiva demonstrando fraca e difusa positividade no citoplasma; B - amostra negativa; C - amostra negativa demonstrando astrócitos reativos expressando Bcl-2.

Figura 20 - Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de Bcl-2 (clone 124).



Legenda: A e B - fraca e difusa expressão nuclear de MDM2; C - amostra negativa.

Figura 21 - Fotomicroscopia da reação imunoistoquímica de MDM2 (clone SMP14).

As medidas da expressão das reações imunoistoquímicas também demonstraram um predomínio na expressão de moléculas que promovem a apoptose.

Das proteínas estudadas que são consideradas pró-apoptóticas, as reações para APAF-1, p53, pró-caspase-3, Bax, PUMA e Smac/DIABLO foram positivas em mais que 50% dos casos. Somente Bak e Bim-long, proteínas que também promovem apoptose, apresentaram resultado negativo em mais da metade dos casos.

Por outro lado, as proteínas Bcl-2, Bcl-x_L e MDM2 que têm função ligada à inibição da apoptose, foram pouco expressas nessas amostras de retinoblastoma.

Os resultados das avaliações semiquantitativas das reações imunoistoquímicas realizadas através da microscopia óptica foram sumarizadas na Tabela 10.

Nas Tabelas 11 e 12 estão as médias e desvio padrão das medidas das reações feitas na plataforma ACIS III®.

Tabela 10 - Expressão à imunoistoquímicas das proteínas avaliadas por microscopia óptica.

Proteína	Função na apoptose	(%) de amostras negativas Escore < 3	(%) de amostras positivas Escore ≥ 3
APAF-1	Pró-apoptótica	26,4 (n = 23)	73,6 (n = 64)
Bak	Pró-apoptótica	98,9 (n = 88)	1,1 (n = 01)
Bax	Pró-apoptótica	13,5 (n = 12)	86,5 (n = 77)
Bcl-2	Antiapoptótica	98,9 (n = 88)	1,1 (n = 01)
Bcl-x _L	Antiapoptótica	61,4 (n = 51)	38,6 (n = 32)
Bim _{LONG}	Pró-apoptótica	73,9 (n = 65)	26,1 (n = 23)
MDM2	Antiapoptótica	97,7 (n = 84)	2,3 (n = 02)
p53	Pró-apoptótica	7,8 (n = 07)	92,2 (n = 83)
Procaspase 3	Pró-apoptótica	33,8 (n = 25)	66,2 (n = 49)
PUMA	Pró-apoptótica	34,1 (n = 29)	65,9 (n = 56)
Smac/DIABLO	Pró-apoptótica	33,3 (n = 29)	66,7 (n = 58)

Tabela 11 - Expressão imunoistoquímica das proteínas de expressão citoplasmática avaliadas na plataforma ACIS III®.

Marcador	Intensidade	Porcentagem de área corada (%)	Produto: Intensidade x porcentagem
APAF-1	152,6 ± 15,8	88,4 ± 13,8	136,7 ± 31,0
Bak	52,8 ± 3,5	3,0 ± 2,2	1,6 ± 1,2
Bax	102,3 ± 12,3	85,9 ± 16,0	89,2 ± 23,3
Bcl-2	55,9 ± 4,4	7,2 ± 5,8	4,2 ± 3,9
Bcl-x _L	77,2 ± 8,4	54,0 ± 21,2	43,0 ± 19,9
Bim _{LONG}	72,6 ± 14,4	47,4 ± 23,2	37,0 ± 24,7
Caspase-3 clivada	106,3 ± 14,5	25,5 ± 18,2	29,2 ± 24,3
Procaspase3	78,0 ± 8,2	50,6 ± 16,3	40,0 ± 15,3
PUMA	94,0 ± 15,9	63,4 ± 17,9	61,7 ± 25,0
Smac/DIABLO	110,0 ± 14,7	77,8 ± 18,0	87,3 ± 28,3

Tabela 12 - Expressão imunoistoquímica das proteínas de expressão nuclear avaliadas na plataforma ACIS III®.

Marcador	Intensidade	Porcentagem de núcleos positivos
Caspase-3 clivada	109,1 ± 12,1	44,5 ± 19,5
MDM2	77,4 ± 7,7	41,5 ± 16,2
p53	110,4 ± 15,4	81,6 ± 20,9

4.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA AVALIAÇÃO PELA MICROSCOPIA ÓPTICA E DAS MEDIDAS OBTIDAS PELO ACIS III®

Para a comparação dos dois resultados, foram utilizados como referência os valores obtidos pela microscopia óptica. Os parâmetros obtidos pelo ACIS III® como intensidade da coloração e porcentagem da área corada em marrom, além do produto destes dois parâmetros foram comparados pelas curvas ROC (“Receiver operating characteristic”).

Foram considerados como valores de corte os pontos das curvas ROC mais próximos da extremidade superior esquerda dos gráficos, o ponto (0,1). Com esses valores de corte, foi calculado o índice kappa de concordância e a porcentagem de casos com resultados coincidentes pelos dois métodos.

A Tabela 13 demonstra esses cálculos para os marcadores citoplasmáticos. A porcentagem de área marrom foi o parâmetro que apresentou maior área sob a curva ROC em três marcadores: APAF-1, Bax e Smac/DIABLO. A Tabela 14 demonstra esses cálculos para os marcadores nucleares, que apresentaram maior área sob a curva do parâmetro porcentagem de núcleos corados.

Tabela 13 - Comparação das áreas sob a curva ROC para cada marcador citoplasmático e escolha do ponto de corte baseado no ponto da curva ROC mais próximo do ponto (0,1).

Marcador	Área sob a curva ROC	Erro padrão	Valor p	Intervalo de confiança	Ponto de corte
APAF-1 intensidade	0,86	0,04	p<0,001	(0,78–0,94)	148,5
APAF-1 porcentagem	0,90	0,04	p<0,001	(0,83–0,97)	91,2%
APAF-1 produto	0,89	0,04	p<0,001	(0,82–0,97)	126,42
Bak intensidade	0,85	0,04	p = 0,24	(0,77–0,93)	55,5
Bak porcentagem	1,00	0,00	p = 0,09	(1,00–1,00)	12,5%
Bak produto	1,00	0,00	p = 0,09	(1,00–1,00)	6,92
Bax intensidade	0,75	0,07	p<0,001	(0,62–0,88)	96,5
Bax porcentagem	0,92	0,05	p<0,001	(0,83–1,00)	81,8%
Bax produto	0,90	0,05	p<0,001	(0,81–1,00)	74,78
Bcl-2 intensidade	1,00	0,00	p = 0,09	(1,00–1,00)	68,5
Bcl-2 porcentagem	1,00	0,00	p = 0,09	(1,00–1,00)	34,8%
Bcl-2 produto	1,00	0,00	p = 0,09	(1,00–1,00)	23,5
Bcl-x _L intensidade	0,87	0,04	p<0,001	(0,79–0,95)	77,5
Bcl-x _L porcentagem	0,90	0,03	p<0,001	(0,83–0,97)	59,6%
Bcl-x_L produto	0,92	0,03	p<0,001	(0,86–0,98)	46,09
Bim_{LONG} intensidade	0,91	0,03	p<0,001	(0,84–0,98)	73,5
Bim _{LONG} porcentagem	0,87	0,04	p<0,001	(0,79–0,95)	52,4%
Bim _{LONG} produto	0,90	0,03	p<0,001	(0,83–0,97)	39,56
Procaspace 3 intensidade	0,70	0,07	p = 0,006	(0,56–0,84)	74,5
Procaspace 3 porcentagem	0,86	0,05	p<0,001	(0,77–0,96)	46,4%
Procaspace 3 produto	0,89	0,04	p<0,001	(0,81–0,97)	36,2
PUMA intensidade	0,86	0,04	p<0,001	(0,78–0,95)	88,0
PUMA porcentagem	0,81	0,05	p<0,001	(0,71–0,91)	58,8%
PUMA produto	0,86	0,05	p<0,001	(0,77–0,95)	48,56
Smac intensidade	0,61	0,07	p = 0,098	(0,48–0,75)	110,5
Smac porcentagem	0,74	0,06	p<0,001	(0,62–0,86)	85,0%
Smac produto	0,70	0,07	p = 0,003	(0,57–0,83)	72,35

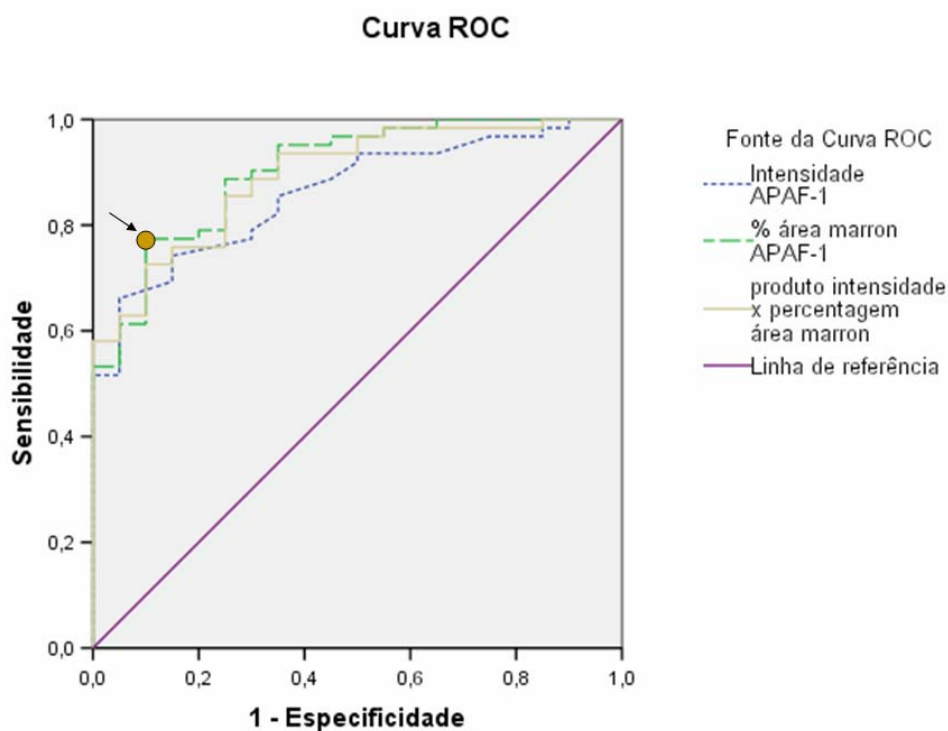


Figura 22 - Curva ROC demonstrando a comparação entre as medidas do ACIS III® e as medidas da microscopia óptica que foram utilizadas como referência. A seta mostra o ponto da curva mais próximo do vértice superior esquerdo (ponto 0,1) do gráfico.

Para os marcadores imunoistoquímicos de padrão nuclear, a porcentagem de núcleos corados foi o parâmetro com maior área sob a curva ROC (Figura 22).

Tabela 14 – Comparação das áreas sob a curva ROC dos marcadores imunoistoquímicos de padrão nuclear.

Marcador	Área sob a curva ROC	Erro padrão	Valor p	Intervalo de confiança	Ponto de corte
MDM2 intensidade	0,95	0,04	p = 0,032	(0,87–1,02)	85,5
MDM2 porcentagem	0,96	0,02	p = 0,026	(0,92-1,00)	67,3%
p53 intensidade	0,98	0,02	p<0,001	(0,95-1,01)	96,0
p53 porcentagem	0,98	0,01	p<0,001	(0,95-1,01)	55,7%

Após o cálculo do melhor ponto de corte, cada medida do ACIS III® foi considerada positiva ou negativa dependendo se a medida era maior ou menor que este valor. Os parâmetros que apresentaram melhor índice de concordância kappa foram: o produto intensidade x porcentagem para os marcadores citoplasmáticos (Tabela 15) e a porcentagem de núcleos corados para os marcadores nucleares (Tabela 16).

Tabela 15 - Índice kappa de concordância entre os valores obtidos na microscopia óptica e os valores obtidos através da estratificação dos resultados obtidos no ACIS III® para os marcadores citoplasmáticos.

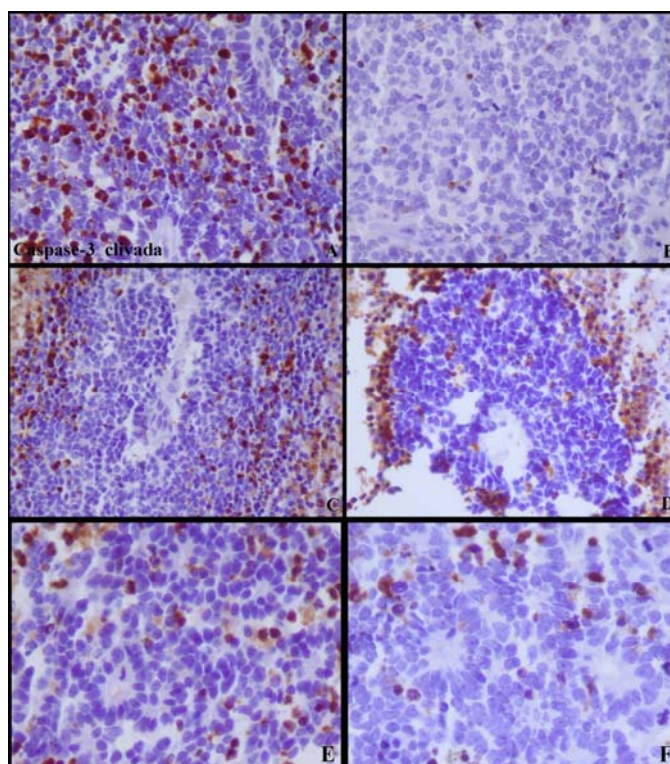
Marcador	Índice Kappa	Erro padrão	Significância	Intervalo de confiança	Nível de concord.	%casos concordes
APAF-1 intensidade	0,49	0,10	<0,001	0,28-0,69	Moderado	76,8
APAF-1 porcentagem	0,56	0,09	<0,001	0,37-0,75	Moderado	80,5
APAF-1 produto	0,57	0,10	<0,001	0,37-0,75	Moderado	82,9
Bak intensidade	0,09	0,09	0,038	-0,31-0,50	Mínimo	82,0
Bak porcentagem	1,00	0,00	<0,001	1,00-1,00	Excelente	100,0
Bak produto	1,00	0,00	<0,001	1,00-1,00	Excelente	100,0
Bax intensidade	0,29	0,11	0,003	0,03-0,54	Baixo	74,7
Bax porcentagem	0,60	0,11	<0,001	0,36-0,77	Moderado	87,4
Bax produto	0,57	0,11	<0,001	0,34-0,81	Moderado	87,4
Bcl-2 intensidade	1,00	0,00	<0,001	1,00-1,00	Excelente	100,0
Bcl-2 porcentagem	1,00	0,00	<0,001	1,00-1,00	Excelente	100,0
Bcl-2 produto	1,00	0,00	<0,001	1,00-1,00	Excelente	100,0
Bcl-x _L intensidade	0,63	0,08	<0,001	0,47-0,80	Bom	81,7
Bcl-x _L porcentagem	0,70	0,08	<0,001	0,55-0,86	Bom	85,4
Bcl-x_L produto	0,75	0,07	<0,001	0,61-0,90	Bom	87,8
Bim_{LONG} intensidade	0,62	0,09	<0,001	0,44-0,80	Bom	83,5
Bim _{LONG} porcentagem	0,54	0,09	<0,001	0,35-0,73	Moderado	78,8
Bim _{LONG} produto	0,59	0,09	<0,001	0,41-0,78	Moderado	82,4
Procaspase3 intensidade	0,36	0,12	0,002	0,12-0,59	Baixo	71,2
Procaspase3 porcentagem	0,61	0,10	<0,001	0,42-0,80	Moderado	82,2
Procaspase 3 produto	0,59	0,10	<0,001	0,40-0,78	Moderado	80,8
PUMA intensidade	0,61	0,09	<0,001	0,43-0,80	Bom	82,9
PUMA porcentagem	0,49	0,10	<0,001	0,29-0,69	Moderado	76,8
PUMA produto	0,64	0,09	<0,001	0,47-0,82	Bom	84,2
Smac intensidade	0,14	0,08	0,123	-0,06-0,33	Mínimo	51,8
Smac porcentagem	0,31	0,09	0,002	0,12-0,51	Baixo	64,7
Smac produto	0,38	0,11	0,001	0,17-0,60	Baixo	72,4

Tabela 16 - Índice kappa de concordância entre os valores obtidos na microscopia óptica e os valores obtidos através da estratificação dos resultados obtidos no ACIS III® para os marcadores nucleares.

Marcador	Índice Kappa	Erro padrão	Significância	Intervalo de confiança	Nível de concordância	% casos concordes
MDM2 intensidade	0,28	0,16	<0,001	-0,17-0,72	Baixo	89,4
MDM2 porcentagem	0,56	0,23	<0,001	0,06-1,05	Moderado	96,5
p53 intensidade	0,71	0,12	<0,001	0,46-0,96	Bom	94,4
p53 porcentagem	0,86	0,10	<0,001	0,68-1,05	Excelente	97,8

4.5 ÍNDICE APOPTÓTICO E A EXPRESSÃO DE CASPASE-3 CLIVADA

A reação de imunoistoquímica para caspase-3 clivada (Figura 23) apresentou interessantes resultados. A caspase-3 clivada que marca células já comprometidas com o processo de apoptose corou algumas amostras de retinoblastoma difusamente enquanto em outras há raras células coradas. Entretanto, há maior número de células coradas nas áreas externas dos manguitos tumorais ou em áreas limítrofes entre tumor viável e necrose. A caspase-3 clivada também corou células em área bem e pouco diferenciadas do retinoblastoma.



Legenda: **A** amostras de retinoblastoma com inúmeras células coradas pela caspase-3 clivada; **B** amostra com raras células coradas; **C** amostras corando células no limite entre tumor viável e tumor necrótico; **D** demonstrando a expressão nas partes externas dos manguitos tumorais; **E** em tumores pouco diferenciados e **F** e em tumores bem diferenciados.

Figura 23 - Fotomicroscopia de reação imunoistoquímica para caspase-3 clivada.

O índice apoptótico foi medido em 92 amostras e apresentou valor médio de 0,12 com desvio padrão de 0,12 (Tabela 17). O Histograma (Figura 24) apresenta a distribuição destes valores e demonstra que mais de 30% das amostras apresentaram valores menores que 0,05.

Tabela 17 - Índice Apoptótico.

Índice Apoptótico (n = 92)	Mediana	0,09
	Média	0,12
	Desvio Padrão (DP)	0,12
	Mínimo	0
	Máximo	0,72

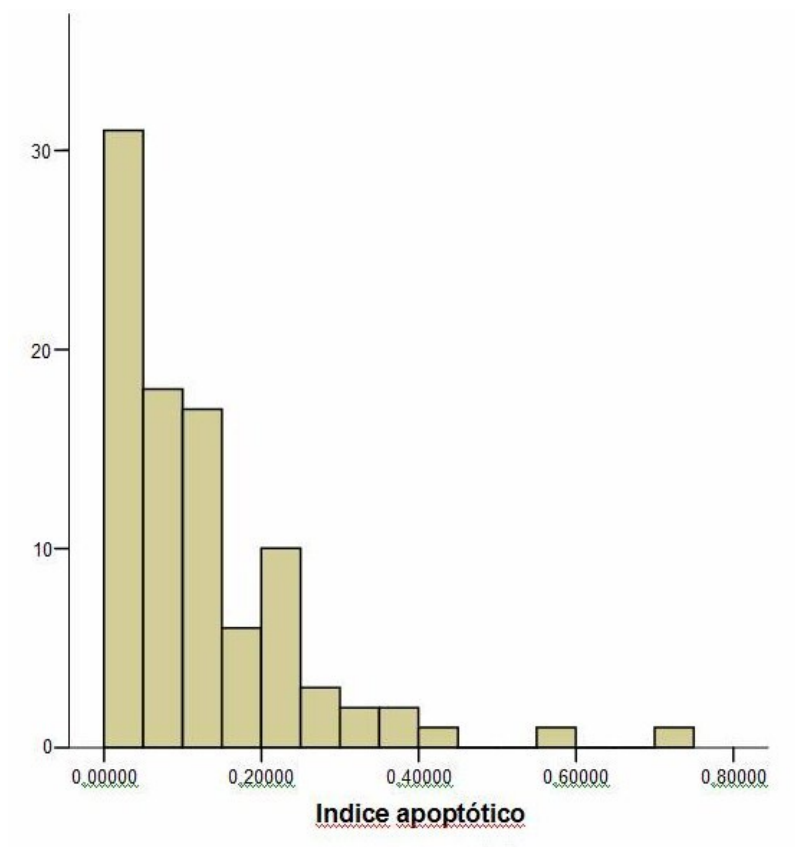


Figura 24 - Distribuição dos valores do índice apoptótico medido

4.6 CORRELAÇÃO ENTRE AS MEDIDAS QUANTITATIVAS DO ÍNDICE APOPTÓTICO E AS MEDIDAS DA CASPASE-3 CLIVADA REALIZADAS NO ACIS III®

A caspase-3 clivada foi medida pela plataforma ACIS III® através de programa de avaliação de citoplasma e também pelo programa de avaliação de marcador nuclear. A correlação entre os valores do índice apoptótico medido pela contagem de células marcadas pela caspase-3 clivada e as medidas do ACIS III® apresentaram correlação positiva e significativa (Tabela 18).

Tabela 18 - Correlação de AI e medidas da caspase-3 clivada feitas no ACIS III®.

Parâmetro ACIS III®	Índice Apoptótico	
	rho	Significância
Caspase 3 clivada citoplasma - produto	0,53	<0,001
Caspase 3 citoplasma - intensidade	0,37	<0,001
Caspase 3 citoplasma - porcentagem	0,55	<0,001
Caspase 3 clivada núcleo - porcentagem	0,44	<0,001
Caspase 3 clivada núcleo - intensidade	0,47	<0,001

Realizado Teste de correlação de Spearman para variáveis sem distribuição normal

4.7 CORRELAÇÃO ENTRE AS MEDIDAS DE EXPRESSÃO FEITAS PELO ACIS III® E O ÍNDICE APOPTÓTICO

As medidas da expressão das proteínas estudadas foram correlacionada com o índice apoptótico e a medida obtida pelo ACIS III® de caspase-3 clivada. Para as variáveis que utilizaram o programa que mede a expressão no citoplasma, foram correlacionados apenas o produto da intensidade x porcentagem da área. Para as variáveis que utilizaram o programa de núcleo, foram correlacionas apenas as medidas de porcentagem de núcleos corados (Tabela 19). Só apresentaram correlação significativa de forma sustentada (para as três medidas) Bak, Bax, Bcl-x_L e pró-caspase-3. Entretanto, Bax e pró-caspase-3, proteínas pró-apoptóticas se correlacionaram negativamente com a expressão de casapase-3 clivada.

Tabela 19 - Correlação entre caspase-3 clivada e proteínas relacionadas à apoptose.

	Índice Apoptótico		Caspase-3 clivada- (citoplasma) produto		Caspase-3 clivada (núcleo) – porcentagem	
	rho ^a	sig	rho ^a	sig		sig
APAF-1	-0,29	0,008	0,12	0,28	r = 0,31 ^b	0,005
Bak	0,26	0,020	0,28	0,010	rho = 0,32 ^a	0,003
Bax	- 0,34	0,001	- 0,37	0,001	r = -0,29 ^b	0,007
Bcl-2	-0,15	0,15	0,11	0,31	rho = 0,29 ^a	0,008
Bcl-x _L	-0,41	<0,001	- 0,43	<0,001	r = -0,38 ^b	< 0,001
Bim _{LONG}	- 0,48	<0,001	- 0,43	<0,001	rho = -0,21 ^a	0,06
MDM2	-0,32	0,002	- 0,11	0,32	r = -0,12 ^b	0,29
Pró-caspase	-0,47	<0,001	- 0,52	<0,001	r = -0,39 ^b	< 0,001
PUMA	-0,23	0,030	- 0,06	0,57	r = 0,08 ^b	0,94
Smac/DIABLO	0,26	0,020	0,09	0,44	r = -0,09 ^b	0,41
p53	-0,32	0,002	-0,14	0,19	rho = -0,16 ^a	0,14

Legenda:**a.** Teste de correlação de Spearman para variáveis sem distribuição normal**b.** Teste de correlação de Pearson para variáveis com distribuição normal**sig** = significância

Bcl-x_L e Bak apresentaram correlação compatível com sua função na células. Enquanto Bak apresentou correlação positiva com a expressão de caspase-3 clivada e índice apoptótico, Bcl-x_L apresentou correlação negativa, ou seja, quanto maior a expressão de Bcl-x_L, menor a apoptose no retinoblastoma (Figura 25).

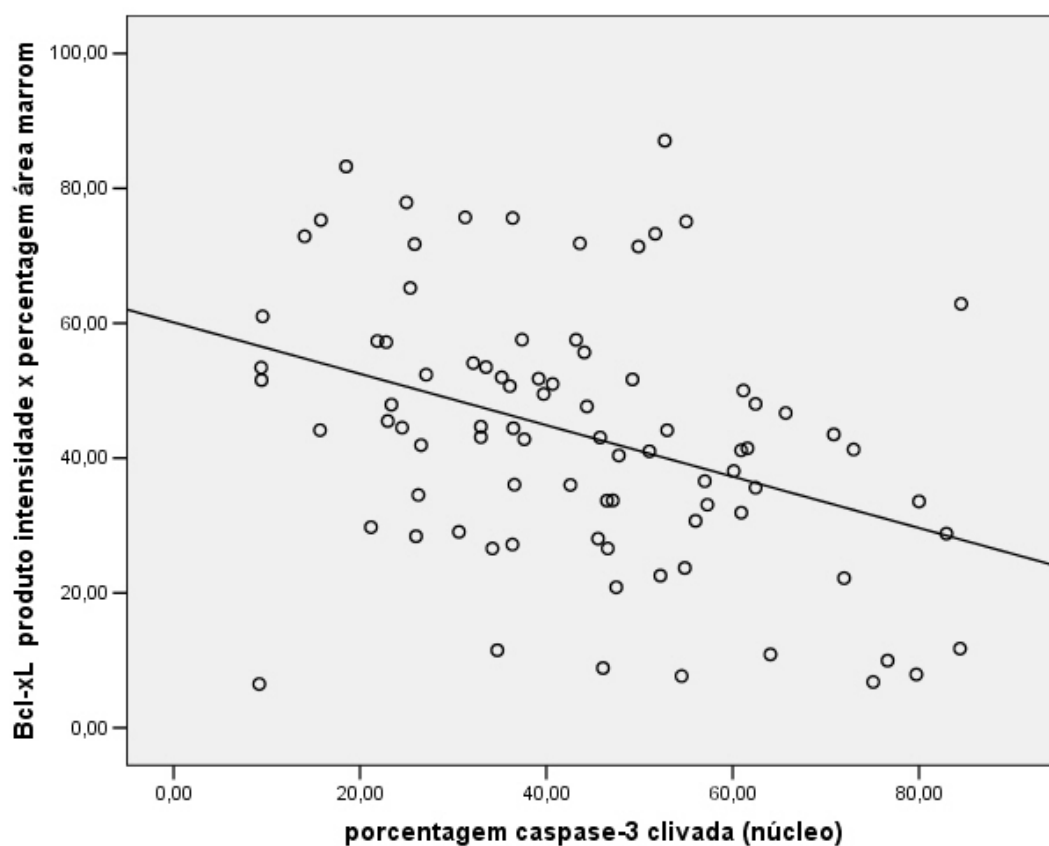


Figura 25 - Correlação entre expressão de Bcl-x_L e caspase-3 clivada

Como p53 é um importante fator de transcrição das proteínas pró-apoptóticas, também realizamos o cálculo da correlação entre expressão da p53 e das outras proteínas (Tabela 20). Exceto por Smac/DIABLO, todas as proteínas apresentaram correlação entre sua expressão e a expressão de p53. E entre estas, apenas Bak apresentou correlação negativa, as demais apresentaram correlação positiva, ou seja, quanto maior a expressão de p53, maior a expressão destas proteínas.

Tabela 20 - Correlação entre expressão de p53 com a expressão das demais proteínas.

	Porcentagem de p53	
	Rho	Significância
APAF-1	0,30	0,006
Bak	- 0,21	0,040
Bax	0,64	<0,001
Bcl-2	0,30	0,004
Bcl-x _L	0,63	<0,001
Bim _{LONG}	0,38	<0,001
Mdm2	0,60	<0,001
Pró-caspase-3	0,55	<0,001
PUMA	0,36	0,001
Smac/DIABLO	0,16	0,14

Realizado Teste de correlação de Spearman para variáveis sem distribuição normal

4.8 VERIFICAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O ÍNDICE APOPTÓTICO E A EXTENSÃO TUMORAL

A Tabela 21 demonstra que não houve associação entre o índice apoptótico e a extensão do tumor. Os retinoblastomas extraoculares apresentaram média do índice apoptótico um pouco maior que a média dos retinoblastomas intraoculares.

Tabela 21 - Verificação de associação entre índice apoptótico e extensão tumoral.

		Intraocular			Extraocular		
		N	Média	DP	N	Média	DP
Índice apoptótico	p = 0.28*	79	11,8	12,6	13	13,3	10,4

* Nível de significância estatística segundo o teste de Mann-Whitney (variável não têm distribuição normal)

4.9 VERIFICAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA E A EXTENSÃO TUMORAL

Nenhum dos marcadores imunoistoquímicos avaliados através da microscopia óptica apresentaram associação com a extensão tumoral. Esses dados estão relacionados na Tabela 22.

Tabela 22 - Expressão imunoistoquímica e extensão tumoral.

		Intraocular	Extraocular	Significância
APAF-1	negativo	19 (21,8%)	4 (4,6%)	p = 0,45*
	positivo	58 (66,7%)	6 (6,9%)	
p53	negativo	7 (7,8%)	0	p = 0,59*
	positivo	72 (80,0%)	11 (12,2%)	
Pro-caspase 3	negativo	21 (28,4%)	4 (5,4%)	p = 0,43*
	positivo	45 (60,8%)	4 (5,4%)	
Proteína Bak	negativo	77 (86,5%)	11 (12,4%)	p = 1,00*
	positivo	1 (1,1%)	0	
Proteína Bax	negativo	10 (11,2%)	2 (2,4%)	p = 0,64*
	positivo	68 (76,4%)	9 (11,6%)	
Proteína Bcl-2	negativo	78 (87,6%)	10 (11,2%)	p = 0,12*
	positivo	0	1 (1,1%)	
Proteína Bcl-x _L	negativo	45 (54,2%)	6 (7,2%)	p = 0,42*
	positivo	30 (36,1%)	2 (2,4%)	
Proteína Bim Long	negativo	55 (62,5%)	10 (11,4%)	p = 0,28*
	positivo	22 (25,0%)	1 (1,1%)	
Proteína MDM2	negativo	74 (86,0%)	10 (11,6%)	p = 1,00*
	positivo	2 (2,3%)	0	
PUMA	negativo	25 (29,4%)	4 (4,7%)	p = 1,00*
	positivo	49 (57,6%)	7 (8,2%)	
Smac/DIABLO	negativo	24 (27,6%)	5 (5,7%)	p = 0,29*
	positivo	53 (60,9%)	5 (5,7%)	

* Teste exato de Fisher (um dos valores esperados foi menor que 5)

Com os dados obtidos através da plataforma ACIS III®, foram realizados testes estatísticos para comparar as médias obtidas dos valores de intensidade da coloração e porcentagem de área corada (ou porcentagem de núcleos corados nos marcadores nucleares). A p53 apresentou uma associação com o estadio do tumor com valores mais altos nos tumores intraoculares do que nos tumores extraoculares (Tabela 23).

Tabela 23 - Extensão tumoral e a expressão imunoistoquímica medida no ACIS III®.

		Intraocular			Extraocular		
		N	Média	DP	N	Média	DP
APAF-1 produto intensidade x porcentagem área corada	p = 0,39*	74	137,6	30,9	8	128,1	32,7
Bak produto intensidade x porcentagem área corada	p = 0,11**	79	1,5	1,2	13	2,1	1,3
Bax produto intensidade x porcentagem área corada	p = 0,08*	77	91,1	22,6	13	77,5	25,2
Bcl-2 produto intensidade x porcentagem área corada	p = 0,79**	79	4,0	3,3	11	5,6	7,0
Bcl-x _L produto intensidade x porcentagem área corada	p = 0,24*	78	44,1	19,6	12	36,0	21,7
Bim-long produto intensidade x porcentagem área corada	p = 0,27**	78	38,0	25,4	10	28,8	17,2
MDM2 porcentagem de núcleos corados	p = 0,73*	78	41,3	15,7	11	43,1	19,6
p53 porcentagem de núcleos corados	p = 0,04**	79	83,4	19,7	13	70,6	25,1
Pro-caspase 3 produto intensidade x porcentagem área corada	p = 0,17*	71	40,9	15,6	9	33,5	10,8
PUMA produto intensidade x porcentagem área corada	p = 0,11*	76	63,2	25,6	10	50,0	16,8
Smac/DIABLO produto intensidade x porcentagem área corada	p = 0,09*	76	85,5	28,6	10	101,4	22,0

* Nível de significância estatística segundo o teste t de Student (variáveis com distribuição normal)

** Nível de significância estatística segundo o teste de Mann-Whitney (variáveis que não têm distribuição normal)

Na análise univariada segundo as medidas semiquantitativas feitas através da microscopia óptica, a expressão de Bcl-2 apresentou associação com pior sobrevida. Entretanto, não é possível uma conclusão pois somente a amostra de um paciente foi positiva para Bcl-2. Os demais marcadores imunoistoquímicos não apresentaram resultados significativos (Tabela 24).

Tabela 24 - Sobrevida segundo as medidas semi-quantitativas feitas através da microscopia óptica.

Marcador imunoistoquímico		Sobrevida global	Significância
APAF-1	Negativo (n = 23)	91,3%	p = 0,26
	Positivo (n = 64)	96,8%	
Bcl-2	Negativo (n = 88)	97,7%	p < 0,001*
	Positivo (n = 01)	0%	
Bak	Negativo (n = 88)	96,6%	p = 0,85
	Positivo (n = 01)	100,0%	
Bax	Negativo (n = 12)	90,0%	p = 0,09
	Positivo (n = 77)	98,7%	
Bcl-x _L	Negativo (n = 51)	95,9%	p = 0,25
	Positivo (n = 32)	100,0%	
Bim _{LONG}	Negativo (n = 65)	96,8%	p = 0,39
	Positivo (n = 23)	100,0%	
MDM2	Negativo (n = 84)	97,6%	p = 0,83
	Positivo (n = 02)	100,0%	
p53	Negativo (n = 7)	100,0%	p = 0,55
	Positivo (n = 83)	95,1%	
Pró-caspase 3	Negativo (n = 25)	100,0%	-
	Positivo (n = 49)	100,0%	
PUMA	Negativo (n = 29)	93,1%	p = 0,24
	Positivo (n = 56)	98,1%	
Smac/DIABLO	Negativo (n = 29)	96,3%	p = 0,57
	Positivo (n = 58)	98,3%	

* Apenas as células tumorais de um paciente foram positivas para bcl-2.

Para a avaliação de sobrevida segundo as medidas realizadas através da plataforma ACIS III®, foi utilizada a estratégia de cálculo da sobrevida utilizando-se pontos de corte nos percentis 25, 50 e 75 das variáveis fornecidas pela plataforma (Tabela 25). Foram observadas que duas medidas apresentaram significância quando o ponto de corte foi no percentil 75: porcentagem de área corada por Bak e intensidade de coloração por Smac/DIABLO. Entretanto esses cálculos não são confiáveis devido ao pequeno numero de eventos (quatro óbitos)

Tabela 25 - Sobrevida global segundo as medidas obtidas na plataforma ACIS III®.

		P25			P50			P75		
		Ponto corte	SG	Valor p	Ponto corte	SG	Valor p	Ponto corte	SG	Valor p
APAF-1	Intensidade	≤142	100,0	0,40	≤152	97,6	0,98	≤165	98,4	0,33
		>142	96,7		>152	97,5		>165	94,4	
	% área	≤83,5	100,0	0,40	≤93,2	100,0	0,16	≤97,8	98,4	0,41
		>83,5	96,7		>93,2	95,1		>97,8	95,0	
Bcl-2	Intensidade	≤52	91,3	0,26	≤55	95,9	0,84	≤58	97,1	0,15
		>52	96,9		>55	94,9		>58	89,2	
	% área	≤40,2	95,5	0,98	≤57,5	95,6	0,98	≤86,6	97,0	0,24
		>40,2	95,5		>57,5	95,4		>86,6	90,9	
Bak	Intensidade	≤50	91,3	0,26	≤52	98,1	0,37	≤54	97,2	0,65
		>50	96,9		>52	94,7		>54	95,0	
	% área	≤16,2	100,0	0,31	≤25,3	100,0	0,07	≤38,2	100,0	0,002
		>16,2	95,5		>25,3	93,2		>38,2	86,4	
Bax	Intensidade	≤93	95,5	0,72	≤103	95,5	0,55	≤110	95,5	0,32
		>93	97,0		>103	97,7		>110	100,0	
	% área	≤78,9	90,5	0,07	≤92,0	95,4	0,53	≤96,7	95,5	0,32
		>78,9	98,5		>92,0	97,8		>96,7	100,0	
Bcl-x_L	Intensidade	≤71	95,5	0,40	≤76	97,7	0,96	≤82	96,9	0,39
		>71	98,5		>76	97,8		>82	100,0	
	% área	≤42,4	100,0	0,41	≤56,4	95,4	0,15	≤67,9	97,0	0,41
		>42,4	97,0		>56,4	100,0		>67,9	100,0	
Bim_{LONG}	Intensidade	≤63	100,0	0,41	≤69	97,8	0,94	≤78	98,5	0,43
		>63	96,9		>69	97,6		>78	95,5	
	% área	≤32,1	100,0	0,41	≤46,9	97,7	0,99	≤67,9	98,5	0,43
		>32,1	96,9		>46,9	97,7		>67,9	95,5	
MDM2	Intensidade	≤29,3	95,2	0,68	≤38,8	95,5	0,56	≤53,6	97,0	0,74
		>29,3	97,0		>38,8	97,7		>53,6	95,5	
	% área	≤72	96,0	0,84	≤76	95,5	0,56	≤84	97,2	0,53
		>72	96,8		>76	97,7		>84	94,1	
p53	Intensidade	≤75,9	95,5	0,70	≤90,9	95,6	0,56	≤95,3	95,5	0,31
		>75,9	97,1		>90,9	97,8		>95,3	100,0	
	% área	≤101	95,5	0,70	≤113	95,7	0,58	≤120	95,7	0,33
		>101	97,1		>113	97,7		>120	100,0	
Pró-caspase 3	Intensidade	≤73	100,0	0,47	≤77	100,0	0,21	≤82	96,6	0,42
		>73	96,8		>77	95,5		>82	100,0	
	% área	≤38,7	94,7	0,39	≤51,7	97,5	0,98	≤61,4	96,6	0,40
		>38,7	98,3		>51,7	97,4		>61,4	100,0	
PUMA	Intensidade	≤82	100,0	0,43	≤91	100,0	0,18	≤107	98,4	0,43
		>82	96,9		>91	95,6		>107	95,5	
	% área	≤51,1	95,2	0,41	≤64,7	97,6	0,99	≤76,0	96,8	0,40
		>51,1	98,4		>64,7	97,7		>76,0	100,0	
Smac/DIABLO	Intensidade	≤101	100,0	0,40	≤111	100,0	0,08	≤118	100,0	0,006
		>101	96,8		>111	94,1		>118	88,9	
	% área	≤65,5	100,0	0,41	≤83,3	97,7	0,98	≤91,5	98,4	0,39
		>65,5	96,8		>83,3	97,6		>91,5	95,9	

A mesma estratégia para o cálculo da sobrevida foi utilizada para a avaliação do índice apoptótico. Quando o ponto de corte foi avaliado no percentil 75, houve uma tendência ($p = 0,057$) de associação indireta entre índice apoptótico e melhor sobrevida (Tabela 26). Pacientes com amostras apresentando índice apoptótico menor tem melhor sobrevida global.

Tabela 26 - Análise univariada de sobrevida segundo o índice apoptótico.

	Ponto corte	P25		Ponto corte	P50		Ponto corte	P75	
		SG	Valor p		SG	Valor p		SG	Valor p
Índice apoptótico	$\leq,034$	95,7	0,97	$\leq,085$	97,8	0,31	$\leq,174$	98,5	0,057
	$>,034$	95,6		$>,085$	93,5		$>,174$	87,0	

5 DISCUSSÃO

A amostra de pacientes portadores de retinoblastoma tratados no período de 1986 a 2000 no Hospital A.C. Camargo apresentou características tais como idade, sexo, proporção de pacientes com tumores bilaterais semelhantes a outras amostras já publicadas. Entretanto, a nossa amostra parece apresentar média de idade ao diagnóstico e proporção de pacientes com tumores bilaterais maiores que em outros estudos (MURPHREE 1998). É provável que isto seja consequência de tempo de encaminhamento prolongado e do encaminhamento de pacientes portadores de retinoblastoma bilateral para nosso hospital que é referência no tratamento do retinoblastoma.

No nosso estudo, foram incluídos apenas 22,3% dos pacientes tratados neste mesmo período. Quando comparamos as características dos pacientes incluídos neste estudo com as características de todos os pacientes, observaremos algumas diferenças. A primeira é que a taxa de sobrevida no grupo inteiro de pacientes foi de 87,9% e na amostra deste estudo foi de 95,6%. Isto foi devido aos critérios de exclusão utilizados. Dos 26 pacientes excluídos após a confecção da TMA, havia informação que sete pacientes (27%) foram a óbito. Dos excluídos, havia pacientes com estágios avançados da doença que foram submetidos à quimioterapia prévia, prontuários não encontrados de pacientes que foram a óbito e também, pacientes que foram excluídos por não apresentarem tumor viável na TMA. Esses retinoblastomas com extensa necrose podem realmente apresentar pior prognóstico. CHONG et al. (2006) descreveram que retinoblastomas extensivamente necróticos, quando

comparados com casos apresentando tumor viável, apresentam mais fatores de risco para doença metastática e morte como: invasão do nervo óptico, invasão pós laminar do nervo óptico e invasão da coróide.

A segunda diferença entre a amostra deste estudo e de todos os pacientes do Hospital A.C. Camargo é a porcentagem de pacientes com tumores bilaterais: no grupo completo havia 37% de pacientes com retinoblastoma bilateral enquanto que no grupo selecionado para estudo apenas 29% dos pacientes apresentavam tumores bilaterais. Pacientes com tumores bilaterais geralmente são frequentemente submetidos a tratamentos conservadores antes da cirurgia. Não houve diferenças significativas em relação a outros dados demográficos como idade e sexo.

Nos pacientes incluídos no estudo, a média de idade dos portadores de tumores bilaterais foi um pouco mais que a metade que a média de idade dos portadores de tumores unilaterais (18,0 vs 30,3 meses). Esta distribuição das idades corresponde à clássica descrição feita por KNUDSON (1971) que gerou sua teoria a respeito dos dois eventos mutacionais.

Nenhum paciente do estudo foi submetido à exenteração, um procedimento reservado para tratamento de retinoblastoma com maciça infiltração do tecido orbitário. Pacientes apresentando estas características passaram a receber tratamento quimioterápico antes da cirurgia a partir de 1987 (ANTONELI et al. 2003a).

A diferenciação do retinoblastoma foi estratificada em apenas duas categorias. Os tumores considerados como pouco diferenciados corresponderam a 63,4% dos casos. Há divergências na literatura a respeito da proporção de retinoblastomas diferenciados e indiferenciados. KHELFAOUI et al. (1996) classificaram apenas 16% dos retinoblastomas como pouco diferenciados enquanto

STANNARD et al. (1979) classificaram 74% dos retinoblastomas como pouco diferenciados. Nenhum dos dois grupos conseguiu associar a diferenciação do retinoblastoma com extensão tumoral ou sobrevida. Na nossa amostra, também não houve associação entre diferenciação e sobrevida ($p = 0,60$).

A invasão do nervo óptico foi detectada em 37,6% dos olhos enucleados, com 19,4% apresentando invasão pós-lâmina crivosa. Doze pacientes não apresentavam no laudo anátomo-patológico o status do nervo óptico e também não foram encontradas lâminas contendo os cortes histológicos do nervo óptico. KHELFAOUI et al. (1996), em estudo retrospectivo realizado na França com pacientes procedentes de diversos países e tratados no período de 1977-1990, demonstraram que 10% dos olhos enucleados apresentavam margem comprometida, 20% apresentavam invasão pós-laminar sem margem comprometida e 15% apresentavam invasão até a lâmina crivosa. CHANTADA et al. (2007), em estudo retrospectivo realizado na Argentina de pacientes tratados no período de 1989-2004, apresentaram resultados semelhantes, com 15,7% dos pacientes admitidos apresentando invasão pós-laminar sem comprometimento da margem do nervo óptico. SHIELDS et al. (1994) demonstraram resultados bem melhores, com apenas 5,9% dos pacientes apresentando invasão pós-laminar do nervo óptico, e apenas 0,6% apresentando margem do nervo óptico comprometida. Estes autores também demonstraram pior sobrevida nos pacientes com invasão pós-laminar do nervo óptico assim como no nosso estudo ($p = 0,049$). Entretanto, estes autores encontraram uma associação com pior sobrevida mesmo comparando somente os retinoblastomas sem margem comprometida.

A invasão da coróide foi estratificada também como focal ou maciça seguindo a descrição de KHELFAOUI et al. (1996). Esses autores estratificaram invasão dos folhetos oculares em cinco categorias (sem invasão, invasão focal da coróide, invasão maciça, invasão de esclera e invasão de tecidos extraoculares) e quando agruparam invasão maciça de coróide e invasão de esclera, encontraram associação deste grupo com maior risco de metástases. Na nossa amostra, não há associação com invasão de coróide e pior sobrevida. Entretanto, há associação entre invasão de esclera e pior sobrevida na análise univariada.

A média de tempo de seguimento destes pacientes foi de 11,5 anos, que é bastante satisfatório para avaliar sobrevida em pacientes com retinoblastoma, pois os óbitos decorrentes da neoplasia ocorrem geralmente nos cinco primeiros anos após o diagnóstico (BROADDUS et al. 2009). A presença de segundos tumores foi também avaliada no seguimento destes pacientes, e para esta avaliação, o tempo de seguimento precisa ser maior. Apesar de nas duas primeiras décadas de vida, os sobreviventes de retinoblastoma germinativo já apresentarem maior incidência de sarcomas (sarcomas de partes moles e osteossarcomas) que a população geral, é na quarta década de vida que há um aumento de até 15 vezes na incidência de neoplasias malignas em relação à população geral às custas do aumento na incidência de carcinomas e melanomas (MAREES et al. 2008). Na nossa amostra, quatro pacientes apresentaram segundas neoplasias. Dois apresentaram osteossarcoma e um apresentou pinealoblastoma, que são as segundas neoplasias frequentes em amostras com seguimento até 20 anos (MAREES et al. 2008).

O estudo imunoistoquímico do retinoblastoma foi realizado em lâminas contendo uma matriz tecidual (TMA). Este recurso que consiste em colocar amostras

de inúmeros pacientes em uma mesma lâmina têm sido frequentemente utilizado em pesquisas. Apresenta como principal vantagem o fato das amostras serem submetidas aos mesmos reagentes, anticorpos e condições de temperatura e umidade. A principal desvantagem é que a reação imunoistoquímica é feita em uma superfície de tecido tumoral muito menor que a superfície tumoral de uma lâmina tradicional.

O índice apoptótico medido pela imunoistoquímica através da marcação da caspase-3 clivada apresentou média de 120 células por 1000 células contadas e foi maior que a encontrada em outros estudos que utilizaram TUNEL ou ISEL. TATLIPINAR et al. (2002) apresentou uma média de índice apoptótico de $2,78 \pm 1,2$, ou seja, 28 por 1000 células. BELLAN et al (2002) verificaram a associação da expressão de p130, uma outra proteína do grupo do retinoblastoma, e demonstraram um índice apoptótico de $3,26 \pm 2,23$ ($n = 28$) em tumores que expressavam p130. Ou seja, o AI encontrado por esses autores é bem menor que os valores obtidos na nossa amostra. Isto pode ser devido ao método de detecção da apoptose utilizado. A utilização de caspase-3 clivada apresenta a vantagem de detectar a apoptose em suas fases mais iniciais (HUERTA et al. 2007). Quando começa a clivagem da caspase-3, a célula já está comprometida com a apoptose e a expressão deste marcador não parece corar células que não estejam em apoptose.

Nas comparações do índice apoptótico com a extensão e a sobrevida dos pacientes, a média do índice apoptótico foi maior no grupo de pacientes com tumores extraoculares que nos tumores intraoculares, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,284$) e pacientes que apresentaram índice apoptótico maior que 0,17 apresentaram na comparação das curvas de Kaplan-Meier tendência à pior sobrevida ($p = 0,057$).

Isto foi exatamente o oposto do que esperávamos. A nossa hipótese foi baseada nos estudos de KERIMOGLU et al. (2003) que encontraram menor índice apoptótico em pacientes que desenvolveram metástases e em estudos demonstrando a associação da hiperexpressão de proteínas antiapoptóticas como a Bcl-2 com pior prognóstico em linfomas difusos de grandes células B (RANTANEN et al. 2001) e em carcinomas uroteliais da bexiga (HUSSAIN et al. 2003). A partir destes estudos e de outros já citados, nós formulamos a hipótese de que quanto maior a apoptose celular, melhor a evolução do retinoblastoma. Ou que, quanto maior a resistência das células do retinoblastoma à apoptose, pior o prognóstico.

Entretanto, não foi o que observamos na nossa amostra. As amostras com maior apoptose apresentavam uma tendência a pior sobrevida. Isto pode ser explicado pela hipóxia no microambiente tumoral. A hipóxia é um dos maiores estímulos à apoptose (BRAS et al. 2005). Quando os tumores apresentam crescimento exagerado, os níveis de oxigênio diminuem nas células mais distantes dos vasos sanguíneos e estas células começam a consumir avidamente glicose e produzir ácido láctico, um fenômeno denominado efeito Warburg (1956) citado por KIM e DANG (2006, p.8927) descrito há mais de 80 anos. Os estudos atuais demonstraram que sob hipóxia, as células podem desencadear apoptose ou, em uma tentativa de sobreviver com baixos níveis de oxigênio, ativar enzimas do catabolismo anaeróbico. Para atingir este objetivo, a célula ativa um fator de transcrição denominado HIF (“Hypoxia inducible transcription factor”) que ativa também fatores que promovem a angiogênese. Desta forma, a hipóxia pode levar as células à apoptose ou pode levar a célula maligna a produzir mais fatores angiogênicos como o VEGF (“Vascular endothelial growth factor”). MARBACK et al (2003) demonstraram

que a angiogênese no retinoblastoma é um fator prognóstico para a disseminação do tumor e este é um fator prognóstico independente dos outros fatores prognósticos clássicos. Assim, podemos sugerir que a presença da apoptose no retinoblastoma pode ser consequência da hipóxia tumoral, que também leva o tumor a apresentar um fenótipo mais maligno.

A proteína p53 apresentou expressão pela imunohistoquímica em 92% das amostras, semelhante aos resultados encontrados por outros autores (YUGE et al. 1995; CHA et al. 2000). O anticorpo primário utilizado na reação é o clone DO7, que se liga a p53 normais ou mutantes.

Em outros tumores, a positividade da p53 está ligada a produção de proteínas mutantes, que tem tempo de meia vida maior no núcleo da célula (SJOGREN et al. 1996). Como o retinoblastoma raramente apresenta alterações no gene Tp53 (KATO et al. 1996) e a via do p53 está bloqueada pelas proteínas MDM2 e MDM4 (LAURIE et al. 2006; GUO et al. 2008), por que há positividade imunohistoquímica para p53 no retinoblastoma? A primeira explicação seria que diferente de MDM2, que induz a degradação da p53 por proteases, MDM4 estabiliza a p53 dentro do núcleo e ainda impede o complexo MDM2-p53 de ir para o citoplasma onde a proteína seria degradada (SHARP et al. 1999). E há diversas evidências que a MDM4 está aumentada no retinoblastoma. MDM4 tem sido encontrada hiperexpressa no retinoblastomas por diferentes grupos de pesquisa (LAURIE et al. 2006; GUO et al. 2008). Além disso, o gene de MDM4 está localizado no braço longo do cromossomo 1 (1q) que apresenta inúmeros ganhos no retinoblastoma (CORSON e GALLIE 2007). A segunda explicação é que a positividade de p53 seja decorrente do excesso de proteína normal e que estas poderiam estar executando sua função habitual.

Hipóxia, quebras no DNA e qualquer estímulo que cause dano ao genoma pode aumentar os níveis da p53 normal na célula do retinoblastoma. E atualmente, os métodos imunoistoquímicos que utilizam o clone DO7 com recuperação antigênica e revelação pelo DAB têm a capacidade de demonstrar intensa expressão nuclear e infrequente expressão citoplasmática em tecidos normais (PILLAI et al. 2003). Outra evidência que a imunoistoquímica está detectando p53 normal no retinoblastoma é que a expressão de p53 parece estar associada com a presença de apoptose (NORK et al. 1997; DIVAN et al. 2001). Entretanto, no nosso estudo, os cálculos de correlação dos níveis de p53 com a expressão de caspase 3 não foram conclusivos: a p53 se correlacionou negativamente com o índice apoptótico (medido pela contagem manual das células), um resultado diferente dos estudos citados acima. E a expressão de caspase-3 clivada e da p53 medidas pela plataforma ACIS não apresentaram correlação significativa. A expressão da p53 também apresentou diferenças entre os tumores intra e extraoculares, com os tumores extraoculares apresentando menores níveis de expressão de p53. Este resultado é diferente do encontrado em outras neoplasias como ovário, mama e cólon, onde maior expressão imunoistoquímica está associada a tumores mais agressivos (BOSARI et al. 1993). Mas esses tumores apresentam mutações no gene Tp53 o que não ocorre no retinoblastoma.

Bax apresentou positividade em 86,5% da nossa amostra o que é discordante do trabalho de FUJISAWA et al. (1998) que observaram negatividade em todas as amostras avaliadas pela imunoistoquímica. Entretanto, não há como comparar os resultados, uma vez que não há a descrição do anticorpo primário utilizado neste estudo. O anticorpo utilizado no nosso estudo é um anticorpo policlonal produzido a partir do peptídeo sintético correspondente a sequência de aminoácidos 43-61 da

proteína Bax humana. A positividade para Bax sugere que parte das células do retinoblastoma apresenta a via apoptótica intrínseca ativada uma vez que Bax induz a liberação de citocromo C no citosol (JURGENSEMEIER et al. 1998). Entretanto, para exercer sua função, Bax deve estar na membrana da mitocôndria. Mas não é possível determinar onde a molécula de Bax está localizada através da técnica de imunoistoquímica, se na membrana da mitocôndria ou no citosol. Somente com técnicas utilizando microscopia confocal ou microscopia eletrônica com anticorpos marcados com ouro seria possível localizar a Bax na célula. Além disso, Bax apresentou na nossa amostra, correlação negativa com o índice apoptótico e com medidas de expressão da caspase-3 clivada demonstrando que apesar de ser uma importante molécula pró-apoptótica, a diminuição da expressão imunoistoquímica de Bax está relacionada ao aumento da apoptose no retinoblastoma.

Por outro lado, das proteínas estudadas, Bax é uma das que mais apresenta estudos associando a sua diminuição da expressão imunoistoquímica com estadiamento ou prognóstico de diversas neoplasias (WOOTIPOOM et al. 2004; SANTINI et al. 2005; ADDEO et al. 2007; GONZALEZ-CAMPORA et al. 2007; KANG et al. 2007; KATO et al. 2008; JEONG et al. 2008). No nosso estudo, os tumores com estadiamento mais avançado apresentam menor expressão de Bax assim como nos estudos citados. Mas esta não é uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,08$).

Utilizando-se um anticorpo policlonal, Bak apresentou positividade, na microscopia óptica em apenas 1 caso da amostra. Interessante que apesar da microscopia óptica ter detectado expressão de Bak em apenas uma amostra, os resultados da expressão de Bak medidos pela plataforma ACIS, se correlacionaram

positivamente com o índice apoptótico e a expressão de caspase-3 clivada medidos pela plataforma o que é esperado para uma proteína pró-apoptótica. Entretanto, a sensibilidade de discernimento de cores da plataforma maior que a do olho humano talvez tenha detectado debris celulares que se coraram fracamente com o cromógeno o que fez que as medidas de Bak tenham se correlacionado positivamente com a apoptose. Confirmando esta possibilidade, houve uma correlação negativa significativa ($p = 0,04$) entre a expressão de Bak e p53 o que não é um resultado esperado porque p53 regula positivamente a transcrição do gene Bak (KANNAN et al. 2001). Desta forma, o melhor é considerar Bak praticamente ausente nas células do retinoblastoma.

Alguns estudos demonstraram que a proteína Bak pode se oligomerizar com Bax e formar poros na membrana mitocondrial que estimulam a liberação do citocromo c e de Smac/DIABLO no citosol. Bax e Bak são inibidos tanto por Bcl-2 quanto por Bcl-x_L. Desta forma, Bax e Bak parecem ter funções semelhantes e a ausência de uma delas realmente não impediria a apoptose celular pela via intrínseca ou mitocondrial (CORY e ADAMS 2002).

Bim_{LONG} foi positivo em apenas 26,1% da amostra. O anticorpo utilizado foi um anticorpo monoclonal o clone 5E5 sintetizado para ligar-se a proteína Bim_{long} do camundongo. Como a proteína Bim humana é muito semelhante à proteína do camundongo, este clone também pode ser utilizado em tecidos humanos (O'REILLY et al. 2000). Entretanto, este anticorpo não se liga a variante da proteína Bim_{SHORT}.que, em experimentos com linhagens celulares, parece ser a variante mais eficaz de Bim (O'CONNOR et al. 1998). Desta forma, o experimento usando este anticorpo deixou de demonstrar esta outra variante da proteína Bim. As três variantes

de Bim apresentam a mesma função de todas as proteínas “BH3 only”, a de inibir as moléculas Bcl-2 e Bcl-x_L que são antiapoptóticas. Entretanto, houve uma correlação negativa significativa entre a expressão de Bim_{LONG} e o índice apoptótico medido pela contagem manual de células ($\rho = -0,48$; $p < 0,001$), um resultado que não é esperado já que Bim é uma proteína pró-apoptótica.

PUMA foi positivo em 65,9% da amostra. Para a detecção de PUMA foi utilizado o anticorpo monoclonal clone EP512Y que é capaz de detectar as duas variantes de PUMA: PUMA-alfa e PUMA-beta. PUMA é uma proteína ligada a p53, pois o principal estímulo a transcrição do gene PUMA é a presença deste fator de transcrição. Inversamente, há autores que afirmam que toda a apoptose mediada pela p53 depende da expressão de PUMA (JEFFERS et al. 2003). A expressão de PUMA realmente se correlacionou positivamente com a expressão de p53 ($\rho = +0,36$; $p = 0,001$), mas não houve nenhuma correlação entre a expressão de PUMA e caspase 3 clivada, outro resultado não esperado já que PUMA é uma proteína pró-apoptótica. Isto, além da correlação negativa de p53 e Bax, pode sugerir que a via de apoptose mediada pela p53 não seja a via que as células de fenótipo maligno do retinoblastoma utilizam quando entram em apoptose.

Smac/DIABLO foi positiva em 66,7 % das amostras. Sua função é estimular a apoptose na célula através da inibição dos chamados IAP. Smac/DIABLO é uma proteína que exerce sua função apenas quando um estímulo apoptótico ativa Bax e Bak na membrana da mitocôndria, formando poros que liberam tanto citocromo C quanto Smac/DIABLO (DU et al. 2000; VERHAGEN et al. 2000). O anticorpo utilizado na imunoistoquímica foi o anticorpo monoclonal Y12 que não parece diferenciar a Smac ativa no citosol e a Smac inativa dentro da mitocôndria.

Smac/DIABLO não apresentou correlação com a expressão imunoistoquímica da caspase-3 clivada medida pela plataforma ACIS III® embora tenha apresentado correlação positiva com a contagem manual do índice apoptótico ($\rho = +0,26$; $p = 0,02$).

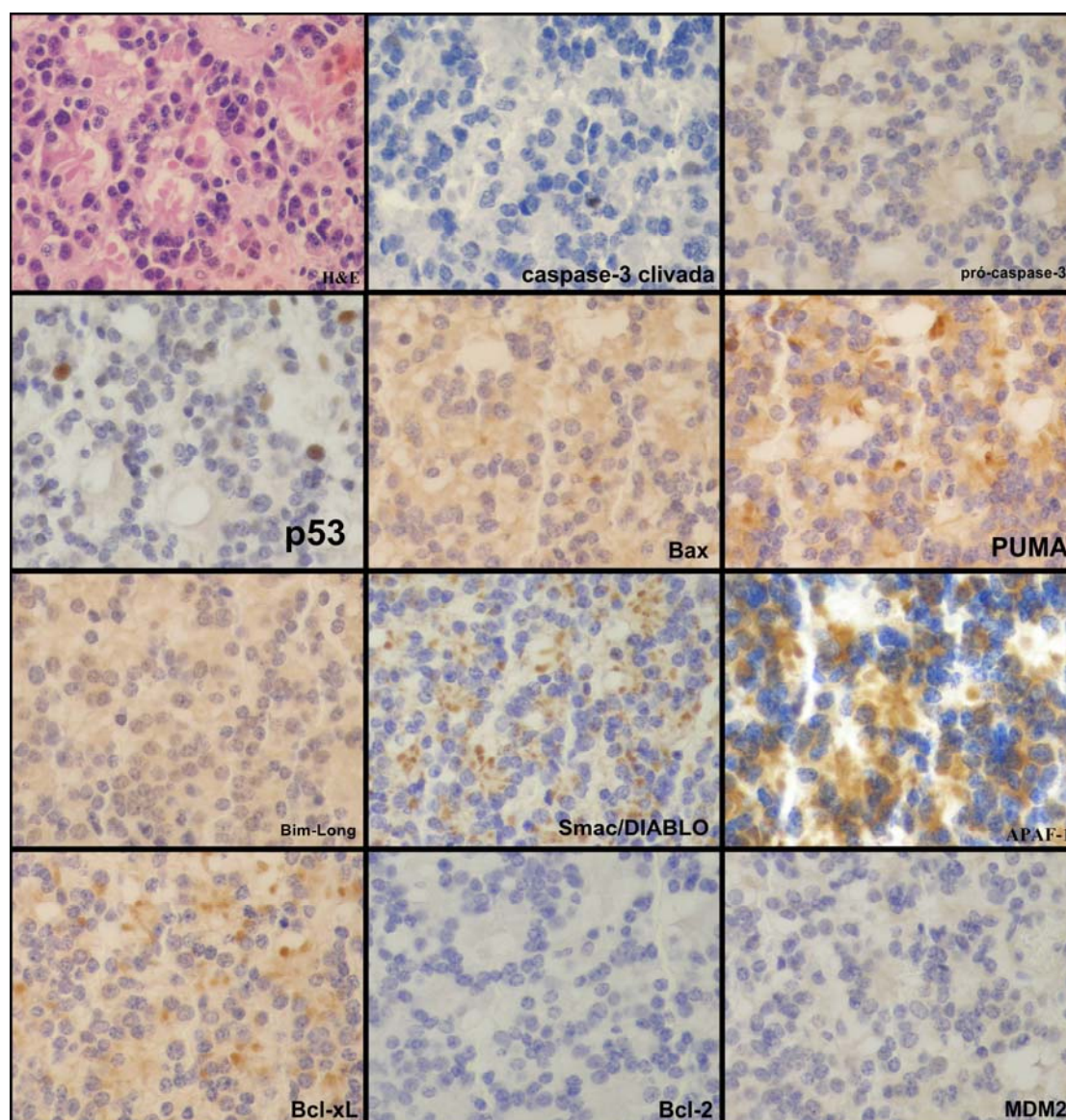
A proteína Bcl-2 apresentou positividade no retinoblastoma em apenas 1 paciente resultado comparável a outros estudos que utilizaram imunoistoquímica para observar a expressão do Bcl-2 nos retinoblastomas. COUPLAND et al (1998) demonstraram positividade para Bcl-2 apenas em astrócitos reativos distribuídos no meio das células tumorais enquanto TATLIPINAR et al. (2002) observaram fraca expressão imunoistoquímica. Para esta reação imunoistoquímica, foi utilizado o anticorpo monoclonal clone 124, que é utilizado constantemente na rotina diagnóstica para a classificação de linfomas através da presença de hiperexpressão de Bcl-2. O paciente que apresentou positividade para Bcl-2 teve evolução desfavorável e foi a óbito. Este paciente apresentou importantes fatores de risco para o óbito como tempo de encaminhamento longo, margem do nervo óptico comprometida, e invasão de coróide e esclera. A avaliação de Bcl-2 como fator prognóstico não foi possível, pois além de apenas um paciente apresentar positividade, este paciente apresentou inúmeros outros fatores de pior prognóstico. Bcl-2 não apresentou correlação significativa com o índice apoptótico, entretanto apresentou correlação positiva significativa ($\rho = +0,30$; $p = 0,004$) com p53, resultado não esperado porque a transcrição de Bcl-2 é inibida pela p53.

Bcl-x_L, outra proteína antiapoptótica, apresentou positividade nos retinoblastomas em 32/83 pacientes (38,6%) sendo bem mais expresso no retinoblastoma que Bcl-2. E, como esperado para uma proteína pró-apoptótica,

apresentou correlação negativa significativa com o índice apoptótico ($\rho = -0,41$; $p < 0,001$) e com as medidas observadas pela plataforma ACIS III®. Entretanto, a expressão de Bcl-x_L também apresentou correlação com a expressão de p53.

MDM2 apresentou positividade na imunoistoquímica em apenas 2/86 (2,3%) dos retinoblastomas. Neste experimento, foi utilizado o anticorpo monoclonal clone SMP14 que tem a peculiaridade de interagir com todas as proteínas MDM2, exceto as fosforiladas no ponto 216. Somente as Ciclina A-CDK1 e Ciclina A-CDK2 parecem ter a capacidade de fosforilar a proteína neste ponto deixando a MDM2 com menor capacidade de interagir com a p53 (ZHANG e PRIVES 2001). Entretanto, mesmo utilizando um anticorpo monoclonal que interage com a maior parte das proteínas MDM2 em qualquer estado de fosforilação e deixa de interagir apenas com uma forma fosforilada de MDM2 que parece ter menor atividade na interação com p53, uma minoria das amostras foi positiva para MDM2. Nas demonstrações de correlação, MDM2 se correlacionou positivamente com p53 ($\rho = +0,60$; $p < 0,001$) e negativamente com o índice apoptótico ($\rho = -0,32$; $p = 0,002$) como o esperado para uma proteína que exerce função antiapoptótica e tem a sua transcrição regulada pela p53 em seu mecanismo de autorregulação.

Para melhor explicar, resumir e exemplificar a respeito da expressão das proteínas estudadas, a Figura 26 demonstra as fotomicroscopias da expressão destas mesmas proteínas em um retinoma (dados não publicados). O retinoma é considerado pela maioria dos autores como a variante benigna do retinoblastoma que apresenta a mesma alteração do gene Rb1, mas tem uma evolução benigna, se a neoplasia não se transforma em um retinoblastoma o que ocorre frequentemente.



Legenda: A figura do canto superior demonstra corte histológico de um retinoma que apresenta predominantemente “fleurettes”. O retinoma apresenta raras células em apoptose (que expressam caspase-3 clivada) e raras células expressando a p53. Interessante, as proteínas relacionadas à mitocôndria como Bcl-x_L, PUMA, Smac/DIABLO demonstram expressão mais intensa no ápice destas estruturas que imitam os fotorreceptores. Bax apresentou expressão difusa no citoplasma compatível com sua característica de estar inativo no citosol e pontos de intensificação da expressão (setas). Bcl-2, Bak (não mostrado na figura) e MDM2 foram negativas.

Figura 26 - Fotomicroscopia demonstrando a expressão das proteínas relacionadas à apoptose estudadas no retinoma.

O retinoma é uma neoplasia com proliferação muito menor que a observada no retinoblastoma. Além disso, necrose e angiogênese são mais raramente observadas. Caracteristicamente o retinoma é composto predominantemente por estruturas denominadas “fleurettes” mostradas anteriormente nas Figuras 1 e 3. Estas estruturas apresentam diferenciação para fotorreceptores que lembram os segmentos internos dos cones que são muito ricas em mitocôndrias nos suas projeções (Figura 2). Nas fotomicroscopia da Figura 3 o retinoma apresenta raras células em apoptose (que expressam caspase-3 clivada) e raras células expressando p53. Realmente, os estímulos para a expressão da p53 são muito menores no retinoma. Há menos estímulo oncogênico e menos hipóxia. Mesmo assim, as proteínas pró-apoptóticas PUMA, Smac/DIABLO, Bax, Bim_{LONG}, APAF-1 e pro-caspase-3 estão espessas no retinoma sem que isso induza as células à apoptose. Além disso, PUMA, APAF-1 e Smac/DIABLO apresentam intensificação da reação imunoistoquímica nas projeções dos “fleurettes” o que sugere que estas proteínas podem estar localizadas na mitocôndria. E se isso corresponder à realidade do processo na célula, significa que Smac/DIABLO e APAF-1, apesar de expressas, não apresentam sua função pró-apoptótica. Assim como a pró-caspase-3 que está expressa difusamente no citoplasma, Bax também está expressa desta forma, com apenas raros pontos de intensificação. Isto corresponde a relação que Bax tem com sua função e localização subcelular. As células apresentam Bax soltas no citosol e apenas sob um estímulo apoptótico, Bax irá se aderir a membrana mitocondrial onde ela executa sua função.

Assim como no retinoblastoma, as proteínas Bcl-2 e MDM2 não foram expressas. Bcl-x_L apresenta o mesmo padrão de intensificação nas projeções dos “fleuretes”. É possível que Bcl-x_L esteja localizado na membrana mitocondrial,

anulando a função pró-apoptótica de PUMA, fazendo ligação com APAF-1 e contendo Smac/DIABLO dentro da mitocôndria (Figura 6).

Os mecanismos moleculares que atuam nas células retinianas até o desenvolvimento do fenótipo maligno no retinoblastoma estão sendo extensivamente estudados através de estudos em culturas celulares, modelos animais e através de amostras de retinoblastoma. A busca pela célula da retina que dá origem ao retinoblastoma ainda gera discordância no meio científico com alguns afirmando que a célula de origem já é, somente pela perda da pRb, uma célula resistente à apoptose (CHEN et al. 2004) enquanto outros afirmam que a resistência à apoptose é devida ao aumento de MDM2 ou MDM4 e consequente inativação da via da p53 e que este seria um evento secundário na tumorigênese (LAURIE et al. 2006; GUO et al. 2008). Apenas a inativação do gene RB1 não parece ser suficiente para dar origem ao retinoblastoma, embora seja o evento inicial da sua gênese (CORSON e GALLIE 2007). Segundo VOGELSTEIN e KINZLER (2004), a maioria das neoplasias necessita da inativação tanto da via da pRb como da p53 no seu desenvolvimento. Grande parte dos outros tumores executa a inativação destas vias através da produção exagerada de proteínas que inibem a função da pRb e através de mutações do gene Tp53. Neste aspecto, o retinoblastoma é peculiar, pois a inativação da via do pRb é causada pela perda da proteína Rb e a inativação da via p53 parece ser feita pela produção exagerada de MDM2 e MDM4. Na amostra do nosso estudo, demonstramos que tanto a p53, como os seus importantes transcritos pró-apoptóticos Bax e PUMA não se correlacionaram com a apoptose. Isto pode sugerir que a apoptose dependente de p53 está parcialmente bloqueada no retinoblastoma como nos estudos com modelos animais (LAURIE et al. 2006).

Como foi possível observar pela morfologia e pela expressão de caspase-3 clivada, a apoptose é um fenômeno bastante frequente no retinoblastoma, e sugerem que essas células malignas são particularmente sensíveis à apoptose. É provável que a hipóxia e a ausência da pRb com consequente desregulação do ciclo celular sejam os maiores estímulos à apoptose no retinoblastoma. As consequências da hipóxia podem ser facilmente observadas. É clássica a descrição dos manguitos de células malignas em torno de vasos sanguíneos, porque distante deles, sem oxigênio, as células malignas necrosam ou entram em apoptose. Importante lembrar que o suprimento sanguíneo no olho é particularmente limitado com a presença de irrigação sanguínea colateral escassa. Como já descrito, a hipóxia é um fenômeno frequente nas neoplasias e parece conferir às mesmas um fenótipo mais maligno, com aumento da angiogênese e consequente disseminação tumoral. Nos retinoblastomas é fácil observar clinicamente a presença de angiogênese, com os exames fundoscópicos demonstrando vasos nutridores anômalos e frequente neovascularização da íris nos retinoblastomas avançados. E a angiogênese é um fator importante na disseminação do retinoblastoma como demonstrado por MARBACK et al. (2003). Desta forma, acreditamos que a presença de mais células em apoptose nos pacientes com pior evolução seja mais uma consequência da hipóxia que fator de pior prognóstico.

A desregulação do ciclo celular como fator de estímulo a apoptose também parece ser importante no Retinoblastoma uma vez que observamos apoptose em áreas do tumor não isquêmicas. A ausência ou diminuição da função da pRb levando à liberação dos fatores de transcrição da família E₂F aumenta na célula a expressão dos fatores pró-apoptóticos. Esta dupla função de E₂F em transcrever as proteínas

responsáveis pelo ciclo celular e pela apoptose parece ser uma importante aquisição dos organismos pluricelulares na eliminação de células com multiplicação desregulada. Para avaliar o quanto o bloqueio da apoptose consequente a desregulação do ciclo celular é importante na progressão e prognóstico do retinoblastoma, analisaremos em áreas tumorais sem hipóxia a relação entre proliferação e apoptose.

Este estudo utilizando a imunoistoquímica forneceu importantes resultados de como as células do retinoblastomas parecem estar sensibilizadas à apoptose, com a expressão exagerada de moléculas pró-apoptóticas. E, apesar da expressão destas proteínas, nosso estudo sugere que a via apoptótica dependente de p53 está parcialmente bloqueada nesta neoplasia. É possível que este bloqueio seja consequente a expressão de Bcl-x_L. Novos estudos tentando mapear onde outros bloqueios à apoptose ocorrem e qual a importância do bloqueio à apoptose pela via do p53 deverão ser realizados para melhorar o entendimento do desenvolvimento, progressão e prognóstico do Retinoblastoma.

6 CONCLUSÕES

1. Houve um predomínio da expressão de proteínas pró-apoptóticas: Bax, PUMA e Smac/DIABLO em detrimento da expressão de proteínas antiapoptóticas: Bcl-2 e Bcl-x_L;
2. A presença da expressão das proteínas pró-apoptóticas parece causar maior susceptibilidade das células do retinoblastoma à apoptose. Mas a expressão destas proteínas não foi correlacionada com a apoptose;
3. A apoptose é um fenômeno muito frequente no retinoblastoma. Como observado, índice apoptótico não apresenta associação com a extensão tumoral e há uma tendência entre aumento do índice apoptótico e pior prognóstico.
4. Algum bloqueio à apoptose é um elemento essencial no desenvolvimento das neoplasias. No retinoblastoma, este bloqueio pode ser consequência da expressão de Bcl-x_L que se correlacionou negativamente com o índice apoptótico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramson DH, Scheffler AC. Update on retinoblastoma. **Retina** 2004; 24:828-48.

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science** 1998; 281:1322-6.

Addeo R, Crisci S, D'Angelo V, et al. Bax mutation and overexpression inversely correlate with immature phenotype and prognosis of childhood germ cell tumors. **Oncol Rep** 2007; 17:1155-61.

Akobeng AK. Understanding diagnostic tests 3: Receiver operating characteristic curves. **Acta Paediatr** 2007; 96:644-7.

Andersen SR. Differentiation features in some retinal tumors and in dysplastic retinal conditions. **Am J Ophthalmol** 1971; 1:231-41.

Antoneli CB, Ribeiro KB, Rodriguez-Galindo C, et al. The addition of ifosfamide/etoposide to cisplatin/teniposide improves the survival of children with retinoblastoma and orbital involvement. **J Pediatr Hematol Oncol** 2007a; 29:700-4.

Antoneli CB, Ribeiro Kde C, Sakamoto LH, Chojniak MM, Novaes PE, Arias VE. Trilateral retinoblastoma. **Pediatr Blood Cancer** 2007b; 48:306-10.

Antoneli CB, Ribeiro KC, Steinhorst F, Novaes PE, Chojniak MM, Malogolowkin M. Treatment of retinoblastoma patients with chemoreduction plus local therapy: experience of the AC Camargo Hospital, Brazil. **J Pediatr Hematol Oncol** 2006; 28:342-5.

Antoneli CB, Steinhorst F, Ribeiro KC, et al. Extraocular retinoblastoma: a 13-year experience. **Cancer** 2003a; 98:1292-8.

Antoneli CB, Steinhorst F, Ribeiro KC, et al. Evolução da terapêutica do retinoblastoma. **Arq Bras Oftalmol** 2003b; 66:401-8.

Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, et al. Inhibition of bax channel-forming activity by Bcl-2. **Science** 1997; 277:370-2.

Augsburger J, Bornfeld N, Giblin M. Retinoblastoma. In: Yanoff M, Duker JS, editors. **Ophthalmology**. St Louis: Mosby; 2004. p.1043-51.

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. **Science** 1989; 244:217-21.

Balasubramanya R, Pushker N, Bajaj MS, Ghose S, Kashyap S, Rani A. Atypical presentations of retinoblastoma. **J Pediatr Ophthalmol Strabismus** 2004; 41:18-24.

Balmer A, Zografos L, Munier F. Diagnosis and current management of retinoblastoma. **Oncogene** 2006; 25:5341-9.

Bartek J, Bartkova J, Vojtesek B, et al. Patterns of expression of the p53 tumour suppressor in human breast tissues and tumours in situ and in vitro. **Int J Cancer** 1990; 46:839-44.

Bellan C, De Falco G, Tosi GM, et al. Missing expression of pRb2/p130 in human retinoblastomas is associated with reduced apoptosis and lesser differentiation. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2002; 43:3602-8.

Bhatnagar R, Vine AK. Diffuse infiltrating retinoblastoma. **Ophthalmology** 1991; 98:1657-61.

Binder PS. Unusual manifestations of retinoblastoma. **Am J Ophthalmol** 1974; 77:674-9.

Bosari S, Viale G, Radaelli U, Bossi P, Bonoldi E, Coggi G. p53 accumulation in ovarian carcinomas and its prognostic implications. **Hum Pathol** 1993; 24:1175-9.

Bras M, Queenan B, Susin SA. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Mosc)** 2005; 70:231-9.

Bremner R, Du DC, Connolly-Wilson MJ, et al. Deletion of RB exons 24 and 25 causes low-penetrance retinoblastoma. **Am J Hum Genet** 1997; 61:556-70.

Brichard B, Chantrain C, Gala JL, Sibille C, Vermeylen C, De Potter P. Retinoblastoma and deletion of the long arm of chromosome 13: an underestimated diagnosis? **Pediatr Blood Cancer** 2008; 50:694-6.

Brichard B, Heusterspreute M, De Potter P, et al. Unilateral retinoblastoma, lack of familial history and older age does not exclude germline RB1 gene mutation. **Eur J Cancer** 2006; 42:65-72.

Broaddus E, Topham A, Singh AD. Survival with retinoblastoma in the USA: 1975-2004. **Br J Ophthalmol** 2009; 93:24-7.

Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Francke U, George DL. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. **Somat Cell Mol Genet** 1987; 13:235-44.

Cha SC, Suh KS, Song KS, Lim K. Cell death in retinoblastoma: electron microscopic, immunohistochemical, and DNA fragmentation studies. **Ultrastruct Pathol** 2000; 24:23-32.

Chantada G, Doz F, Antoneli CB, et al. A proposal for an international retinoblastoma staging system. **Pediatr Blood Cancer** 2006; 47:801-5.

Chantada GL, Casco F, Fandino AC, et al. Outcome of patients with retinoblastoma and postlaminar optic nerve invasion. **Ophthalmology** 2007; 114:2083-9.

Chantada GL, Doz F, Orjuela M, et al. World disparities in risk definition and management of retinoblastoma: a report from the International Retinoblastoma Staging Working Group. **Pediatr Blood Cancer** 2008; 50:692-4.

Chen D, Livne-bar I, Vanderluit JL, Slack RS, Agochiya M, Bremner R. Cell-specific effects of RB or RB/p107 loss on retinal development implicate an intrinsically death-resistant cell-of-origin in retinoblastoma. **Cancer Cell** 2004; 5:539-51.

Chen J, Lin J, Levine AJ. Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. **Mol Med** 1995; 1:142-52.

Chilosi M, Doglioni C, Menestrina F, et al. Abnormal expression of the p53-binding protein MDM2 in Hodgkin's disease. **Blood** 1994; 84:4295-300.

Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, et al. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. **Embo J** 1995a; 14:5589-96.

Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, et al. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. **Nature** 1995b; 374:733-6.

Chong EM, Coffee RE, Chintagumpala M, Hurwitz RL, Hurwitz MY, Chevez-Barrios P. Extensively necrotic retinoblastoma is associated with high-risk prognostic factors. **Arch Pathol Lab Med** 2006; 130:1669-72.

Clarke AR, Maandag ER, van Roon M, et al. Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. **Nature** 1992; 359:328-30.

Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:910-7.

Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, et al. Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. **Cancer Res** 1994; 54:794-9.

Corson TW, Gallie BL. One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2007; 46:617-34.

Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:647-56.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. **Robbins pathologic basis of disease**. 7th ed. Philadelphia: W B Saunders, 2005. Cellular adaptations, cell injury, and cell death; p.3-46.

Coupland SE, Bechrakis N, Schuler A, et al. Expression patterns of cyclin D1 and related proteins regulating G1-S phase transition in uveal melanoma and retinoblastoma. **Br J Ophthalmol** 1998; 82:961-70.

de Aguirre Neto JC, Antoneli CB, Ribeiro KB, et al. Retinoblastoma in children older than 5 years of age. **Pediatr Blood Cancer** 2007; 48:292-5.

de Bruin A, Wu L, Saavedra HI, et al. Rb function in extraembryonic lineages suppresses apoptosis in the CNS of Rb-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:6546-51.

Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008; 9:378-90.

DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1979; 76:2420-4.

Devesa SS. The incidence of retinoblastoma. **Am J Ophthalmol** 1975; 80:263-5.

Dippold WG, Jay G, DeLeo AB, Khoury G, Old LJ. p53 transformation-related protein: detection by monoclonal antibody in mouse and human cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1981; 78:1695-9.

Divan A, Lawry J, Dunsmore IR, Parsons MA, Royds JA. p53 and p21waf-1 expression correlates with apoptosis or cell survival in poorly differentiated, but not well-differentiated, retinoblastomas. **Cancer Res** 2001; 61:3157-63.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell** 2000; 102:33-42.

Dyer MA, Bremner R. The search for the retinoblastoma cell of origin. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:91-101.

Farrow SN, White JH, Martinou I, et al. Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. **Nature** 1995; 374:731-3.

Folberg R, Salomao D, Grossniklaus HE, Proia AD, Rao NA, Cameron JD. Recommendations for the reporting of tissues removed as part of the surgical treatment of common malignancies of the eye and its adnexa. **Am J Surg Pathol** 2003; 27:999-1004.

Font R, Croxatto J, Narsing R. **Tumors of the eye and ocular adnexa**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 2006. Tumors of the retina; p.85-131.

Friend SH, Bernards R, Rogelj S, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. **Nature** 1986; 323:643-6.

Fujisawa K, Itoh K, Imai Y, Itoh H, Yamamoto M. Pathological and histological study on retinoblastoma. **Kobe J Med Sci** 1998; 44:19-30.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol** 1992; 119:493-501.

Ginsberg D. E2F1 pathways to apoptosis. **FEBS Lett** 2002; 529:122-5.

Gong Y, Somwar R, Politi K, et al. Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas. **PLoS Med** 2007; 4:e294.

Gonzalez-Campora R, Davalos-Casanova G, Beato-Moreno A, et al. BCL-2, TP53 and BAX protein expression in superficial urothelial bladder carcinoma. **Cancer Lett** 2007; 250:292-9.

Goodrich DW. The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. **Oncogene** 2006; 25:5233-43.

Gown AM, Willingham MC. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. **J Histochem Cytochem** 2002; 50:449-54.

Gunduz K, Muftuoglu O, Gunalp I, Unal E, Tacyildiz N. Metastatic retinoblastoma clinical features, treatment, and prognosis. **Ophthalmology** 2006; 113:1558-66.

Guo Y, Pajovic S, Gallie BL. Expression of p14ARF, MDM2, and MDM4 in human retinoblastoma. **Biochem Biophys Res Commun** 2008; 375:1-5.

Harbour JW. Molecular basis of low-penetrance retinoblastoma. **Arch Ophthalmol** 2001; 119:1699-704.

Harbour JW. Eye cancer: unique insights into oncogenesis: the cogan lecture. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2006; 47:1736-45.

Hershko T, Ginsberg D. Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. **J Biol Chem** 2004; 279:8627-34.

Hsieh JK, Chan FS, O'Connor DJ, Mitnacht S, Zhong S, Lu X. RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. **Mol Cell** 1999; 3:181-93.

Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. **Lab Invest** 2001; 81:1331-8.

Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. **J Surg Res** 2007; 139:143-56.

Hurwitz R, Shields C, Shields J, Chevez-Barrios P, Hurwitz M, MM C. Retinoblastoma. In: Pizzo PAPD, editor. **Principles and practice of pediatric oncology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p.825-45.

Hussain SA, Ganesan R, Hiller L, et al. BCL2 expression predicts survival in patients receiving synchronous chemoradiotherapy in advanced transitional cell carcinoma of the bladder. **Oncol Rep** 2003; 10:571-6.

Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. **Nature** 1986; 320:84-5.

Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, et al. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. **Cancer Cell** 2003; 4:321-8.

Jeong SH, Lee HW, Han JH, et al. Low expression of Bax predicts poor prognosis in resected non-small cell lung cancer patients with non-squamous histology. **Jpn J Clin Oncol** 2008; 38:661-9.

Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:4997-5002.

Kang SY, Han JH, Lee KJ, et al. Low expression of Bax predicts poor prognosis in patients with locally advanced esophageal cancer treated with definitive chemoradiotherapy. **Clin Cancer Res** 2007; 13:4146-53.

Kannan K, Amariglio N, Rechavi G, et al. DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. **Oncogene** 2001; 20:2225-34.

Kato K, Kawashiri S, Yoshizawa K, Kitahara H, Yamamoto E. Apoptosis-associated markers and clinical outcome in human oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med** 2008; 37:364-71.

Kato MV, Shimizu T, Ishizaki K, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 17 and mutation of the p53 gene in retinoblastoma. **Cancer Lett** 1996; 106:75-82.

Kerimoglu H, Kiratli H, Dincturk AA, Soylemezoglu F, Bilgic S. Quantitative analysis of proliferation, apoptosis, and angiogenesis in retinoblastoma and their association with the clinicopathologic parameters. **Jpn J Ophthalmol** 2003; 47:565-71.

Khelifaoui F, Validire P, Auperin A, et al. Histopathologic risk factors in retinoblastoma: a retrospective study of 172 patients treated in a single institution. **Cancer** 1996; 77:1206-13.

Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, et al. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. **Nature** 1995; 374:736-9.

Kim JW, Dang CV. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. **Cancer Res** 2006; 66:8927-30.

Kim MR, Jeong EG, Chae B, et al. Pro-apoptotic PUMA and anti-apoptotic phospho-BAD are highly expressed in colorectal carcinomas. **Dig Dis Sci** 2007; 52:2751-6.

Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1971; 68:820-3.

Knudson AG, Jr. The genetics of childhood cancer. **Cancer** 1975; 35:1022-6.

Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. **Genes Dev** 1996; 10:1054-72.

Koshland DE, Jr. Molecule of the year. **Science** 1993; 262: 1953.

Krajewska M, Moss SF, Krajewski S, Song K, Holt PR, Reed JC. Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas. **Cancer Res** 1996; 56:2422-7.

Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, et al. Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. **Cancer Res** 1995; 55:4471-8.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. **Nature** 1979; 278:261-3.

Laurie NA, Donovan SL, Shih CS, et al. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. **Nature** 2006; 444:61-6.

Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? **Cell Death Differ** 2006; 13:1027-36.

Lianes P, Orlov I, Zhang ZF, et al. Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:1325-30.

Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. **Cell** 1979; 17:43-52.

Marback EF, Arias VE, Paranhos A Jr, Soares FA, Murphree AL, Erwenne CM. Tumour angiogenesis as a prognostic factor for disease dissemination in retinoblastoma. **Br J Ophthalmol** 2003; 87:1224-8.

Marchetti A, Buttitta F, Girlando S, et al. mdm2 gene alterations and mdm2 protein expression in breast carcinomas. **J Pathol** 1995; 175:31-8.

Marees T, Moll AC, Imhof SM, de Boer MR, Ringens PJ, van Leeuwen FE. Risk of second malignancies in survivors of retinoblastoma: more than 40 years of follow-up. **J Natl Cancer Inst** 2008; 100:1771-9.

Martinez-Ruiz G, Maldonado V, Ceballos-Cancino G, Grajeda JP, Melendez-Zajgla J. Role of Smac/DIABLO in cancer progression. **J Exp Clin Cancer Res** 2008; 27:48.

Matlashewski G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, Benchimol S. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. **Embo J** 1984; 3:3257-62.

Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:11598-603.

McLean I, Burnier M, Zimmerman L, LA J. **Tumors of the eye and ocular adnexa**. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1994.

McLean I. Retinoblastomas, retinocytomas and pseudoretinoblastomas. In: Spencer W, editor. **Ophthalmic pathology: an atlas and textbook**. Philadelphia: W B Saunders; 1996. p.1332-80.

Mercer WE, Avignolo C, Baserga R. Role of the p53 protein in cell proliferation as studied by microinjection of monoclonal antibodies. **Mol Cell Biol** 1984; 4:276-81.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional**. Rio de Janeiro: INCA; 2003.

Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. **Nucleic Acids Res** 1998; 26:3453-9.

Moroni MC, Hickman ES, Lazzerini Denchi E, et al. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. **Nat Cell Biol** 2001; 3:552-8.

Murphree AL. Retinoblastoma. In: Traboulsi EI, editor. **Genetic diseases of the eye**. New York: Oxford; 1998. p.813-49.

Murphree AL. Intraocular retinoblastoma: the case for a new group classification. **Ophthalmol Clin North Am** 2005; 18:41-53.

Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. **Mol Cell** 2001; 7:683-94.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature** 1989; 342:705-8.

Nork TM, Poulsen GL, Millecchia LL, Jantz RG, Nickells RW. p53 regulates apoptosis in human retinoblastoma. **Arch Ophthalmol** 1997; 115:213-9.

O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, et al. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. **Embo J** 1998; 17:384-95.

Odashiro AN, Pereira PR, de Souza Filho JP, Cruess SR, Burnier MN, Jr. Retinoblastoma in an adult: case report and literature review. **Can J Ophthalmol** 2005; 40:188-91.

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell** 1993; 74:609-19.

O'Reilly LA, Cullen L, Visvader J, et al. The proapoptotic BH3-only protein bim is expressed in hematopoietic, epithelial, neuronal, and germ cells. **Am J Pathol** 2000; 157:449-61.

Palazzi M, Abramson DH, Ellsworth RM. Endophytic vs exophytic unilateral retinoblastoma: is there any real difference? **J Pediatr Ophthalmol Strabismus** 1990; 27:255-8.

Pegoraro L, Palumbo A, Erikson J, et al. A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1984; 81:7166-70.

Pillai G, Roberts H, Gatter K, Pezzella F. p53 expression in normal paraffin-embedded tissue using different antibodies and antigen retrieval buffer systems. **Histopathology** 2003; 42:83-7.

Poulaki V, Mitsiades CS, Jousen AM, Lappas A, Kirchhof B, Mitsiades N. Constitutive nuclear factor-kappaB activity is crucial for human retinoblastoma cell viability. **Am J Pathol** 2002; 161:2229-40.

Pratt CB, Fontanesi J, Lu X, Parham DM, Elfervig J, Meyer D. Proposal for a new staging scheme for intraocular and extraocular retinoblastoma based on an analysis of 103 globes. **Oncologist** 1997; 2:1-5.

Rantanen S, Monni O, Joensuu H, Franssila K, Knuutila S. Causes and consequences of BCL2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. **Leuk Lymphoma** 2001; 42:1089-98.

Reese AB, Ellsworth RM. The evaluation and current concept of retinoblastoma therapy. **Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol** 1963; 67:164-72.

Reich NC, Levine AJ. Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. **Nature** 1984; 308:199-201.

Ribeiro KC, Antoneli CB. Trends in eye cancer mortality among children in Brazil, 1980-2002. **Pediatr Blood Cancer** 2007; 48:296-305.

Santini D, Tonini G, Vecchio FM, et al. Prognostic value of Bax, Bcl-2, p53, and TUNEL staining in patients with radically resected ampullary carcinoma. **J Clin Pathol** 2005; 58:159-65.

Sauter G, Mirlacher M. Tissue microarrays for predictive molecular pathology. **J Clin Pathol** 2002; 55:575-6.

Scambia G, Lovergine S, Masciullo V. RB family members as predictive and prognostic factors in human cancer. **Oncogene** 2006; 25:5302-8.

Schouten-van Meeteren AY, van der Valk P, van der Linden HC, et al. Histopathologic features of retinoblastoma and its relation with in vitro drug resistance measured by means of the MTT assay. **Cancer** 2001; 92:2933-40.

Schwimer CJ, Prayson RA. Clinicopathologic study of retinoblastoma including MIB-1, p53, and CD99 immunohistochemistry. **Ann Diagn Pathol** 2001; 5:148-54.

Sharp DA, Kratowicz SA, Sank MJ, George DL. Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. **J Biol Chem** 1999; 274:38189-96.

Shields CL, Shields JA, Baez K, Cater JR, De Potter P. Optic nerve invasion of retinoblastoma. Metastatic potential and clinical risk factors. **Cancer** 1994; 73:692-8.

Shields JA, Shields CL, De Potter P, Needle M. Bilateral macular retinoblastoma managed by chemoreduction and chemothermotherapy. **Arch Ophthalmol** 1996; 114:1426-7.

Shields CL, Meadows AT, Shields JA, Carvalho C, Smith AF. Chemoreduction for retinoblastoma may prevent intracranial neuroblastic malignancy (trilateral retinoblastoma). **Arch Ophthalmol** 2001; 119:1269-72.

Sjogren S, Inganas M, Norberg T, et al. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. **J Natl Cancer Inst** 1996; 88:173-82.

Sobin LH, Wittekind Ch. **TNM Classificação dos tumores malignos**. Trad. de A L A Eisenberg. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004.

Stannard C, Lipper S, Sealy R, Sevel D. Retinoblastoma: correlation of invasion of the optic nerve and choroid with prognosis and metastases. **Br J Ophthalmol** 1979; 63:560-70.

Steinhorst F. **Retinoblastoma intra-ocular: fatores preditivos de recaída após enucleação e papel da quimioterapia como tratamento adjuvante**. São Paulo 2006. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Tamboli A, Podgor MJ, Horm JW. The incidence of retinoblastoma in the United States: 1974 through 1985. **Arch Ophthalmol** 1990; 108:128-32.

Tatlipinar S, Soylemezoglu F, Kiratli H, Bilgic S. Quantitative analysis of apoptosis in retinoblastoma. **Clin Experiment Ophthalmol** 2002; 30:131-5.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. **Science** 1984; 226:1097-9.

Valverde JR, Alonso J, Palacios I, Pestana A. RB1 gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. **BMC Genet** 2005; 6:53.

Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. **Nature** 1988; 335:440-2.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. **Cell** 2000; 102:43-53.

Verhagen AM, Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. **Apoptosis** 2002; 7:163-6.

Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. **Nat Med** 2004; 10:789-99.

Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:594-604.

Wang P, Reed M, Wang Y, et al. p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. **Mol Cell Biol** 1994; 14:5182-91.

Wijisman JH, Jonker RR, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. **J Histochem Cytochem** 1993; 41:7-12.

Wootipoom V, Lekhyananda N, Phungrassami T, Boonyaphiphat P, Thongsuksai P. Prognostic significance of Bax, Bcl-2, and p53 expressions in cervical squamous cell carcinoma treated by radiotherapy. **Gynecol Oncol** 2004; 94:636-42.

Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. **Genes Dev** 1993; 7:1126-32.

Yanoff M, Fine BS. **Ocular pathology**. 5th ed. St. Louis: Mosby; 2002. Retinoblastoma and pseudoglioma; p.692-718.

Yoo NJ, Lee JW, Jeong EG, Lee SH. Immunohistochemical analysis of pro-apoptotic PUMA protein and mutational analysis of PUMA gene in gastric carcinomas. **Dig Liver Dis** 2007; 39:222-7.

Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. **Mol Cell** 2001; 7:673-82.

Yu J, Zhang L. No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis. **Cancer Cell** 2003; 4:248-9.

Yuge K, Nakajima M, Uemura Y, Miki H, Uyama M, Tsubura A. Immunohistochemical features of the human retina and retinoblastoma. **Virchows Arch** 1995; 426:571-5.

Zantl N, Weirich G, Zall H, et al. Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance. **Oncogene** 2007; 26:7038-48.

Zhang T, Prives C. Cyclin a-CDK phosphorylation regulates MDM2 protein interactions. **J Biol Chem** 2001; 276:29702-10.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. **J Biol Chem** 1999; 274:11549-56.

Anexo 1 - Classificação de REESE-ELLSWORTH (1963)

Grupo I

- a. Tumor solitário menor do que 4 diâmetros papilares (DP), junto ou atrás do equador do globo ocular.
- b. Tumores múltiplos, nenhum maior do que 4 DP, todos junto ou atrás do equador.

Grupo II

- a. Tumores solitários com 4 a 10 DP, junto ou atrás do equador.
- b. Tumores múltiplos, com tamanho de 4 a 10 DP, atrás do equador.

Grupo III

- a. Qualquer tumor anterior ao equador.
- b. Tumor solitário maior do que 10 DP atrás do equador.

Grupo IV

- a. Tumores múltiplos, alguns maiores que 10 DP
- b. Qualquer tumor estendendo-se anteriormente à "ora serrata".

Grupo V

- a. Tumor maciço envolvendo mais da metade da retina.
- b. Sementes vítreas com qualquer tamanho do tumor.

Anexo 2 - ABC – CLASSIFICAÇÃO DE MURPHREE (2005)

Grupo A – Risco muito baixo.

Tumores pequenos confinados à retina

Nenhum tumor > 3 mm

Nenhum tumor na área de 1,5 mm do nervo óptico (1 DD)

Ou 3mm (2DD) da fóvea

Ausência de sementes vítreas ou descolamento de retina

Grupo B – Risco baixo

Tumor(es) confinado(s) à retina (> 3 mm)

Qualquer localização

Sem sementes vítreas

Descolamento de retina de até 5mm (3,5 DD) a partir da base do tumor

Grupo C – Risco moderado.

Sementes vítreas finas difusas ou localizadas

Descolamento de retina .>5mm ou descolamento total de retina

Ausência de flocos tumorais vítreos ou massas subretinianas

Grupo D – Risco alto.

Sementes vítreas maciças ou subretinianas

Massas em “bola de neve” em vítreo ou subretinianas

Grupo E – Risco muito alto.

Nenhuma visão potencial ou

Presença de um ou mais

Tumor em corpo ciliar /segmento anterior

Glaucoma neo-vascular

Hemorragia vítrea

Olho atrófico ou em processo de atrofia

Hifema

Sinais inflamatórios orbitários (aspecto de celulite)

Tumor anterior ou hialóide anterior

Anexo 3 - Classificação do CCSG-962 (Wolff et al. 1978, citado por ANTONELI et al. 2003b, p.403)

Classe I Evidência ao exame anátomopatológico de células tumorais nos canais emissários esclerais ou células tumorais espalhadas nos tecidos episclerais por ocasião da enucleação.

Classe II Evidência microscópica de tumor na margem de ressecção do nervo óptico.

Classe III Tumor orbitário comprovado por biópsia.

Classe IV Massa tumoral no SNC ou células tumorais no líquido.

Classe V Metástases hematogênicas para a medula óssea, osso ou outros locais, ou disseminação linfática para linfonodos cervicais ou de outras regiões.

Anexo 4 - Proposta de classificação do Retinoblastoma (CHANTADA et al. 2006)

Estágio 0. Pacientes com tratamento conservador.

Estágio I. Pacientes tratados com enucleação, com ressecção completa do tumor.

Estágio II. Pacientes tratados com enucleação, com tumor residual.

Estágio III. Extensão regional:

- a. Doença na órbita.
- b. Extensão para linfonodos pré-auriculares e cervicais.

Estágio IV Doença Metastática

- a. Metástases hematogênicas (sem envolvimento do SNC)
 - 1. Lesão única
 - 2. Lesões múltiplas
- b. Extensão para o SNC (com ou sem metástases hematogênicas ou extensão regional)
 - 1. Lesão pré-quiasmática
 - 2. Massa no SNC
 - 3. Tumor nas leptomeninges e em LCR.

Anexo 5 - Dados clínicos, epidemiológicos, histopatológicos e imunistoquímicos

- 1- RGH: _____
- 2- Número do AP: _____
- 3- Sexo: 1() masc 2() fem
- 4- Cor: 1() branco 2() não branco 9() ignorado
- 5- Data de nascimento: ____/____/____
- 6- Data de admissão: ____/____/____
- 7- Tempo de encaminhamento: _____ meses
- 8- Procedência: 1() SP 2() MS 3() MG 4() GO 5() BA 6() CE 7() MA 8() PA 9() MT 10() PR 11() SC 12() RS 13() AM 14() AC 15() PI 16() PE 17() RN 18() RO 19() RR 20() AP 21() AI 22() SE 23() RJ 24() TO 25() DF 26() ES 27() PB
- 9- História familiar: 0() não 1() sim 9() ignorado
- 10- Lateralidade: 1() unilateral 2() bilateral
- 11- Localização: 1() intraocular 2() extraocular
- 12- Estadiamento: 1() I 2() II 3() III 4() IV 5() V
- 13- Primeiros sinais OD: 1() brilho 2() estrabismo 3() vermelhidão
4() aumento do globo 5() diminuição da visão
6() FO retina 7() outros 9() ignorado
- 14- Estadiamento OD: 1() I 2() II 3() III 4() IV 5() V 6() nenhum
7() phthisis bulbi 9() ignorado
- 15- Localização OD: 1() IO 2() EO 8() não aplicável 9() ignorado
- 16- Fatores de risco OD: 0() não 1() sim
- 17- Estadiamento OE: 1() I 2() II 3() III 4() IV 5() V 6() nenhum
7() phthisis bulbi 9() ignorado
- 18- Localização OE: 1() IO 2() EO 8() não aplicável 9() ignorado
- 19- Fatores de risco OE: 0() não 1() sim
- 20- Data de início QT: ____/____/____
- 21- Protocolo extra: 0() não 1() sim
- 22- Protocolo medula: 0() não 1() sim
- 23- Número de ciclos: _____
- 24- Radioterapia externa OD: 0() não 1() sim
- 25- Radioterapia externa OE: 0() não 1() sim
- 26- Data da radioterapia: ____/____/____
- 27- Recidiva: 0() não 1() sim 9() ignorado

- 28- Data de recidiva: ____/____/____
- 29- Local da recidiva: 1() Órbita direita 2() Órbita esquerda 3() LCR 4() MO
5() 1+3 6() 1+4 7() 2+3 8() 2+4
9() outras 99() ignorado
- 30- Segundo tumor: 0() não 1() sim 9() ignorado
- 31- Data do segundo tumor: ____/____/____
- 32- Local do segundo tumor: 1() primário com RT 2() primário sem RT 3() não 1º
8() não se aplica 9() ignorado
- 33- Histologia do 2º tumor: 1() osteossarcoma 2() sarcoma partes moles
3() LLA 4() LMA 5() outro 8() não aplica 9() ignorado
- 34- Data da última informação: ____/____/____
- 35- Status: 1() vivo sem doença 2() vivo com doença 3() morte pelo tumor
4() morte sem tumor 5() morte por segundo tumor 9() perda de seguimento

Imunoistoquímica:

Contagem de células marcadas pela caspase-3 clivada

36- Índice apoptótico: ____%

Microscopia óptica.

- 37- p53: 0() negativo 1() positivo 9() não avaliável
- 38- Bcl-2: 0() negativo 1() positivo 9() não avaliável
- 39- Bax: 0() negativo 1() positivo 9() não avaliável
- 40- Bak: : 0() negativo 1() positivo 9() não avaliável
- 41- Bcl-x_L: 0() negativo 1() positivo 9() não avaliável
- 42- Bim_{LONG}: 0() negativo 1() positivo 9() não avaliável
- 43- MDM2: 0() negativo 1() positivo 9() não avaliável
- 44- PUMA: 0() negativo 1() positivo 9() não avaliável
- 45- Smac/DIABLO: 0() negativo 1() positivo 9() não avaliável
- 46- APAF-1: 0() negativo 1() positivo 9() não avaliável
- 47- Pró-caspase-3: 0() negativo 1() positivo 9() não avaliável
- 49- Caspase-3 clivada: : 0() negativo 1() positivo 9() não avaliável

Avaliação pelo ACIS III®

- 50- APAF-1: ____ intensidade ____% de área corada.
- 51- Bcl-2: ____ intensidade ____% de área corada.
- 52- Bax: ____ intensidade ____% de área corada.
- 53- Bak: ____ intensidade ____% de área corada.
- 54- Bcl-x_L: ____ intensidade ____% de área corada.
- 55- Bim_{LONG}: ____ intensidade ____% de área corada.
- 56- Caspase-3 clivada: ____ intensidade ____% de área corada.

57- Pró-caspase-3 clivada: _____ intensidad _____% de área corada.

57- PUMA: _____ intensidad _____% de área corada.

58- Smac/DIABLO: _____ intensidad _____% de área corada.

56- Caspase-3 clivada: _____ intensidad _____% de núcleos corados.

59- p53: _____ intensidad _____% de núcleos corados

60- MDM2: _____ intensidad _____% de núcleos corados

Anexo 6 - Protocolo de Imunoistoquímica

1. O bloco de TMA é cortado no micrótomo rotativo na espessura de 5 µm. Coloca-se o tape contra o bloco de TMA e corta-se.
2. O tape com o material é colado na lâmina apropriada e com a pressão manual de um rolo o tape é fixado na lâmina. A lâmina com o tape sofre a irradiação com UV por 30 min, sendo em seguida mergulhada em solução solvente (TPC) e seca a temperatura ambiente
3. Os tapes são retirados após a secagem.
4. As lâminas sofrem banho de parafina, estando prontas para o armazenamento em freezer.
5. Desparafinização das lâminas deixadas por 24 horas em estufa 60°C:
6. Xilol a 60°C por 20 minutos
7. Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos
8. Etanol 100% 30 segundos
9. Etanol 85% 30 segundos
10. Etanol 70% 30 segundos
11. Lavar as lâminas em água corrente e destilada.
12. Ferver a solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Pascal® ou Eterna®, Nigro) destampada, mergulhar as lâminas e lacrar a panela com a válvula de segurança aberta.
13. Após a saída do vapor saturado, abaixar a válvula de segurança e aguardar a pressurização total. Contar 4 minutos após esse sinal.
14. Deixar a panela fechada sob água corrente por 10 minutos. Destampar a panela com as lâminas e deixar por mais 10 minutos à temperatura ambiente. Lavar as lâminas em água corrente e destilada
15. Proceder ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3%, (água oxigenada 10 vol) com 4 trocas de 5 minutos cada. Lavar em água corrente e destilada
16. Lavar com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos.

17. Incubar as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido conforme a tabela 2 em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida.
 18. Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.
 19. Incubar por 30 min a 37°C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer RE7260-k, Reino Unido). Lavar com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada.
 20. Incubar com o NovoLink Polymer por 30 min a 37° C
 21. Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.
 22. Incubar as lâminas em solução substrato: 60 mg% de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H_2O_2 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.
 23. Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado acastanhado, como produto final da reação.
 24. Lavar em água corrente e água destilada por 3 minutos.
 25. Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.
- Lavar bem em água corrente e destilada
26. Imergir 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.
 27. Desidratar as lâminas em:
Etanol 80%, 30 segundos
Etanol 95%, 30 segundos
Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada
Xilol 4 vezes, 30 segundos cada
 28. Montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha).