

**ANÁLISE DO STATUS DOS GENES *NMYC*,
MDM2 E *TP53* E DA EXPRESSÃO PROTÉICA DE
MDM2, p53 E pRb EM PACIENTES PORTADORES DE
RETINOBLASTOMA SUBMETIDOS À ENUCLEAÇÃO**

NEVIÇOLINO PEREIRA DE CARVALHO FILHO

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Celia Beatriz Gianotti
Antoneli

Co-Orientadora: Dra. Isabela Werneck da
Cunha

São Paulo
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Carvalho Filho, Neviçolino Pereira de

**Análise do status dos genes NMYC, MDM2 e TP53 e da
expressão protéica de MDM2, p53 E pRb em pacientes
portadores de retinoblastoma submetidos à enucleação /**

Neviçolino Pereira de Carvalho Filho – São Paulo, 2015.

70p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Célia Beatriz Gianotti Antoneli

Descritores: 1. RETINOBLASTOMA. 2. PROTEÍNAS MDM2. 3.
PROTEÍNA P53 SUPRESSORA DE TUMOR. 4. GENES MYC. 5.
ENUCLEAÇÃO OCULAR.

DEDICATÓRIA

- A **Deus**, a quem minha fervorosa fé faz crer no sonho de que, um dia, nós encontraremos a paz e o amor divinais em nossa existência humana;
- Aos meus pequenos e grandes **pacientes**, que me energizam diariamente em busca de poder lhes oferecer tratamento com o mínimo de sofrimento possível;
- À minha **família**: minha mãe, mulher de fibra e constante incentivadora; meu irmão, minhas irmãs, meus lindos e estimados sobrinhos e sobrinhas, que mesmos distantes estão tão presentes na minha vida; e ao André, Rudnick e Sheikra, que convivem comigo diariamente.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento especial e incomensurável à **Dra. Celia Beatriz Gianotti Antoneli**, mais que pela segura orientação na elaboração desta tese, porém, e sobretudo, pelo seu exemplo de ser humano e profissional e pelo privilégio de poder aprender grandes lições da vida com ela ao longo dos últimos 15 anos.

À **Dra. Isabela Werneck da Cunha**, minha co-orientadora, pelo apoio e confiança depositados em mim na parceria do desenvolvimento deste estudo e sem a qual não teria conseguido chegar até aqui.

Ao **Dr. Antônio Hugo José Froes de Campos** pela ajuda e disponibilidade com a leitura das reações de imunoistoquímica.

À **Dra. Karina de Cássia Braga Ribeiro**, minha admiração por ser uma grande mulher e profissional do mais alto gabarito. Sua orientação na análise estatística tornou esse estudo uma realidade.

À toda a equipe do **Departamento de Patologia** do A.C. Camargo Cancer Center.

À toda a equipe do **Departamento de Pediatria** do A.C. Camargo Cancer Center.

À pós graduanda **Maria Gabriela**, que sem medir esforços ajudou-me em muitos momentos na coleta dos dados dos exames anatomopatológicos.

À toda equipe do Departamento de **Pós Graduação** e da **biblioteca**, em especial à **Suely Franscisco**, por todo apoio e informações técnicas.

RESUMO

Carvalho Filho NP. **Análise do status dos genes *NMYC*, *MDM2* e *TP53* e da expressão protéica de *MDM2*, *p53* e *pRb* em pacientes portadores de retinoblastoma submetidos à enucleação.** São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O estudo do ciclo celular e seus mecanismos de controle em retinoblastoma têm identificado possíveis alvos terapêuticos. A relação entre os genes *TP53*, *RB1*, *MDM2* e *NMYC* na iniciação e desenvolvimento do retinoblastoma estão bem estabelecidas. Propomos estudar o status dos genes *MDM2*, *NMYC* e *TP53* e da expressão protéica de *MDM2*, *p53* e *pRb* em pacientes com diagnóstico de retinoblastoma admitidos em um período de dezessete anos no A.C. Camargo Cancer Center e correlacioná-los com grau de diferenciação do tumor, lateralidade (unilateral, bilateral), extensão (intraocular, extraocular), infiltração de coróide e infiltração de nervo óptico.

Material e métodos: 469 pacientes foram admitidos no período de 01 de janeiro de 1986 a 31 de dezembro de 2003. Duzentos e vinte e cinco pacientes foram considerados para análise levando-se em consideração os critérios de inclusão e exclusão. O status dos genes foi analisado através da técnica de FISH (hibridização in situ fluorescente) e a expressão protéica por imunoistoquímica. **Resultados:** a expressão protéica de *MDM2* foi observada em 67,1%, *p53* em 64,9% e não houve expressão de proteína *pRb*; não houve amplificação de *MDM2* e foi demonstrada amplificação de *NMYC* em 8%; a análise por FISH de *TP53* falhou em todos os casos avaliáveis. Não houve correlação significativa da expressão protéica de *MDM2* e *p53* com as variáveis clínicas e patológicas estudadas. Houve diferença estatística significativa quando avaliamos a probabilidade de sobrevida após 5 anos com a expressão protéica de *MDM2* nos casos de tumores bem ou moderadamente diferenciados (até 30% - SG 5a: 97,5%; maior que 30% - SG 5a: 89,5%; $p = 0,015$), nos casos de tumores

intraoculares (até 30% - SG-5a: 98,6%; maior que 30% - SG 5a: 94% ; $p = 0,037$) e nos casos sem infiltração de nervo óptico (até 30% - SG 5a: 100% ; maior que 30% - SG-5a: 93,5%; $p = 0,02$). Houve diferença estatística significativa quando avaliamos a probabilidade de sobrevida após 5 anos com a expressão protéica de p53 nos casos de tumores intraoculares (até 20% - SG 5a: 97,3% ; maior que 20% - SG 5a: 85,5% ; $p = 0,002$), nos casos bilaterais (até 20% - SG 5a: 96,2% ; maior que 20% - SG 5a: 75% ; $p = 0,006$) e nos casos sem infiltração de coróide (até 20% - SG 5a: 97,3%; maior que 20% - SG 5a: 81,8%; $p = 0,004$). **Conclusão:** a expressão protéica de MDM2 e p53 neste estudo demonstrou ter impacto na sobrevida global de subgrupos de pacientes e especialmente naqueles sem infiltração do nervo óptico (MDM2) e sem infiltração de coróide (p53), portanto candidatos a novos fatores prognósticos de fácil execução e baixo custo na prática clínica diária.

SUMMARY

Carvalho Filho NP. [Status analysis of the genes *MYCN*, *MDM2* and *TP53* and protein expression of *MDM2*, *p53* and *pRb* in patients with retinoblastoma underwent enucleation]. São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Background: The study of the cell cycle and its control mechanisms in retinoblastoma has identified potential therapeutic targets. The relationship between genes *RB1*, *TP53*, *MDM2* and *MYCN* in the initiation and development of retinoblastoma are well established. We propose to study the status of the *MDM2*, *NMYC* and *TP53* genes and the protein expression of *MDM2*, *p53* and *pRb* in patients diagnosed with retinoblastoma admitted over a period of seventeen years in the A.C. Camargo Cancer Center Hospital and correlates them with tumor grade of differentiation, laterality (unilateral, bilateral), extension (intraocular, extra ocular), choroidal infiltration and optic nerve infiltration. **Material and methods:** 469 patients were admitted between January 1, 1986 to December 31, 2003. Two hundred and twenty-five patients were included in the study taking into account the inclusion and exclusion criteria. The status of the genes was analyzed by FISH technique (Fluorescent in situ hybridization) and protein expression by immunohistochemistry. **Results:** The *MDM2* protein expression was observed in 67.1%, 64.9% in *p53* and no *pRb* protein expression; there was no amplification was demonstrated and *MDM2* amplification *MYCN* 8%; *TP53* by FISH analysis failed in all evaluable cases. There was no significant correlation between protein expression of *MDM2* and *p53* with the clinical and pathological variables. There was a significant statistical difference when evaluating the probability of survival after 5 years with the protein expression of *MDM2* in cases of tumors as well or moderately differentiated (up to 30% - 5y OS: 97.5%; greater than 30% - 5y OS: 89.5%; $p = 0.015$) in intraocular cases (up 30% - 5y OS: 98.6%; greater than 30% - 5y OS: 94%; $p = 0.037$)

and in the cases without optic nerve infiltration (up to 30% - 5y OS: 100%; greater than 30% - 5y OS: 93.5%; $p = 0.02$). There was a significant statistical difference when evaluating the probability of survival after 5 years with the protein expression of p53 in intraocular tumors (up to 20% - 5y OS: 97.5%; greater than 20% - 5y OS: 85.5%; $p = 0.002$), in bilateral tumors (up to 20% - 5y OS: 96.2%; greater than 20% - 5y OS: 75%; $p = 0.006$) and cases without choroidal infiltration (up to 20% - 5y OS: 97.3%, greater than 20% - 5y OS: 81.8%; $p = 0.004$). **Conclusion:** The protein expression of MDM2 and p53 in this study have demonstrated differences in five years overall survival of subgroups of patients and especially those without optic nerve infiltration (MDM2) and without choroidal infiltration (p53), so they are candidates for new prognostic factors in daily clinical practice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Número de pacientes com retinoblastoma de acordo com a idade ao diagnóstico em meses, A.C. Camargo Cancer Center 1986 – 2003.....	17
Figura 2	Número de pacientes com retinoblastoma unilateral de acordo com a idade ao diagnóstico em meses, A.C. Camargo Cancer Center 1986 – 2003.....	18
Figura 3	Número de pacientes com retinoblastoma bilateral de acordo com a idade ao diagnóstico em meses, A.C. Camargo Cancer Center 1986 – 2003.....	19
Figura 4	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	25
Figura 5	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma bem ou moderadamente diferenciados segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	26
Figura 6	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma pouco diferenciados ou indiferenciados segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	27
Figura 7	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma intraocular segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	28

Figura 8	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma extraocular segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	29
Figura 9	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma unilateral segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	30
Figura 10	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma bilateral segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	31
Figura 11	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma sem infiltração de coróide segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	32
Figura 12	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma com infiltração de coróide segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	33
Figura 13	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma sem infiltração de nervo óptico segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	34
Figura 14	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma com infiltração de nervo óptico segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	35

Figura 15	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003...	36
Figura 16	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma bem ou moderadamente diferenciados segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	37
Figura 17	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma pouco diferenciados ou indiferenciados segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	38
Figura 18	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma intraocular segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	39
Figura 19	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma extraocular segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	40
Figura 20	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma unilateral segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	41
Figura 21	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma bilateral segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	42

Figura 22	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma sem infiltração de coróide segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	43
Figura 23	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma com infiltração de coróide segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	44
Figura 24	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma sem infiltração de nervo óptico segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	45
Figura 25	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma com infiltração de nervo óptico segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	46
Figura 26	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma segundo amplificação de NMYC, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	50
Figura 27	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma bem ou moderadamente diferenciados segundo amplificação de NMYC, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	51
Figura 28	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma pouco diferenciados ou indiferenciados segundo amplificação de NMYC, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	52

Figura 29	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma intraocular segundo amplificação de NMYC, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	53
Figura 30	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma unilateral segundo expressão de NMYC, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	54
Figura 31	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma bilateral segundo expressão de NMYC, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	55
Figura 32	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma sem infiltração de coróide segundo amplificação de NMYC, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	56
Figura 33	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma sem infiltração de coróide segundo amplificação de NMYC, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	57
Figura 34	Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma sem infiltração de nervo óptico segundo amplificação de NMYC, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	58

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Sondas e especificações de codenaturação e hibridização conforme fabricantes utilizadas para técnica de FISH empregada na análise dos casos de Retinoblastoma no período de 1986 a 2003 no A.C. Camargo Cancer Center.....	11
Quadro 2	Anticorpos e especificações para diluição, recuperação antigênica e incubação primária conforme fabricantes utilizadas para técnica de imunoistoquímica empregada na análise dos casos de Retinoblastoma no período de 1986 a 2003 no A.C. Camargo Cancer Center.....	13
Tabela 1	Variáveis clínicas dos pacientes com diagnóstico de retinoblastoma submetidos à enucleação, A.C. Camargo Cancer Center 1986 – 2003.....	20
Tabela 2	Número de pacientes conforme faixas de porcentagem de positividade de expressão das proteínas MDM2 e p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	21
Tabela 3	Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a expressão das proteínas MDM2 e p53 e grau de diferenciação histológica, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	22
Tabela 4	Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a expressão das proteínas MDM2 e p53 e infiltração de coróide, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	23

Tabela 5	Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a expressão protéica de MDM2 e p53 e infiltração de nervo óptico, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003....	23
Tabela 6	Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a expressão das proteínas MDM2 e p53 com a lateralidade, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	24
Tabela 7	Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a expressão protéica de MDM2 e p53 e extensão da doença, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	24
Tabela 8	Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a amplificação do gene NMYC e grau de diferenciação histológica, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	48
Tabela 9	Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a amplificação do gene NMYC e infiltração de coróide, A.C. Camargo Cancer Center 1986 – 2003.....	48
Tabela 10	Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a amplificação do gene NMYC e infiltração de nervo óptico, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	48
Tabela 11	Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a amplificação do gene NMYC e lateralidade, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	49
Tabela 12	Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a amplificação do gene NMYC e extensão da doença, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL	Microlitro
CDK	Ciclina dependente de cinase
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	4'6,-diamino-2-phenylindole
DEK	Homo sapiens DEK proto-oncogene
E2F3	Homo sapiens Fator de transcrição E2F3
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
HCL	Ácido Clorídrico
HRP	Horseradish peroxidase
KIF	Homo sapiens kinesin family member
M	Molar
MDM2	Homo sapiens murine double minute 2 proto-oncogene
MDMX	Homo sapiens mouse double minute 4 p53 regulator
N	Normalidade
NMYC	Homo sapiens v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog
p14^{ARF}	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p16	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p53	Homo sapiens p53 protein
PBS	Phosphate buffered saline
pRb	Homo sapiens retinoblastoma-associated protein
RB1	Homo sapiens retinoblastoma 1
SG 5a	Sobrevida global após 5 anos
SPSS	Statistical Package for Social Science
TMA	Tissue microarray
TP53	Tumor protein p53 gene

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	6
2.1	Objetivo Principal.....	6
2.2	Objetivos Secundários.....	6
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1	Tipo de Estudo	8
3.2	Casuística.....	8
3.2.1	CrITÉRIOS de Inclusão	8
3.2.2	CrITÉRIOS de Exclusão.....	9
3.3	Procedimento	9
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
5	RESULTADOS	17
5.1	Análise do Tissue Micro Array por Imunoistoquímica.....	21
5.2	Análise do Tissue Micro Array por FISH (Hibridização in situ Fluorescente).....	47
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	66
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Ficha de registro de dados

Anexo 3 Fotomicrografias das reações de imunoistoquímica

Anexo 4 Fotomicrografias das reações de FISH

1 INTRODUÇÃO

Retinoblastoma é o tumor maligno intraocular mais frequente da infância. A célula de origem do tumor é alvo de várias pesquisas. Acreditava-se que pudessem ser células da camada nuclear externa da retina devido à semelhança das rosetas de Flexner-Wintersteiner presentes no tumor com as células fotorreceptores da camada externa da retina (TSO1980). Mais tarde, sugeriu-se que a célula de origem está na camada nuclear interna da retina, baseada na topografia de origem dos tumores (GALLIE et al. 1999). Baseado na observação de que as mutações ocorrem em células em divisão celular, DYER e BREMMER (2005) consideram a célula progenitora da retina como a célula de origem do Retinoblastoma.

Em 1971, KNUDSON propôs a hipótese “*two hits*”, a qual afirmava que a inativação de dois alelos de um gene supressor de tumor era necessária para o desenvolvimento do Retinoblastoma. Baseado nas formas de apresentação clínica do Retinoblastoma, Knudson propôs que pacientes com a forma bilateral ou multifocal (30 a 40% dos casos) nasciam com uma cópia do alelo do gene supressor de tumor inativada e, posteriormente, ocorria a inativação do outro alelo do par cromossômico. Nos pacientes com tumor unilateral unifocal (60 a 70%) a inativação dos alelos ocorria em uma única célula da retina.

Este foi o primeiro gene supressor de tumor clonado e denominado *RB1* (FRIEND et al. 1986). Em 1988, HARBOUR et al. descreveram que o

RB1 também está mutado em casos de câncer de pulmão. Atualmente, são amplamente conhecidas que lesões genéticas na via do *RB1*, que alteram a regulação da proliferação celular, estão presentes na maioria dos tumores.

A progressão de uma célula normal da retina para um tumor envolve o acúmulo sequencial de alterações genéticas. A perda dos dois alelos do gene *RB1* (evento M1 e M2) é necessária, porém não é suficiente para o desenvolvimento do Retinoblastoma (DIMARAS e GALLIE 2010).

O primeiro evento (M1) pode ser herdado ou ocorrer esporadicamente em uma célula suscetível da retina. O segundo evento (M2) é sempre esporádico. A perda dos dois alelos predispõe a formação de um tumor benigno, o retinoma. Enquanto um número subsequente de eventos mutacionais (M3 - Mn) levam ao desenvolvimento do Retinoblastoma (DIMARAS e GALLIE 2010).

Estes eventos subsequentes podem corresponder a ganhos ou perdas cromossômicas presentes no Retinoblastoma. Estudos utilizando hibridização genômica comparativa revelaram os ganhos (1q, 2p e 6p) e perdas (16q) mais frequentes. Estes ganhos e perdas representam potenciais oncogenes e genes supressores de tumores, respectivamente (CORSON e GALLIE 2007).

Cerca de 50% dos casos de Retinoblastoma mostram ganho de 1q (*KIF14*), identificado como potencial oncogene. *KIF14* quando superexpresso facilita a proliferação celular e leva ao crescimento tumoral. Está relacionado com prognóstico ruim em tumores de pulmão e mama (DIMARAS e GALLIE 2010).

E2F3 tem papel na iniciação do ciclo celular e na regulação de *DEK*, um oncogene conhecido em muitos tipos de câncer, responsável por várias funções, entre elas remodelação cromossômica e regulação da transcrição. Esses genes estão localizados no braço curto do cromossomo 6 (6p22). Em retinoblastoma, quando estão superexpressos, suas funções são alvo de estudos por não estarem claras (DIMARAS e GALLIE 2010).

O ganho de 2p (*NMYC*) ocorre em retinoblastoma e seu papel na oncogênese do tumor ainda está sob investigação (DIMARAS e GALLIE 2010).

A tumorigênese envolve lesões genéticas sequenciais nas vias que regulam a proliferação celular, sobrevivência celular e outros processos biológicos. Tem sido proposto que ambas as vias: *p16^{Ink4a}-CycD/Cdk-4-pRb* e *Arf-MDM2/MDMX-p53* devem estar inativadas durante o processo de progressão do câncer. O principal papel da via *RB1* é regular a divisão celular e o da via do *TP53* é regular a resposta da célula aos insultos, tais como dano ao DNA ou stress oncogênico. Estas vias podem ser inativadas por mutações do *RB1* e *TP53*, genes supressores de tumor, ou através de alterações de outros genes da via. Por exemplo, alguns cânceres tem amplificação de *MDM2* que funcionalmente suprime a via de p53, reduzindo os níveis da proteína p53 (LAURIE et al. 2007).

Pequenas e potentes moléculas denominadas *nutlins* foram identificadas com antagonistas de MDM2/MDMX. Elas se ligam a MDM2, bloqueando a ligação de MDM2 a p53, resultando em uma dramática estabilização de p53 e sua ativação. Em resposta ao tratamento com nutlin-

3, células neoplásicas p53+ entram em apoptose ou sofrem parada do ciclo celular (DU et al. 2009).

Portanto a análise de expressão de pRb, p53 e MDM2 em células de retinoblastoma assume importância fundamental para definição de novas terapias, incluindo a utilização de nutlin-3.

Modelos animais em camundongos tem sido desenvolvidos para estudar a melhor combinação de quimioterápicos para o tratamento do retinoblastoma. Levando-se em conta as novas descobertas, tem-se associado estas novas moléculas antagonistas de MDM2/MDMX aos tratamentos convencionais para avaliação de respostas. Assim observou-se que a utilização de topotecan sistêmico com *nutlin* subconjuntival em modelos animais teve resposta terapêutica superior comparada ao tratamento com quimioterapia convencional (BRENNAN et al. 2011).

Em neoplasias hematológicas e tumores sólidos a presença de anormalidades cromossômicas recorrentes é considerada fator prognóstico independente. Em particular, a amplificação de *NMYC* está associada a pior prognóstico em neuroblastoma (GEORGE et al. 2001; LASTOWSKA et al. 2001). O Retinoblastoma, assim como neuroblastoma, tem origem neuroectodérmica e ambos compartilham padrão de metástases semelhante, disseminando-se para osso, medula óssea, linfonodos e sistema nervoso central. A amplificação de *NMYC* também está descrita em retinoblastoma, podendo representar um marcador molecular para avaliação de prognóstico (LILLINGTON et al. 2002).

Um grande desafio, além da detecção precoce do tumor, é a abordagem terapêutica ideal para cada paciente.

O tratamento do Retinoblastoma objetiva salvar a vida e preservação de visão útil, portanto, precisa ser individualizado. Muitas vezes salvar a vida inclui a enucleação unilateral ou bilateral.

Há evidências que as duas formas da doença têm a mesma origem celular, porém comportamento diferente quanto à chance de preservação de olho com visão útil quando submetidas ao tratamento quimioterápico neoadjuvante (ANTONELI et al. 2006).

A determinação do status destes genes nos pacientes submetidos à enucleação e sua correlação com dados clínicos poderá fornecer informações importantes que poderão ser úteis para a definição de estratégias do tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar o número de cópias genômicas de *NMYC*, *MDM2* e *TP53* e da expressão protéica de MDM2, p53 e pRb em pacientes tratados de retinoblastoma submetidos à enucleação primária ou pós quimioterapia através da técnica de FISH (hibridização in situ fluorescente) e imunoistoquímica.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- 1 Correlacionar os dados de alterações genômicas de *NMYC*, *MDM2* e *TP53* com grau de diferenciação histológica do tumor, infiltração de nervo óptico, infiltração de coróide, lateralidade (unilateral; bilateral) e extensão de doença (intraocular; extraocular)
- 2 Correlacionar os dados de expressão protéica de MDM2, p53 e pRb com grau de diferenciação histológica do tumor, infiltração de nervo óptico, infiltração de coróide, lateralidade (unilateral; bilateral) e extensão de doença (intraocular; extraocular)
- 3 Correlacionar os dados de alterações genômicas de *NMYC*, *MDM2* e *TP53* e expressão protéica de MDM2, p53 e pRb com a probabilidade de sobrevida global após cinco anos e de acordo com o grau de

diferenciação histológica do tumor, infiltração de nervo óptico, infiltração de coróide, lateralidade (unilateral; bilateral) e extensão de doença (intraocular; extraocular)

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo e retrospectivo baseado na análise de dados clínicos obtidos dos prontuários e da análise dos resultados da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e de imunoistoquímica em material de parafina dos pacientes com diagnóstico de Retinoblastoma submetidos à enucleação primária ou pós quimioterapia de um único olho admitidos no Departamento de Oncologia Pediátrica do A.C. Camargo Cancer Center no período de 01 de janeiro de 1986 a 31 de dezembro de 2003. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-CEP, sob o nº 1676/12 (Anexo 1).

3.2 CASUÍSTICA

3.2.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com diagnóstico de Retinoblastoma unilateral ou bilateral submetidos à enucleação primária ou pós quimioterapia de um único olho.
- Pacientes com diagnóstico de Retinoblastoma unilateral ou bilateral submetidos à enucleação primária ou pós quimioterapia de um único

olho com informação registrada em prontuário que permita obtenção dos dados clínicos e anatomopatológicos.

3.2.2 Critérios de exclusão

- Pacientes que realizaram enucleação em outro serviço, sem disponibilidade de blocos e lâminas de parafina para revisão no Departamento de Patologia do A.C. Camargo Cancer Center.
- Pacientes cujo anatomopatológico demonstrou regressão total da neoplasia devido ao uso de quimioterapia prévia ou com diagnóstico de *phthisis bulbi*
- Pacientes com material insuficiente ou sem qualidade técnica para realização das técnicas de imunoistoquímica e FISH.

3.3 PROCEDIMENTOS

Os casos submetidos à enucleação foram recuperados do arquivo de anatomia patológica e revisados. Os casos contendo material suficiente para análise foram selecionados para confecção de um “*tissue microarray*”. O status dos genes *TP53*, *MDM2* e *NMYC* caracterizados por alterações genômicas definidas pelo número de cópias dos genes (perdas ou ganhos) e pela sua expressão protéica foram avaliados através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e pela técnica de imunoistoquímica respectivamente e seguindo protocolos já estabelecidos no Departamento de Anatomia Patológica desta instituição.

O TMA foi construído utilizando-se o dispositivo técnico chamado de “*tissue microarray*” (Beecher Instruments, silver springs, EUA). A área identificada no bloco de parafina do doador foi puncionada com agulha de 1mm e os cilindros obtidos transferidos para o bloco de parafina receptor. Um mapa com identificação detalhada de cada cilindro foi construído em planilha de Excel®, permitindo a localização exata de cada caso. Um caso foi definido como adequado quando o corte resultante ocupou pelo menos 24% da área total do cilindro.

Hibridização *in situ* fluorescente foi realizada em “*tissue microarray*”. Foram utilizadas as sondas específicas para os genes *NMYC*, *MDM2* e *TP53* (Tabela 1) que foram aplicadas aos cortes de tecidos obtidos a partir dos blocos de parafina. As hibridizações foram realizadas em ensaios com dois dias de duração. Os cortes histológicos de 5 µm de espessura foram colocados em lâminas de vidro carregadas com cargas elétricas (Starfrost). Em seguida foram submetidas a desparafinização em 3 banhos de xileno a temperatura ambiente por 10 minutos cada, seguindo-se 3 passagens em álcool absoluto e lavagem com água corrente, as lâminas foram colocadas por 20 minutos em solução de 0,2N HCL a temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas em água corrente e aquecidas em solução de Citrato pH 6,0 a 80°C em banho-maria por 30 minutos. Os cortes foram então submetidos à digestão enzimática com pepsina na composição *ready-to-use* por 8 minutos a temperatura ambiente, lavados com solução 2 x SSC, desidratados com etanol em concentrações crescentes (70%, 85% e 96% 2 minutos cada) e deixados secando na temperatura ambiente por cerca de 5

minutos. Em seguida foi realizada a aplicação da sonda (10 µl, previamente diluída em tampão de hibridização pelo fabricante) sobre os cortes de tecido, cobertos com lamínula e vedados com material selante. As lâminas foram colocadas no hibridizador (*Hybridizer* - DAKO®) e foi realizada a codenaturação e hibridização da sonda e espécime com tempos e temperaturas pré-definidas pelo fabricante (Quadro 1).

Quadro 1 - Sondas e especificações de codenaturação e hibridização conforme fabricantes utilizadas para técnica de FISH empregada na análise dos casos de Retinoblastoma no período de 1986 a 2003 no A.C. Camargo Cancer Center

Sonda	Marca	Codenaturação	Hibridização
NMYC	Vysis	80°C - 5 minutos	37°C - 20 horas
MDM2	Zytovision	75°C - 10 minutos	37°C - 20 horas
TP53	Kreatech	90°C - 10 minutos	37°C - 20 horas

No segundo dia, os cortes foram retirados do hibridizador e, após remoção do selante e lamínulas colocados por 30 minutos em uma solução de 1,5M Urea/0,1 x SSC pré-aquecida em banho-maria a 45° C, lavados com solução 2x SSC a temperatura ambiente por 2 minutos, desidratados com passagens em etanol (70%, 85% e 96% 2 minutos cada) e secaram por cerca de 1 hora em local escuro. A seguir foi feita a contracoloração e montagem com DAPI coberto com lamínula. As lâminas prontas foram para observação no microscópio trinocular com fluorescência de mercúrio (Olympus® BX41-FL-III), equipado com objetiva de imersão e com os filtros adequados. As imagens obtidas foram capturadas com uma câmera colorida

digital refrigerada (5.1 megapixel) acoplada ao microscópio acima, usando o programa para análise de imagem *Image Pro® Plus* versão 6.0 (Olympus®).

Para técnica de imunoistoquímica os cortes de 4 micrômetros de espessura foram colocados em lâminas com carga elétrica (Starfrost) e mantidas em estufa a 60°C *overnight*.

As lâminas foram identificadas e desparafinadas em xilol (3 trocas de 5 minutos cada); depois, passadas em álcool etílico em concentração decrescente (100%, 85% e 75%) e depois lavadas em água corrente por 5 minutos.

A recuperação antigênica por calor foi realizada utilizando banho-maria a 96°C por 40 minutos em tampão citrato, pH=6,0 para o anticorpo MDM2 e panela de pressão elétrica a 125°C para o anticorpo pRb. A reação para o anticorpo p53 foi realizada no equipamento VENTANA XT, com anticorpo na composição pronto para uso conforme protocolo pré-estabelecido (Quadro 2).

Quadro 2 - Anticorpos e especificações para diluição, recuperação antigênica e incubação primária conforme fabricantes utilizadas para técnica de imunistoquímica empregada na análise dos casos de Retinoblastoma no período de 1986 a 2003 no A.C. Camargo Cancer Center

Anticorpo	Fabricante	Clone	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação Primária	Kit de detecção
pRb	NovoCastra	13A10	1/200	Panela de pressão Citrato pH6,0	1 hora	Novolink Max polymer detection kit
p53	VENTANA	DO-7	Ready-to-use	Cell Conditioning Solution(CC1) pH 8,0 36 min	32 min	Ultraview Universal DAB Detection Kit - VENTANA
MDM2	Neomarkers	Policlonal	1/150	banho-maria Citrato pH6,0	1 hora	Novolink Max polymer detection kit

Para os anticorpos pRb e MDM2 após a recuperação antigênica, as lâminas foram resfriadas e lavadas em 2 banhos de PBS de 5 minutos cada.

A peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, com 3 trocas de 5 minutos cada, sendo as lâminas, a seguir, lavadas em água corrente e um banho de PBS de 5 minutos.

Em seguida os cortes foram incubados com bloqueador de proteínas (DAKO) por 2 minutos, à temperatura ambiente e em câmara úmida.

O excesso do bloqueador foi retirado e os cortes incubados com anticorpo primário, por 90 minutos à temperatura ambiente.

As lâminas foram lavadas em tampão PBS (3 trocas de 5 minutos cada) e, em seguida, incubadas com o anticorpo pós-primário secundário e

com o polímero HRP (Kit Novolink-Novocastra), durante 30 minutos cada reagente, em câmara úmida, à temperatura ambiente.

Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados com o cromógeno 3,3Diaminobenzidina (DAB – DAKO), por 5 minutos, sendo as lâminas lavadas em água corrente e contracoradas com hematoxilina de Harris, por 2 minutos; lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, xilol, e montadas em equipamento automatizado (*Tissue-Tek film*).

Os resultados da análise da imunoistoquímica foram divididos em faixas de positividade de porcentagem: até 10%, de 11 a 20%, de 21 a 30%, de 31 a 40% e maior que 40% para a expressão protéica de MDM2. Para análise estatística da probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dividimos em duas faixas de valores: até 30% e maior que 30%. Para a análise da expressão protéica de p53, consideremos as seguintes faixas de positividade: até 10%, de 11 a 20% e maior que 20%; Para análise da probabilidade de sobrevida global consideramos duas faixas: até 20% e maior que 20%. Para as análises de interpretação dos resultados dos testes de FISH consideramos duas categorias: amplificado e não amplificado.

Um caso foi considerado amplificado quando havia mais de 5 cópias do gene estudado e apenas 2 cópias do centrômero do cromossomo do qual o gene está localizado. Caso com 2 cópias do gene e 2 cópias do centrômero foram considerados não amplificados.

A ficha de registro dos dados clínicos e anatomopatológicos de cada paciente, incluindo os resultados da análise do status dos genes e expressão das proteínas estudados está no Anexo 2.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos a partir das informações de dados clínicos, anatomopatológicos e da avaliação dos genes e proteínas estudados foram organizados em um banco de dados e armazenados em uma planilha do Programa “SPSS (*Statistical Package for Social Science*) for Windows”, versão 20.0.

Na apresentação dos resultados utilizamos frequências absolutas (n) e relativas (%) para as variáveis qualitativas, bem como medidas de tendência central e dispersão para as variáveis quantitativas. Na análise de associação entre as variáveis categóricas utilizamos o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando as frequências esperadas foram menores do que cinco. Para todas as análises, foram excluídos os casos classificados como “ignorado”, “desconhecido” ou “não avaliável” de cada variável estudada.

Para estimar as taxas de sobrevida global, foi empregado o método de Kaplan Meier e as curvas foram comparadas pelo teste de log-rank. O tempo de sobrevida foi calculado desde a data do diagnóstico até a data da última consulta ou óbito. Foram considerados perdidos de seguimento aqueles pacientes que, no momento da coleta dos dados, já não compareciam ao hospital por mais de dois anos e estavam vivos na última avaliação.

Para todos os testes estatísticos foi estabelecido um erro $\alpha=5\%$, isto é, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p<0,05$.

5 RESULTADOS

Quatrocentos e sessenta e nove pacientes foram admitidos com diagnóstico de retinoblastoma no período de 01 de janeiro de 1986 a 31 de dezembro de 2003. Duzentos e vinte e cinco casos (47%) foram analisados baseados nos critérios de inclusão e exclusão.

A idade média ao diagnóstico foi de 26 meses e mediana de 23 meses (Figura 1). Cento e catorze pacientes (50,7%) eram do sexo masculino e 111 (49,3%) do sexo feminino. Cento e setenta e um pacientes (76%) tinham tumor unilateral e 54 (24%) pacientes tinham tumor bilateral.

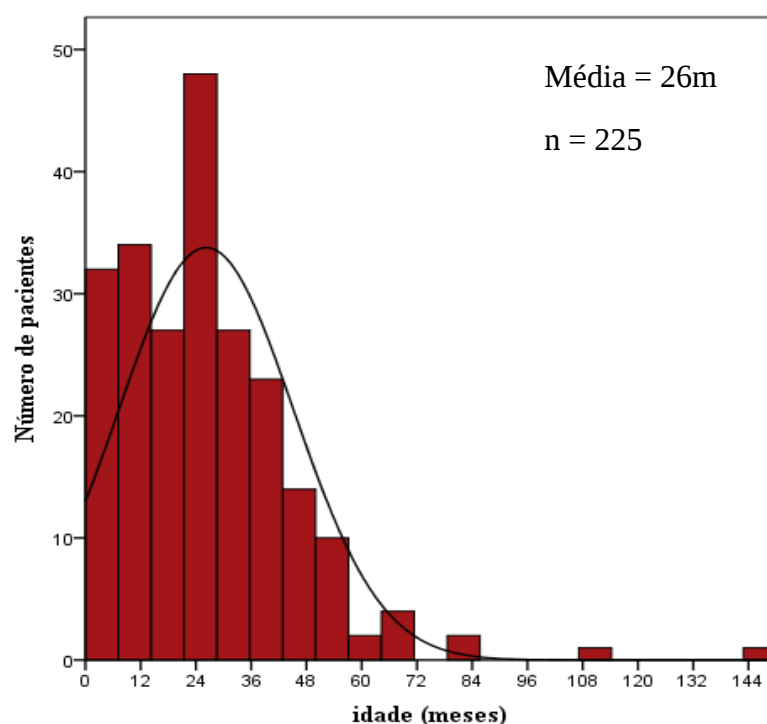


Figura 1 - Número de pacientes com retinoblastoma de acordo com a idade ao diagnóstico em meses, A.C. Camargo Cancer Center 1986 – 2003.

A idade média ao diagnóstico para os pacientes com tumores unilaterais foi de 30 meses e mediana de 26 meses (Figura 2); enquanto a idade média ao diagnóstico para os pacientes com tumores bilaterais foi de 13 meses e mediana de 8 meses (Figura 3). A relação entre sexo masculino: sexo feminino foi de 1,06:1 entre os pacientes com tumores unilaterais e de 0,92:1 para os pacientes com tumores bilaterais.

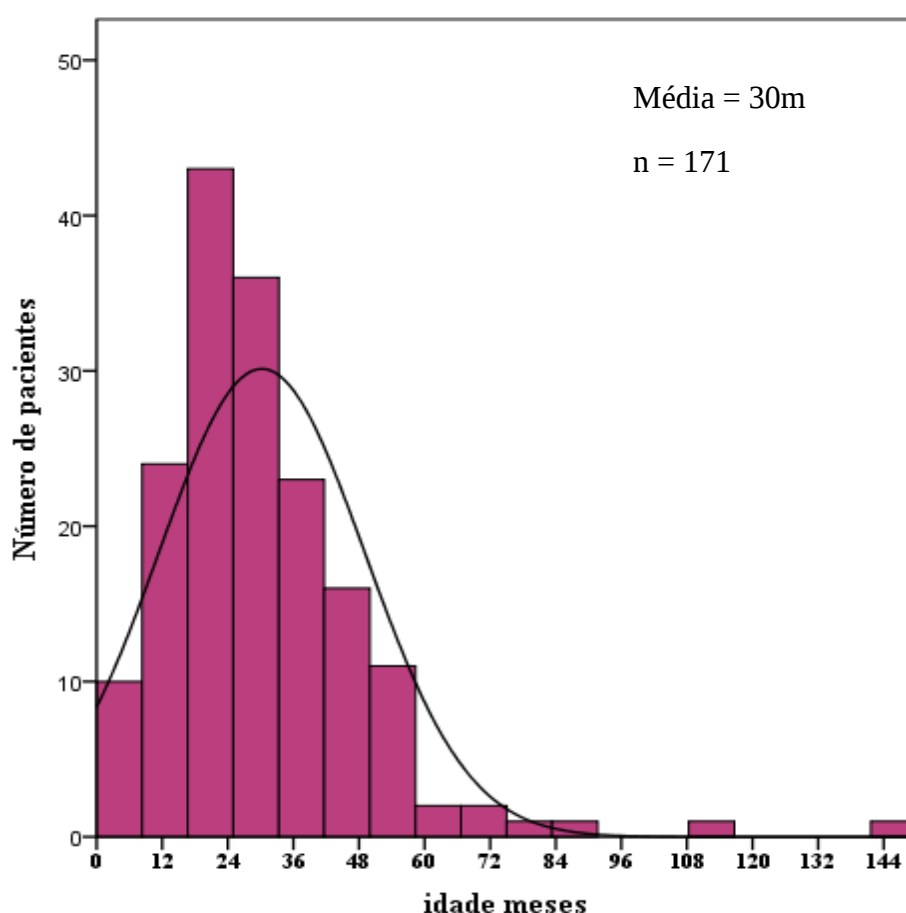


Figura 2 - Número de pacientes com retinoblastoma unilateral de acordo com a idade ao diagnóstico em meses, A.C. Camargo Cancer Center 1986 – 2003.

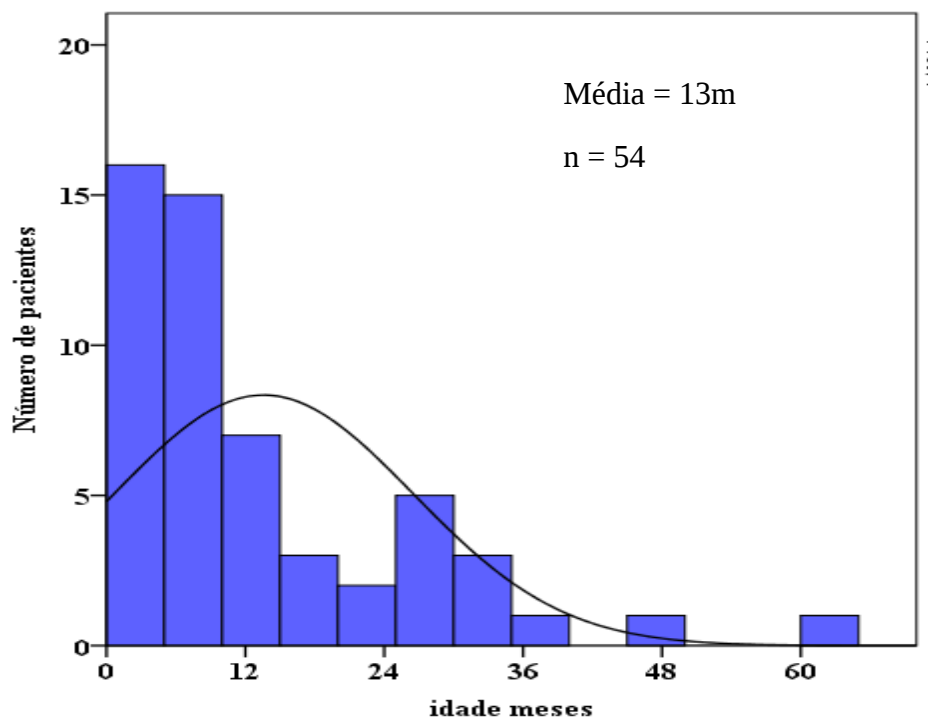


Figura 3 - Número de pacientes com retinoblastoma bilateral de acordo com a idade ao diagnóstico em meses, A.C. Camargo Cancer Center 1986 – 2003.

Cento e oitenta e nove pacientes (84%) apresentavam doença intraocular e 36 pacientes (16%) tinham doença extraocular. Cento e setenta e um (76%) dos pacientes tinham tumor intraocular e 54 (24%) tinha tumor extraocular.

Na análise do grau de diferenciação histológica, os tumores foram classificados em quatro categorias: 58 (25,8%) eram bem diferenciados, 38 (16,9%) moderadamente diferenciados, 56 (24,9%) pouco indiferenciados e 57 (25,3%) indiferenciados.

Noventa e dois pacientes (40,9%) apresentaram infiltração de nervo óptico; destes 92 pacientes, 45 (48,9%) tiveram infiltração pré laminar e 47 (51,1%) tiveram infiltração pós laminar.

A invasão de coróide focal foi evidenciada em 81 pacientes (36%). Infiltração focal estava presente em 39 pacientes (48,1%) e infiltração maciça em 42 pacientes (51,9%).

Houve comprometimento por tumor na margem de secção do nervo óptico em 25 pacientes (11,1%).

Na Tabela 1 estão descritos os dados clínicos relatados acima.

Tabela 1 - Variáveis clínicas dos pacientes com diagnóstico de retinoblastoma submetidos à enucleação, A.C. Camargo Cancer Center 1986 – 2003

Variável	Pacientes (%)
Sexo	
Masculino	114 (50,7)
Feminino	111 (49,3)
Lateralidade	
Unilateral	171 (76)
Bilateral	54 (24)
Extensão da doença	
Intraocular	189 (84)
Extraocular	36 (16)
Infiltração de coróide	
Sem infiltração	133 (59,1)
Com infiltração	81 (36)
Ignorado	11 (4,9)
Infiltração de nervo óptico	
Sem infiltração	122 (54,2)
Com infiltração	92 (40,9)
Ignorado	11 (4,9)
Diferenciação histológica	
Bem diferenciado	58 (25,8)
Moderadamente diferenciado	56 (24,9)
Pouco diferenciado	57 (25,3)
Indiferenciado	38 (16,9)
Ignorado	16 (7,1%)

5.1 ANÁLISE DO TISSUE MICRO ARRAY POR IMUNOISTOQUÍMICA

MDM2 foi avaliável em 151 pacientes (67,1%). Seis pacientes (4%) expressaram em até 10% das células, 57 (37,7%) entre 11 a 20% 26 (17,2%) entre 21 a 30% 21 (14%) entre 31 a 40% e 41 (27,1%) em mais que 40% das células. Não foi possível a análise em 74 pacientes (32,9%) Tabela 2.

Não houve expressão da proteína pRb em nenhum dos casos analisados.

A expressão protéica de p53 foi avaliável em 146 pacientes (64,9%). Oitenta e um pacientes (55,5%) apresentaram expressão em até 10% das células, 48 pacientes (32,9%) entre 11 a 20% e 17 pacientes (11,6%) acima de 20%. Não foi possível a análise em 79 pacientes (35,1%) Tabela 2.

Tabela 2 - Número de pacientes conforme faixas de porcentagem de positividade de expressão das proteínas MDM2 e p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Proteína	Pacientes (%)
MDM2	151 (67,1) / 225 (100)
Até 10%	6 (4)
11 a 20%	57 (37,7)
21 a 30%	26 (17,2)
31 a 40%	21 (14)
> 40%	41 (27,1)
p53	146 (64,9) / 225 (100)
Até 10%	81 (55,5)
11 a 20%	48 (32,9)
> 20%	17 (11,6)

Analizamos a expressão das proteínas MDM2 e p53 com o grau de diferenciação histológica (bem diferenciado e moderadamente diferenciado; pouco diferenciado e indiferenciado), infiltração de coróide, infiltração de nervo óptico, lateralidade (unilateral; bilateral) e extensão do tumor ao diagnóstico (doença intraocular; doença extraocular). Os resultados estão demonstrados nas Tabelas 3 a 7, respectivamente. Não houve significância estatística nesta amostra para as variáveis analisadas

Tabela 3 - Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a expressão das proteínas MDM2 e p53 e grau de diferenciação histológica, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.

Proteína	Faixa de valores (%)	Grau de diferenciação histológica (%)		p
		Bem diferenciado e Moderadamente diferenciado	Pouco diferenciado e Indiferenciado	
MDM2	0 – 10	3 (4,8)	3 (3,8)	0,458
	11 – 20	28 (44,4)	27 (33,8)	
	21 – 30	11 (17,5)	12 (15)	
	31 - 40	6 (9,5)	15 (19)	
	> 40	15 (23,8)	23 (28,4)	
p53	0 – 10	34 (54,0)	44 (57,9)	0,874
	11 – 20	21 (33,3)	24 (31,6)	
	> 20	8 (12,7)	8 (10,5)	

Tabela 4 - Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a expressão das proteínas MDM2 e p53 e infiltração de coróide, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.

Proteína	Faixa de valores (%)	Infiltração de coróide (%)		p
		Não	Sim	
MDM2	0 – 10	4 (4,4)	2 (3,5)	0,784
	11 – 20	31 (34,4)	25 (43,9)	
	21 – 30	18 (20,0)	8 (14)	
	31 – 40	12 (13,3)	8 (14)	
	> 40	25 (27,8)	14 (24,6)	
p53	0 – 10	44 (50,6)	36 (64,3)	0,266
	11 – 20	31 (35,6)	15 (26,8)	
	> 20	12 (13,8)	5 (8,9)	

Tabela 5 - Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a expressão protéica de MDM2 e p53 e infiltração de nervo óptico, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Proteína	Faixa de valores (%)	Infiltração de nervo óptico (%)		p
		Não	Sim	
MDM2	0 – 10	2 (2,4)	4 (6,7)	0,143
	11 – 20	32 (37,6)	24 (40)	
	21 – 30	19 (22,4)	5 (8,3)	
	31 - 40	10 (11,8)	11 (18,3)	
	> 40	22 (25,9)	16 (26,7)	
p53	0 – 10	49 (57,6)	28 (50)	0,637
	11 – 20	27 (31,8)	20 (35,7)	
	> 20	9 (10,6)	8 (14,3)	

Tabela 6 - Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a expressão das proteínas MDM2 e p53 com a lateralidade, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Proteína	Faixa de valores (%)	Lateralidade (%)		p
		Unilateral	Bilateral	
MDM2	0 – 10	3 (2,5)	3 (10)	0,199
	11 – 20	48 (39,7)	9 (30)	
	21 – 30	22 (18,2)	4 (13,3)	
	31 – 40	18 (14,9)	3 (10)	
	> 40	30 (24,8)	11 (36,7)	
p53	0 – 10	63 (55,3)	18 (56,2)	0,969
	11 – 20	38 (33,3)	10 (31,2)	
	> 20	13 (11,4)	4 (12,5)	

Tabela 7 - Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a expressão protéica de MDM2 e p53 e extensão da doença, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Proteína	Faixa de valores (%)	Extensão da doença (%)		p
		Intraocular	Extraocular	
MDM2	0 – 10	6 (4,5)	0 (0)	0,542
	11 – 20	48 (35,8)	9 (52,9)	
	21 – 30	24 (17,9)	2 (11,8)	
	31 - 40	18 (13,4)	3 (17,6)	
	> 40	38 (28,4)	3 (17,6)	
p53	0 – 10	72 (55,8)	9 (52,9)	0,614
	11 – 20	41 (31,8)	7 (41,2)	
	> 20	16 (12,4)	1 (5,9)	

A análise da probabilidade de sobrevida global após 5 anos de acordo com a expressão de MDM2 foi de 95,2% para os pacientes com expressão até 30% e de 91,7% para os pacientes com expressão maior que 30% (p = 0,214). Figura 4

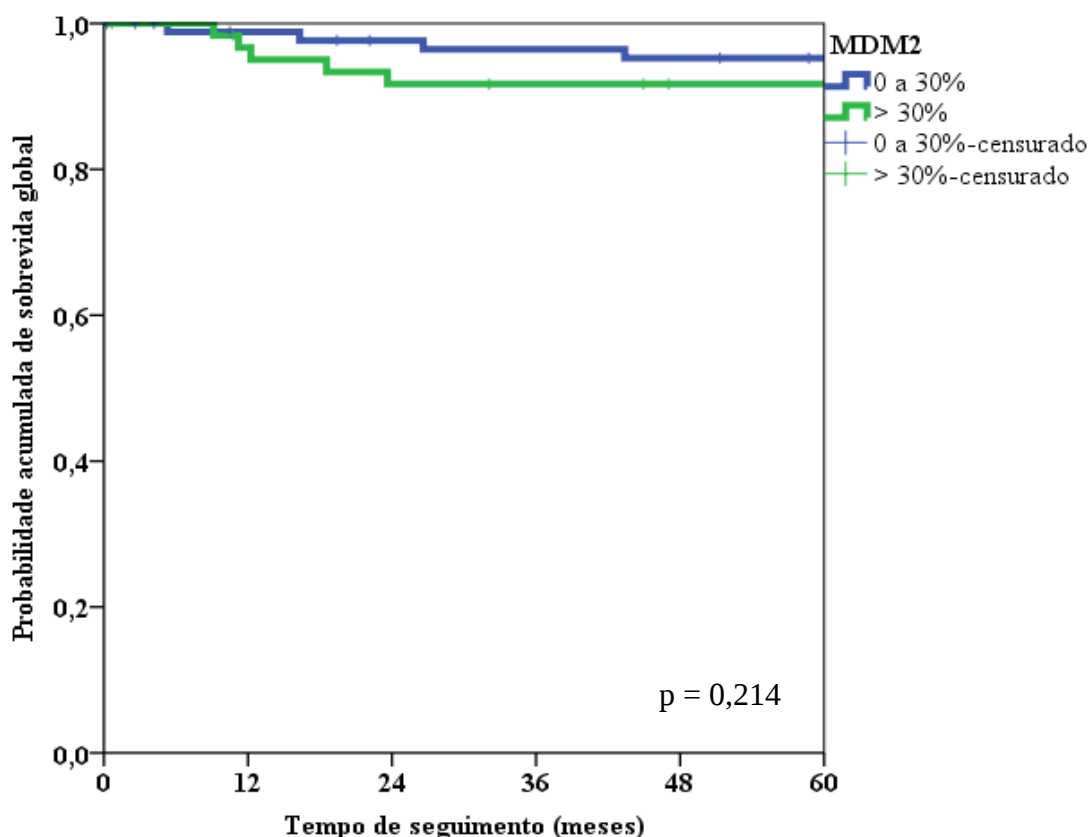


Figura 4 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Analizamos a probabilidade de sobrevida global após 5 anos segundo a expressão de MDM2 para cada uma das seguintes variáveis: grau de diferenciação histológica, lateralidade, extensão do tumor, infiltração de coróide e infiltração de nervo óptico.

Para os tumores bem ou moderadamente diferenciados com expressão de MDM2 até 30% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 97,5% e para aqueles com MDM2 maior 30% a sobrevida global após cinco anos foi de 89,5% ($p = 0,015$). Figura 5

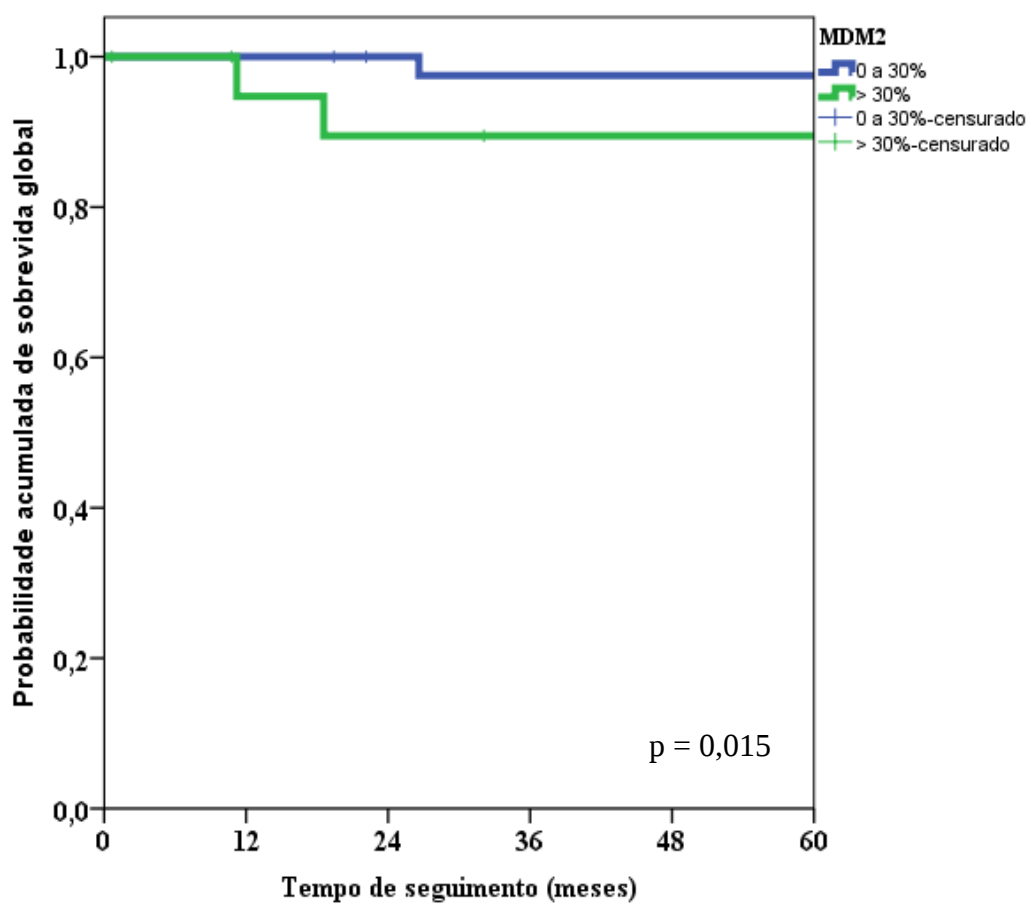


Figura 5 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma bem ou moderadamente diferenciados segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os tumores pouco diferenciados ou indiferenciados com expressão de MDM2 até 30% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 92,2% e para aqueles com MDM2 maior 30% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 92,1% ($p = 0,712$). Figura 6.

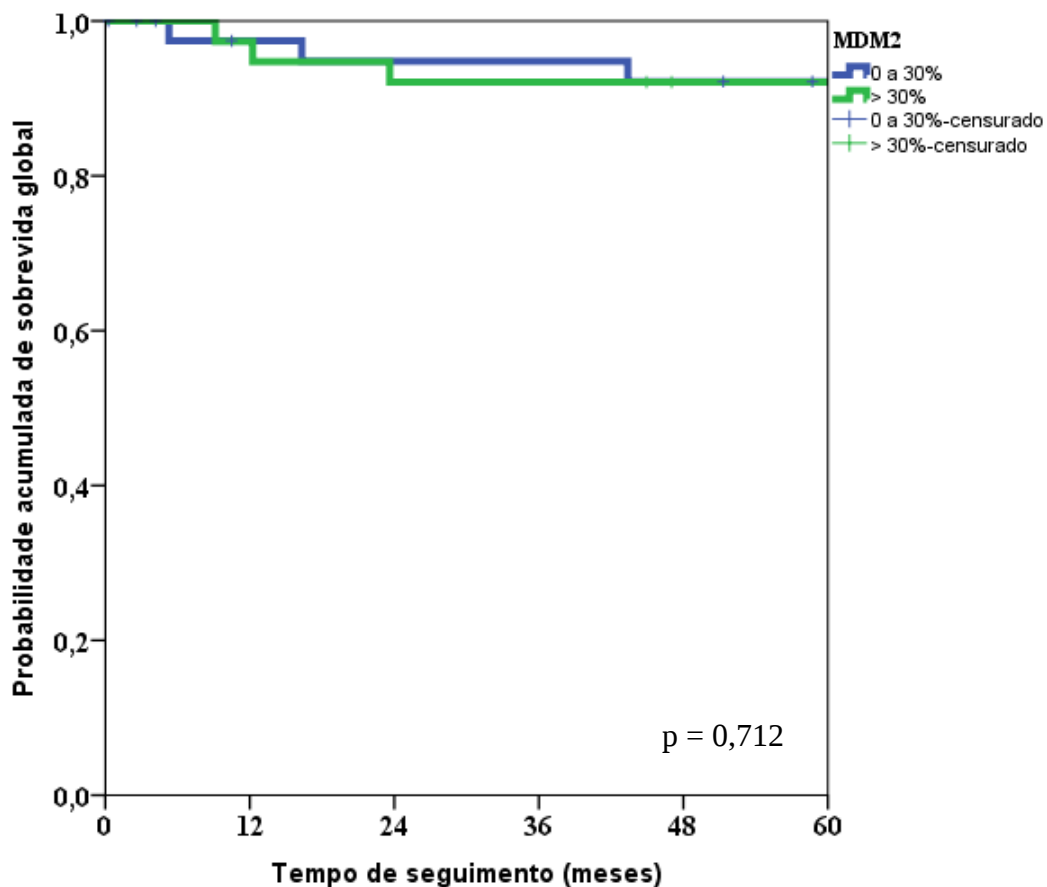


Figura 6 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma pouco diferenciados ou indiferenciados segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.

Para os tumores intraoculares os pacientes com expressão de MDM2 até 30% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 98,6% e os pacientes com expressão maior que 30% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi 94,4% ($p = 0,037$). Figura 7

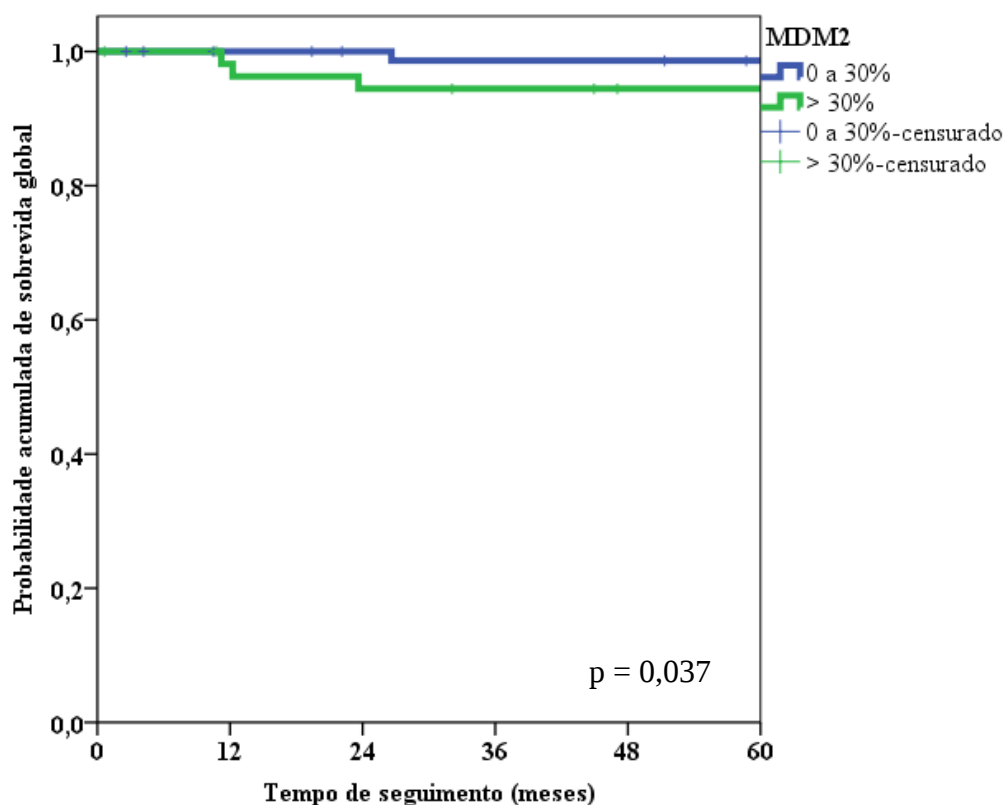


Figura 7 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma intraocular segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.

Para os tumores extraoculares os pacientes com expressão de MDM2 até 30% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 70% e os pacientes com expressão maior que 30% a sobrevida global após cinco anos foi 66,7% ($p = 0,898$). Figura 8.

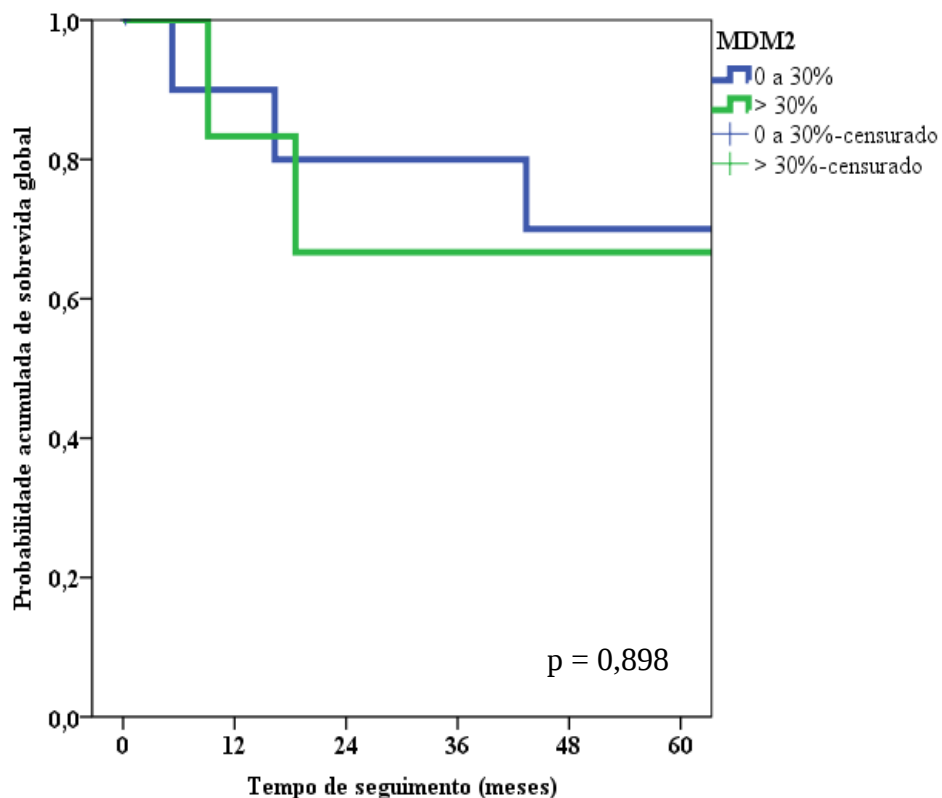


Figura 8 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma extraocular segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os tumores unilaterais os pacientes com expressão de MDM2 até 30% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 94,2% e os pacientes com expressão maior que 30% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 91,3% ($p = 0,542$). Figura 9

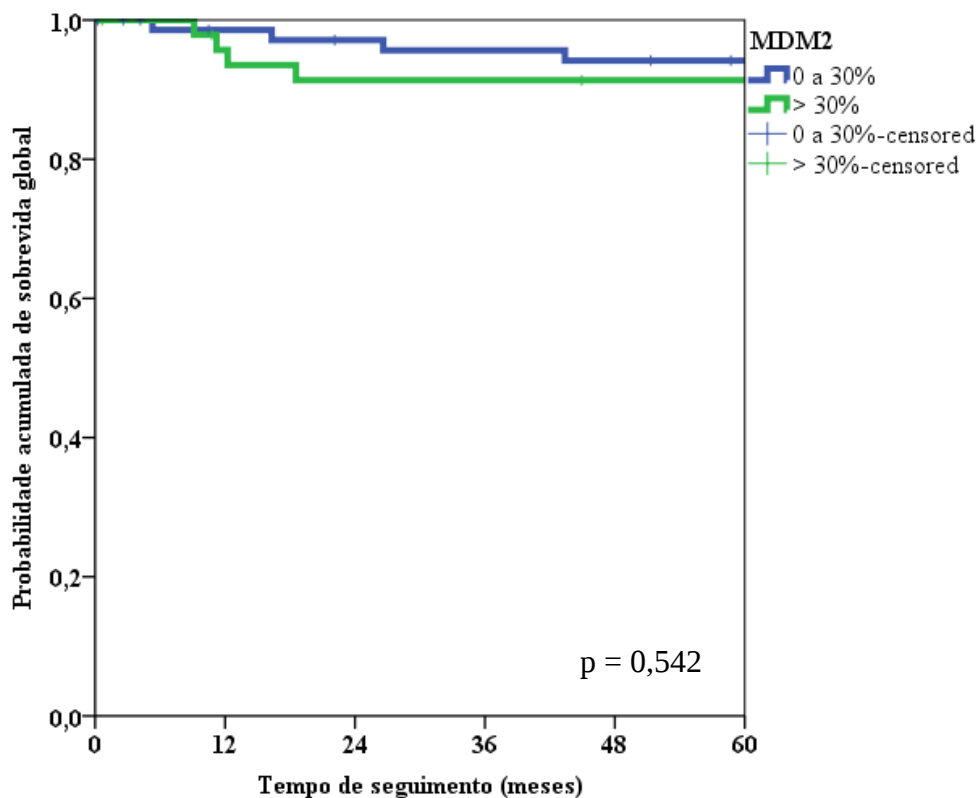


Figura 9 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma unilateral segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os tumores bilaterais os pacientes com expressão de MDM2 até 30% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 100% e os pacientes com expressão maior que 30% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 92,9% ($p = 0,189$). Figura 10

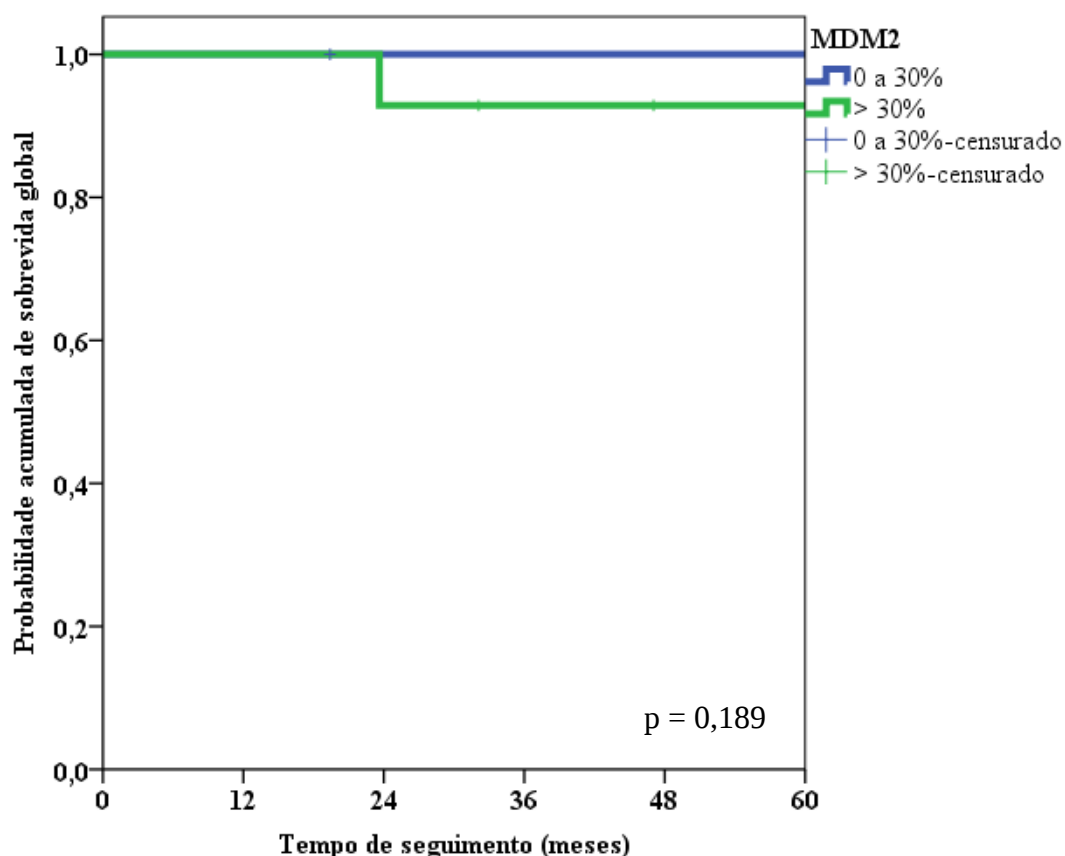


Figura 10 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma bilateral segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.

Para os pacientes sem infiltração de coróide e com expressão de MDM2 até 30% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 98% e os pacientes com expressão maior que 30% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi 97,2% ($p = 0,719$). Figura 11

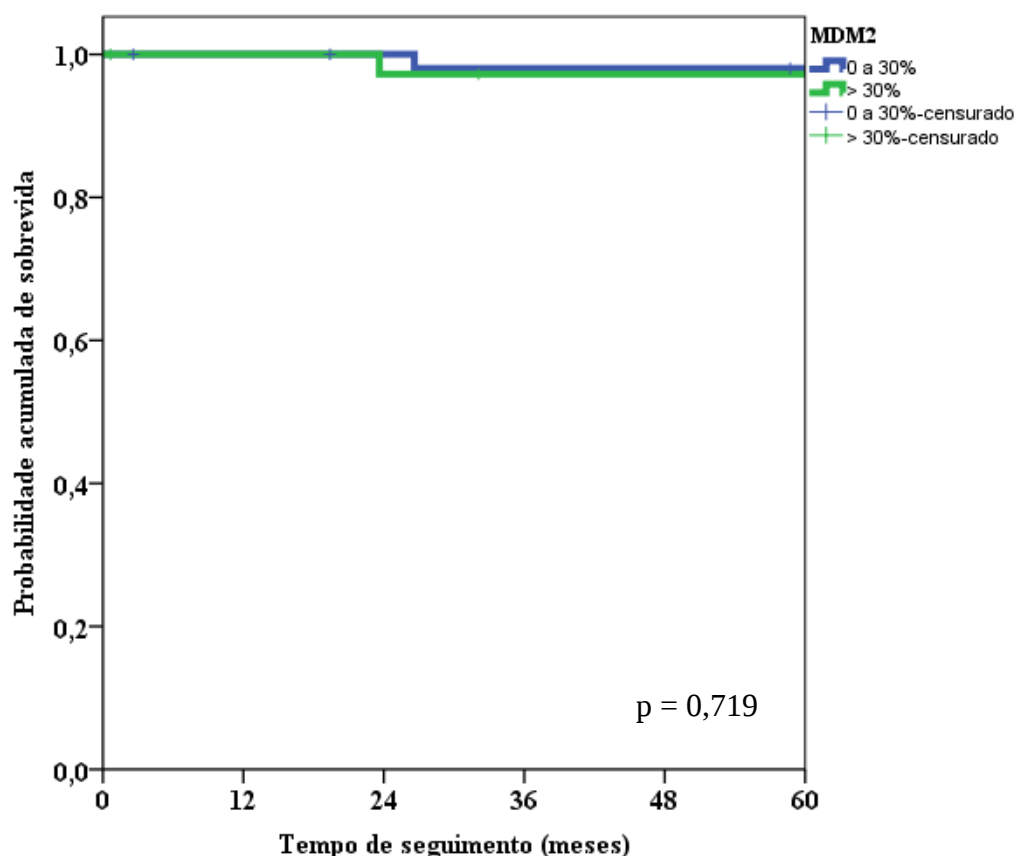


Figura 11 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma sem infiltração de coróide segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.

Para os pacientes com infiltração de coróide e com expressão de MDM2 até 30% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 93,6% e os pacientes com expressão maior que 30% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi 81,1 % ($p = 0,062$). Figura 12

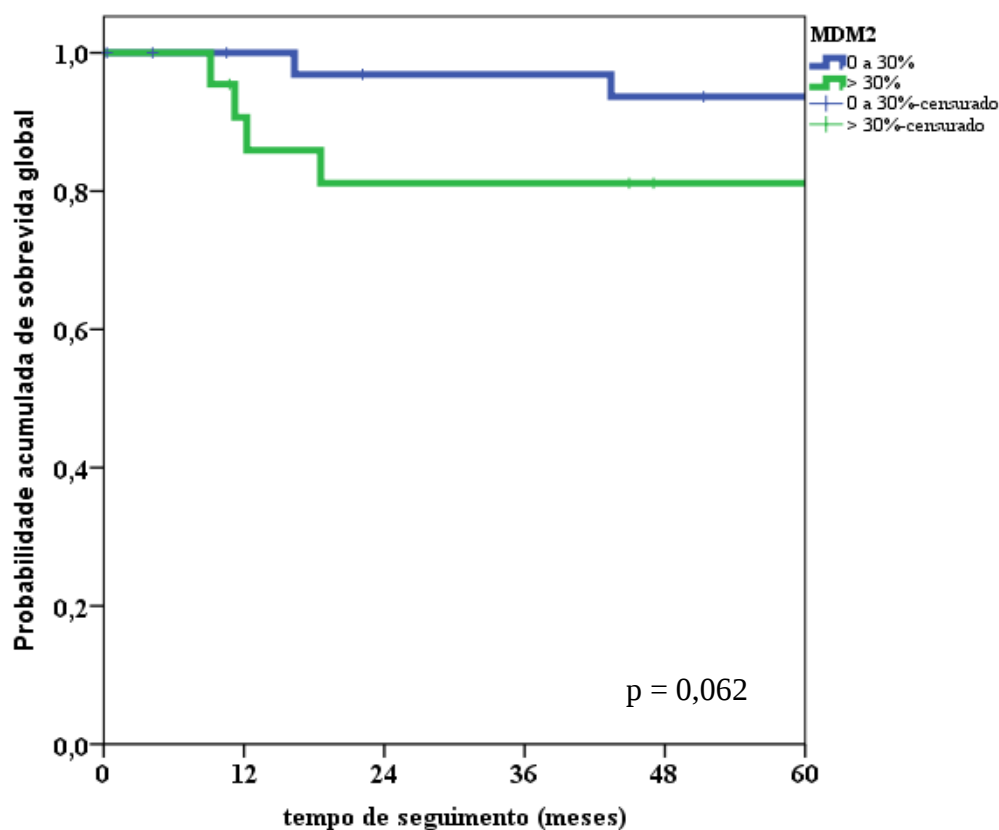


Figura 12 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma com infiltração de coróide segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.

Para os pacientes sem infiltração de nervo óptico e com expressão de MDM2 até 30% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 100% e os pacientes com expressão maior que 30% a sobrevida global após cinco anos foi 93,5% ($p = 0,02$). Figura 13

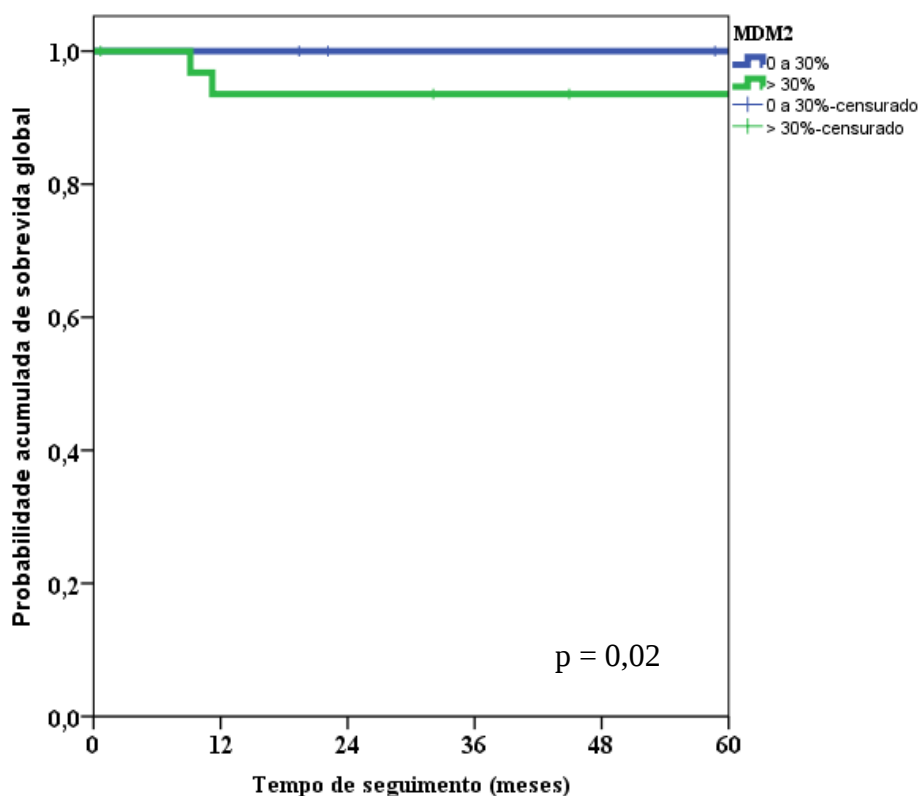


Figura 13 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma sem infiltração de nervo óptico segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os pacientes com infiltração de nervo óptico e com expressão de MDM2 até 30% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 86,3% e os pacientes com expressão maior que 30% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 88,5 % ($p = 0,878$). Figura 14

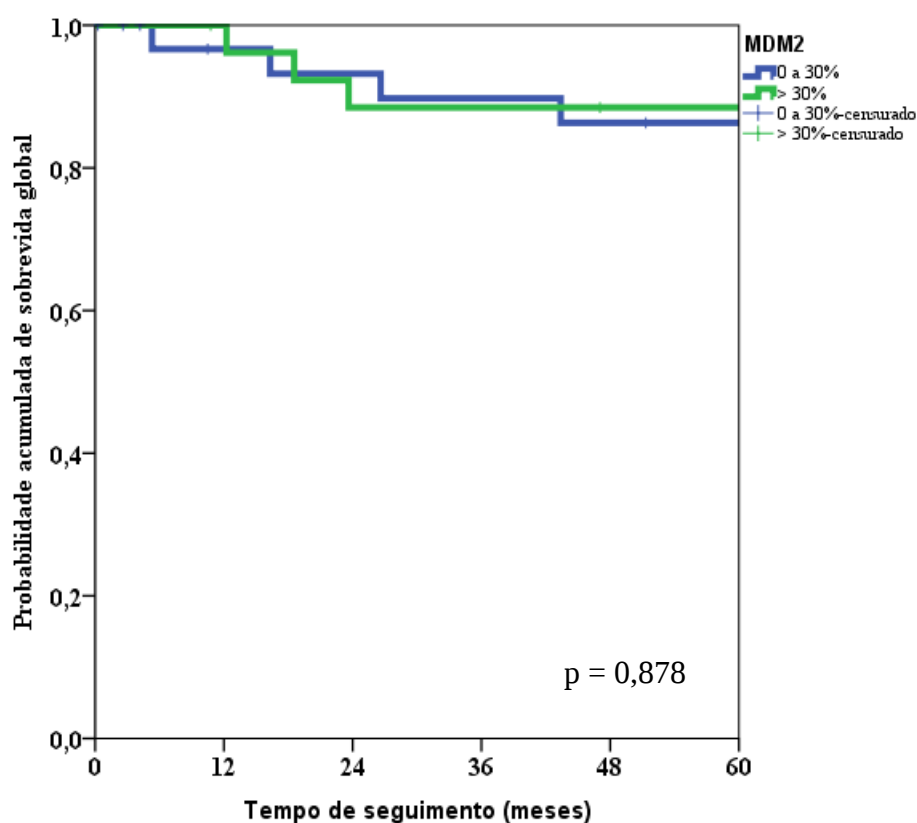


Figura 14 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma com infiltração de nervo óptico segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.

A probabilidade sobrevida global após cinco anos de acordo com a expressão de p53 foi de 93,5% para os pacientes com expressão até 20% e de 86,7% para os pacientes com expressão maior que 20% ($p = 0,097$). Figura 15.

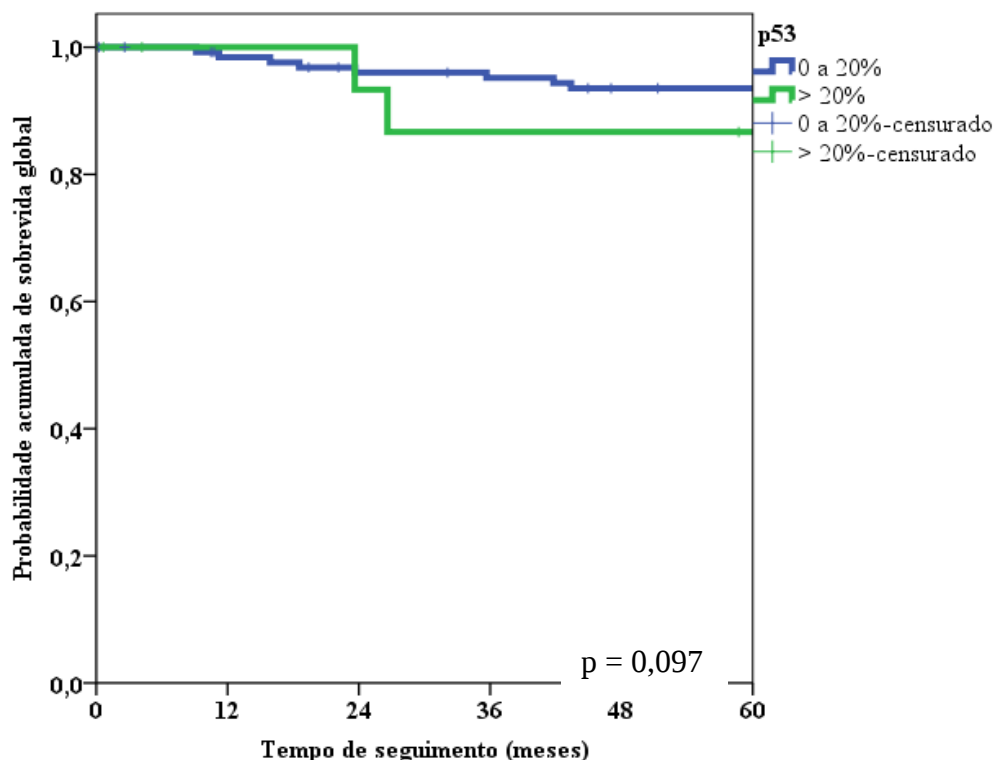


Figura 15 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.

A probabilidade de sobrevida global após 5 anos segundo a expressão de p53 e grau de diferenciação histológica, lateralidade, extensão do tumor, infiltração de coróide e infiltração de nervo óptico também foi calculada.

Para os tumores bem ou moderadamente diferenciados com expressão de p53 até 20% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 92,5% e para aqueles com p53 maior que 30% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 85,7% ($p = 0,106$). Figura 16

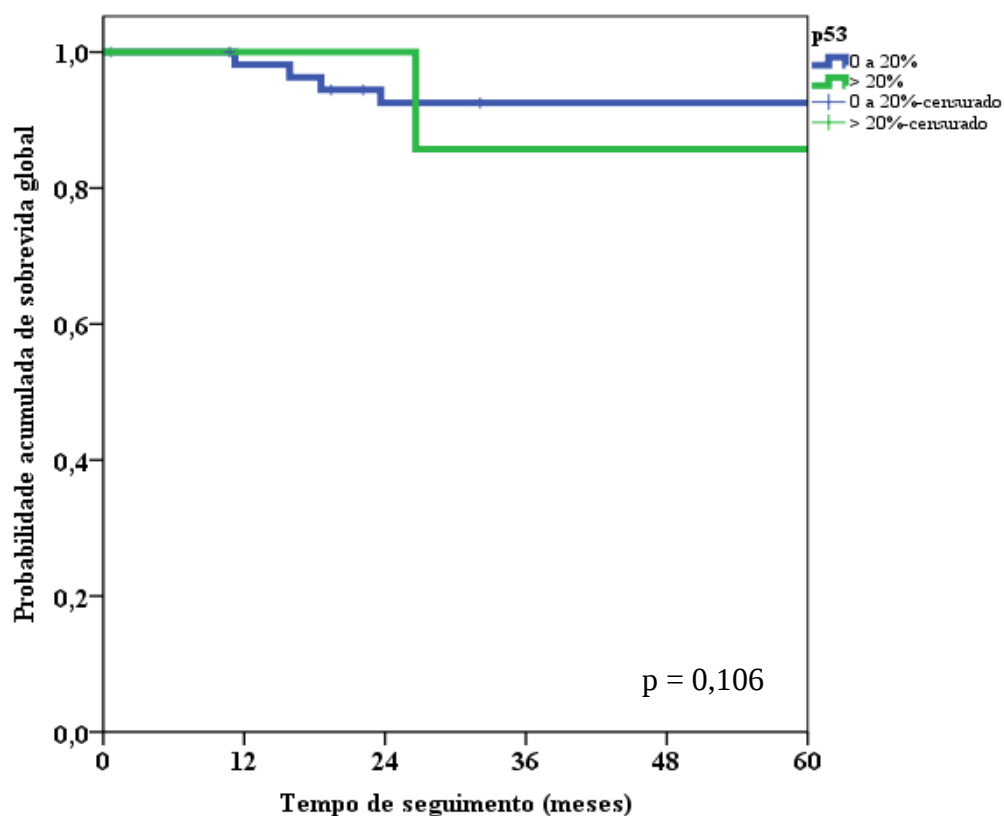


Figura 16 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma bem ou moderadamente diferenciados segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.

Para os tumores pouco diferenciados ou indiferenciados com expressão de p53 até 20% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 93,9% e para aqueles com p53 maior que 30% a sobrevida global após cinco anos foi de 85,7% ($p = 0,520$). Figura 17

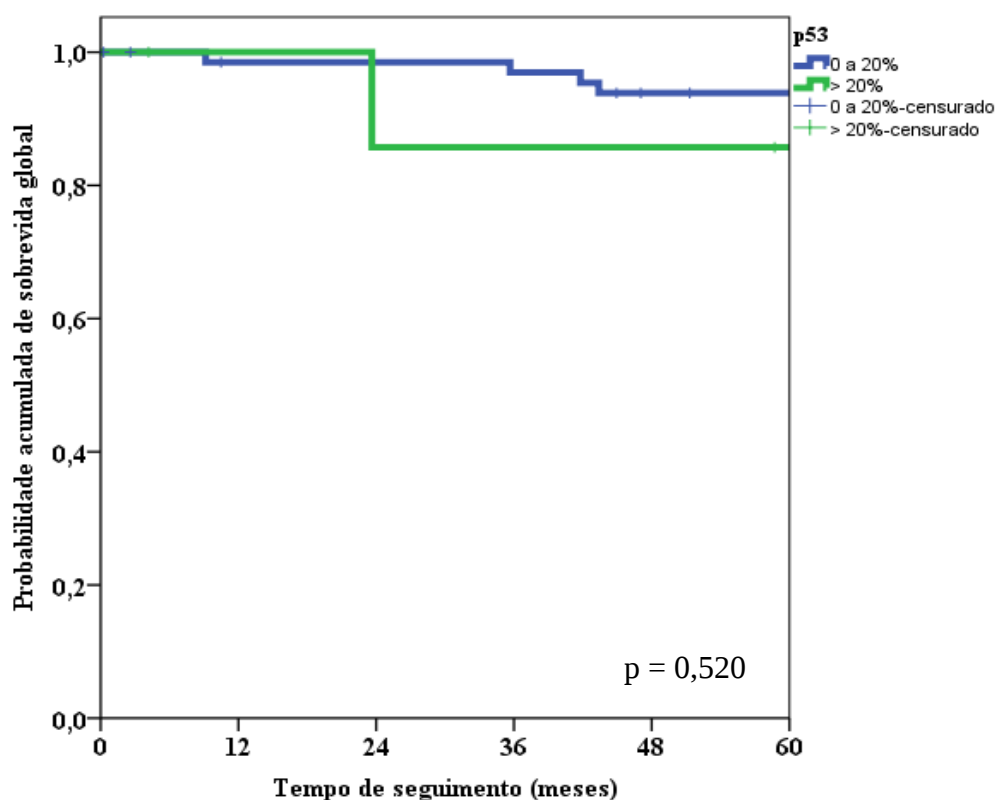


Figura 17 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma pouco diferenciados ou indiferenciados segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os tumores intraoculares os pacientes com expressão de p53 até 20% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 97,3% e os pacientes com expressão maior que 20% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi 85,7% ($p = 0,002$). Figura 18

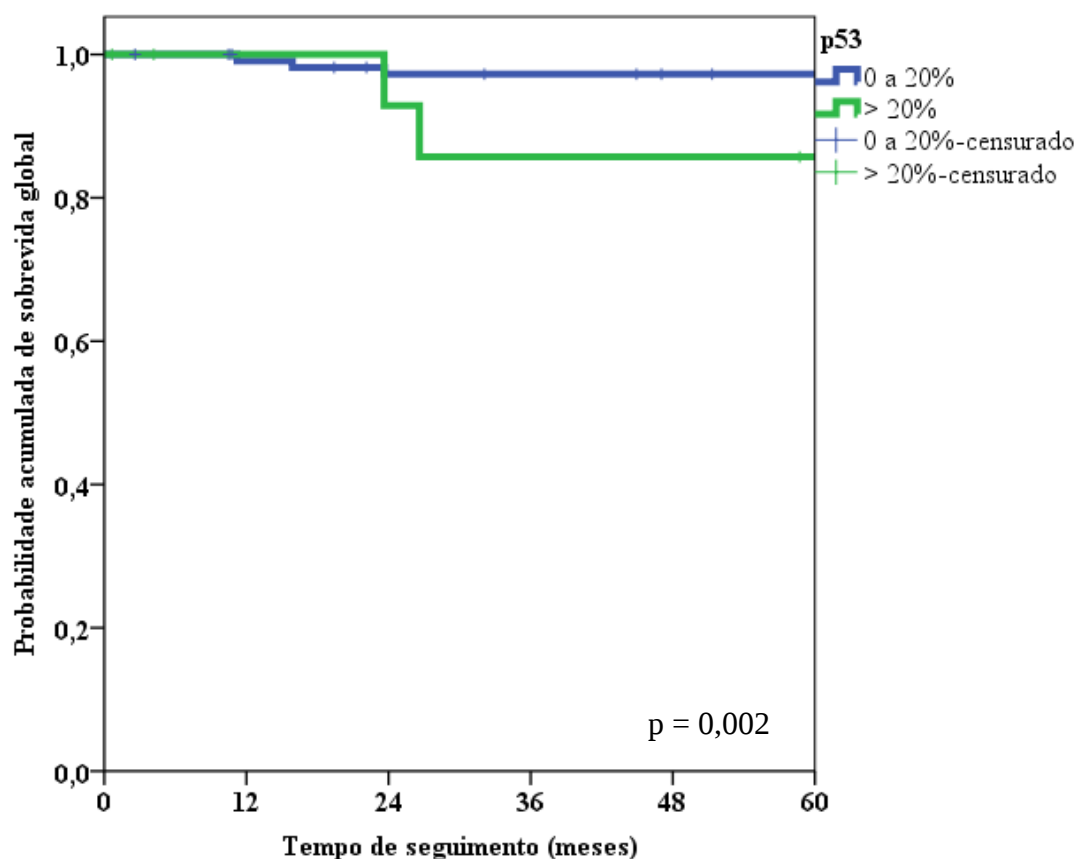


Figura 18 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma intraocular segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os tumores extraoculares os pacientes com expressão de p53 até 20% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 66,7% e os pacientes com expressão maior que 20% a sobrevida global após cinco anos foi 100% ($p = 0,479$). Figura 19

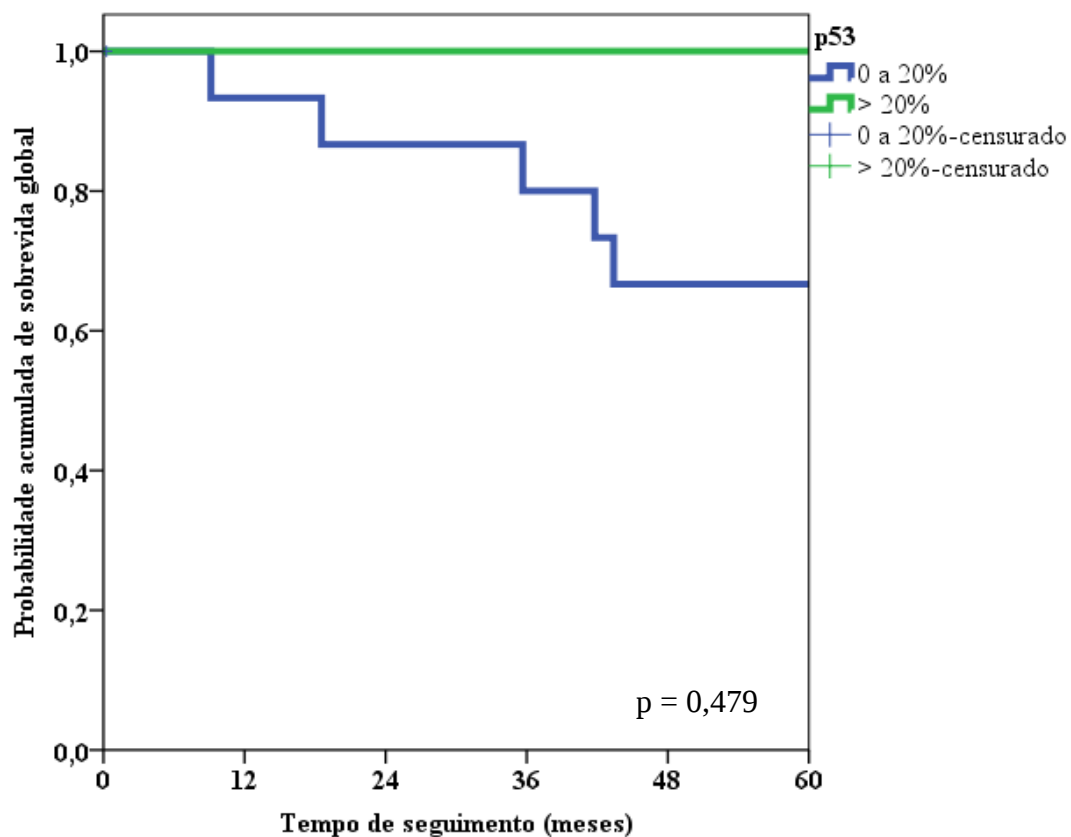


Figura 19 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma extraocular segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os tumores unilaterais os pacientes com expressão de p53 até 20% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 92,8% e os pacientes com expressão maior que 20% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 90,9 % ($p = 0,839$). Figura 20

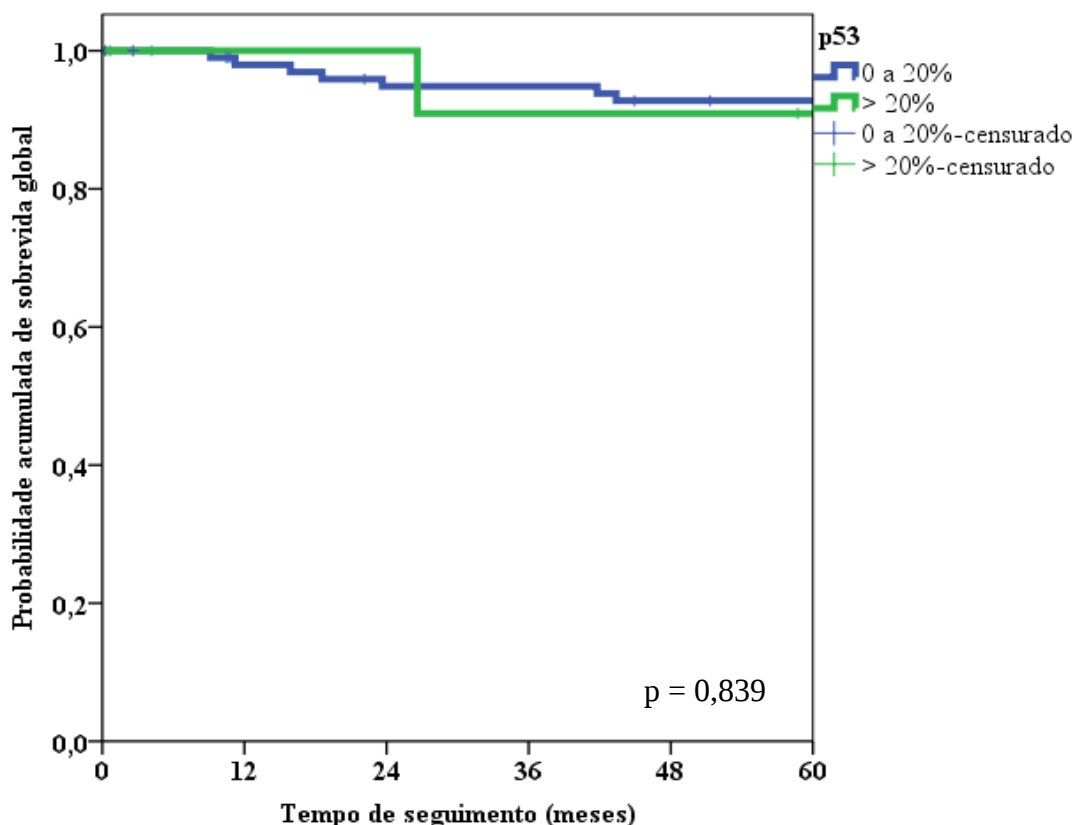


Figura 20 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma unilateral segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os tumores bilaterais os pacientes com expressão de p53 até 20% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 96,2% e os pacientes com expressão maior que 20% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 75% ($p = 0,006$). Figura 21

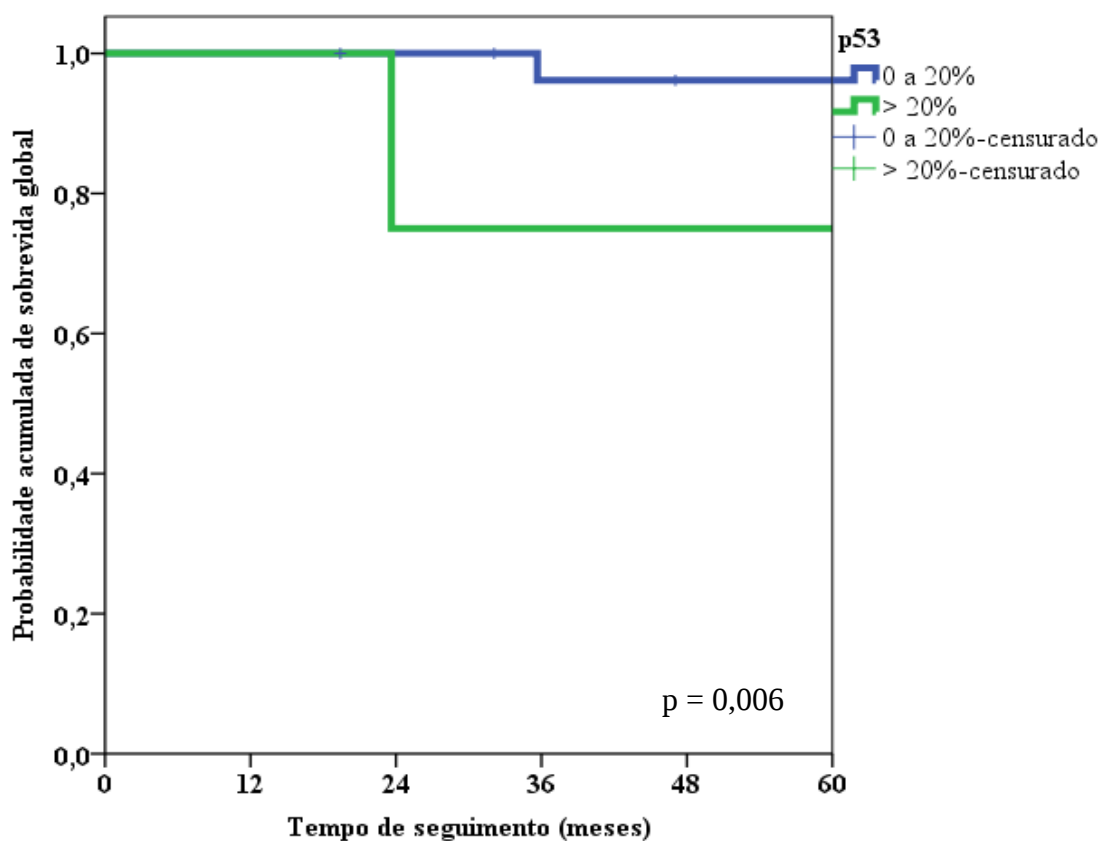


Figura 21 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma bilateral segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os pacientes sem infiltração de coróide com expressão de p53 até 20% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 97,3% e os pacientes com expressão maior que 20% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 81,7% ($p = 0,004$). Figura 22

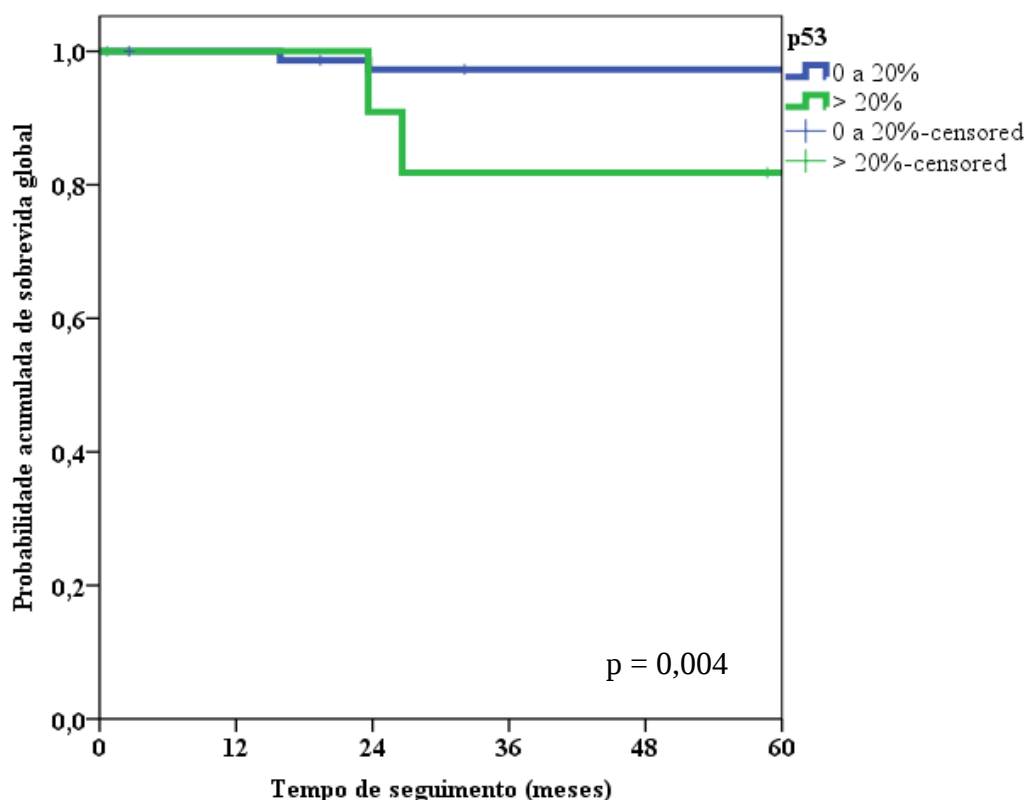


Figura 22 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma sem infiltração de coróide segundo expressão de MDM2, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os pacientes com infiltração de coróide com expressão de p53 até 20% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 87,4% e os pacientes com expressão maior que 20% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 100% ($p = 0,466$). Figura 23

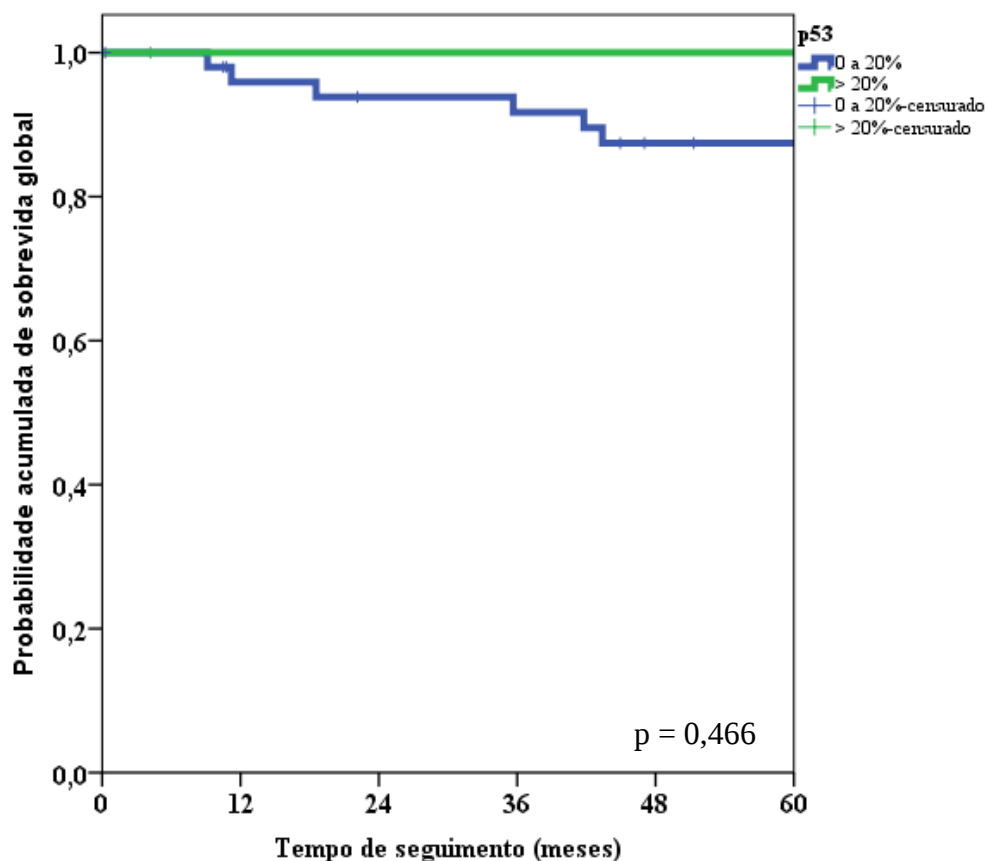


Figura 23 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma com infiltração de coróide segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os pacientes sem infiltração de nervo óptico com expressão de p53 até 20% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 96% e os pacientes com expressão maior que 20% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 100% ($p = 0,297$). Figura 24

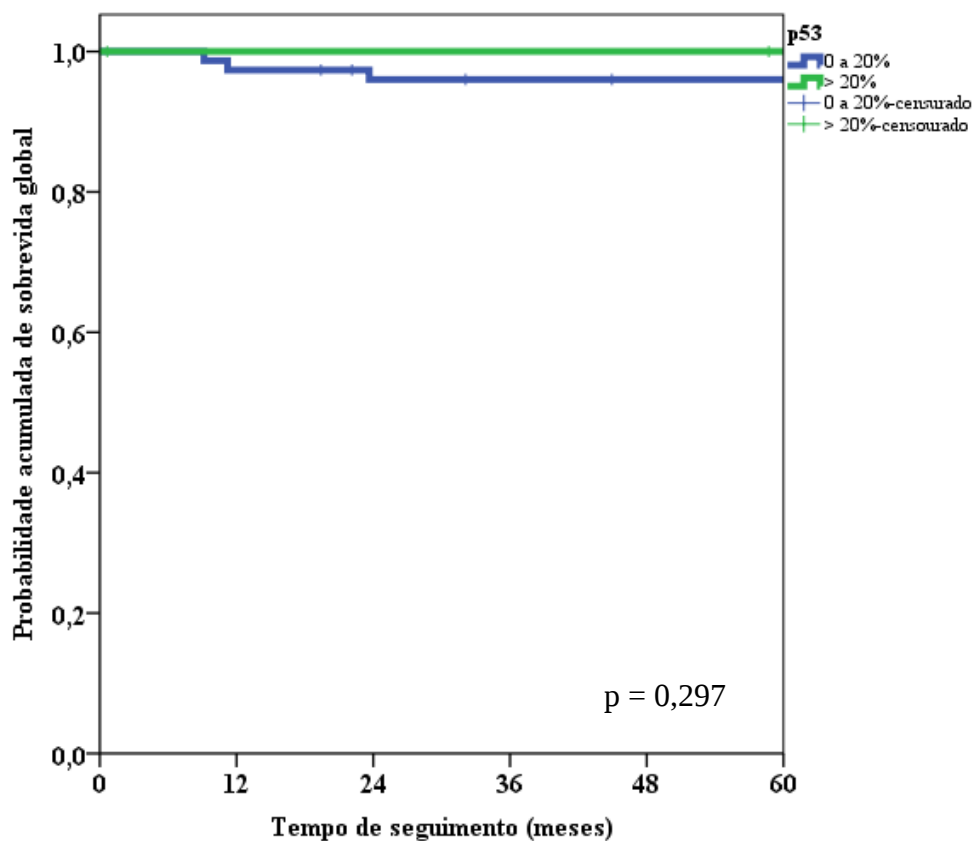


Figura 24 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma sem infiltração de nervo óptico segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os pacientes com infiltração de nervo óptico com expressão de p53 até 20% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 88,6% e os pacientes com expressão maior que 20% a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 71,4 % ($p = 0,277$). Figura 25

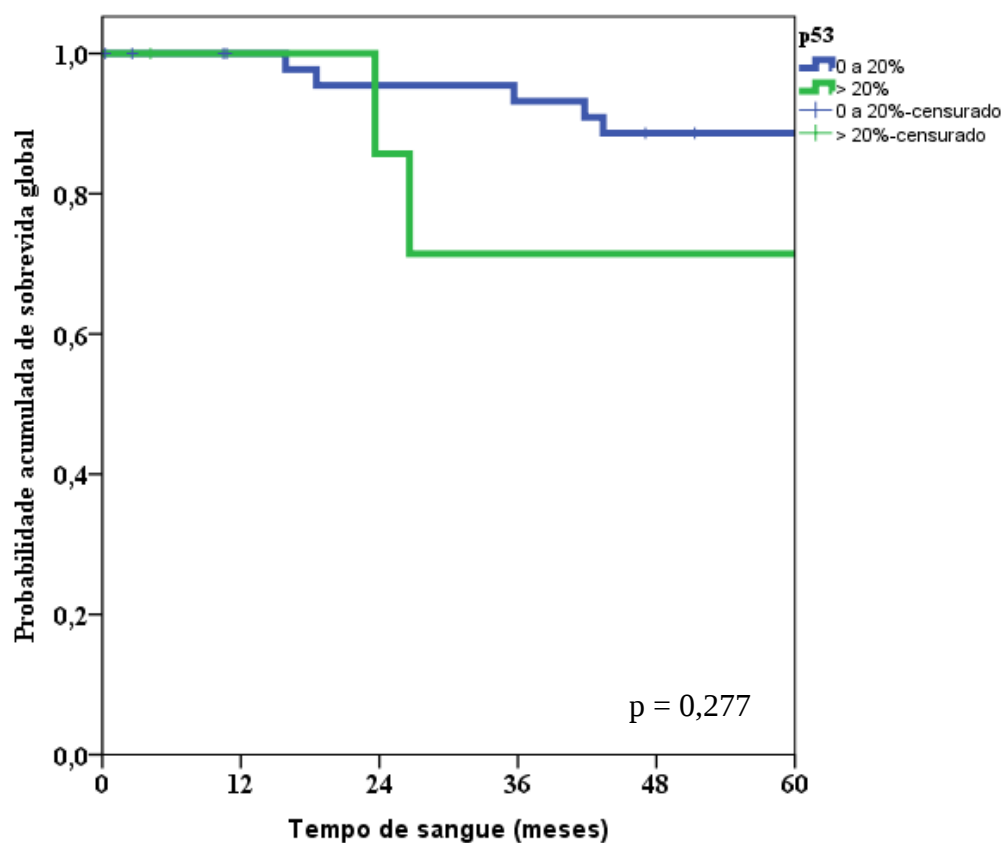


Figura 25 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma com infiltração de nervo óptico segundo expressão de p53, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

5.2 RESULTADOS DA ANÁLISE DO *TISSUE MICRO ARRAY* POR FISH (Hibridização in situ fluorescente)

Em todos os 134 (59,6%) pacientes avaliáveis para *MDM2* não houve amplificação. Em noventa e um pacientes (40,6%) não houve possibilidade de avaliação de resultado.

Foi possível avaliação de *NMYC* em oitenta e sete pacientes (38,7%), sendo que houve amplificação em 7 pacientes (8%).

E não houve nenhum caso possível de leitura de resultado para o *TP53*.

Analizamos os resultados do gene *NMYC* com o grau de diferenciação histológica (bem diferenciado e moderadamente diferenciado; pouco diferenciado e indiferenciado), infiltração de coróide, infiltração de nervo óptico, lateralidade (unilateral; bilateral) e extensão do tumor ao diagnóstico (doença intra ocular; doença extra ocular). Os resultados estão demonstrados nas Tabelas 8 a 12, respectivamente. Houve resultado significativo na análise de amplificação de *NMYC* e infiltração do nervo óptico ($p = 0,044$). Nas demais associações não houve diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 8 - Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a amplificação do gene *NMYC* e grau de diferenciação histológica, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.

Gene	Resultado	Grau de diferenciação histológica (%)		p
		Bem diferenciado e Moderadamente diferenciado	Pouco diferenciado e indiferenciado	
<i>NMYC</i>	Não amplificado	39 (92,9)	38 (90,5)	1,000
	Amplificado	3 (7,1)	4 (9,5)	

Tabela 9 - Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a amplificação do gene *NMYC* e infiltração de coróide, A.C. Camargo Cancer Center 1986 – 2003.

Gene	Resultado	Infiltração de coróide (%)		p
		Não	Sim	
<i>NMYC</i>	Não amplificado	49 (90,7)	29 (93,5)	1,000
	Amplificado	5 (9,3)	2 (6,5)	

Tabela 10 - Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a amplificação do gene *NMYC* e infiltração de nervo óptico, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003.

Gene	Resultado	Infiltração de nervo óptico (%)		p
		Não	Sim	
<i>NMYC</i>	Não amplificado	47 (87)	31 (100)	0,044
	Amplificado	7 (13)	0 (0)	

Tabela 11 - Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a amplificação do gene *NMYC* e lateralidade, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Gene	Resultado	Lateralidade da doença (%)		p
		Unilateral	Bilateral	
<i>NMYC</i>	Não amplificado	62 (91,2)	18 (94,7)	1,000
	Amplificado	6 (8,8)	1 (5,3)	

Tabela 12 - Número e porcentagem de pacientes com retinoblastoma segundo a amplificação do gene *NMYC* e extensão da doença, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Gene	Resultado	Extensão da doença (%)		p
		Intra ocular	Extra ocular	
<i>NMYC</i>	Não amplificado	75 (91,5)	5 (100)	1,000
	Amplificado	7 (8,5)	0 (0)	

A probabilidade de sobrevida global após cinco anos de acordo com os resultados de *NMYC* foi de 85,7% para os pacientes com amplificação e de 96% para os pacientes sem amplificação ($p = 0,252$). Figura 26

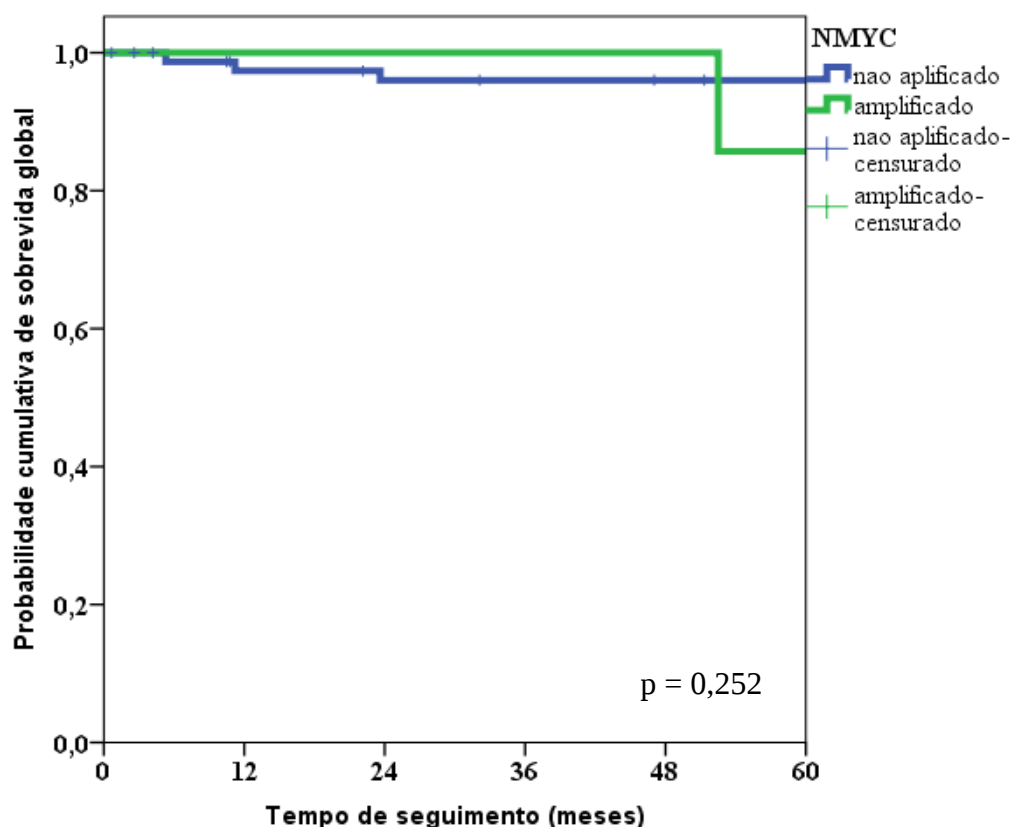


Figura 26 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma segundo amplificação de *NMYC*, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Analizamos também a probabilidade de sobrevida global após 5 anos segundo a amplificação ou não de *NMYC* e grau de diferenciação histológica, lateralidade, extensão do tumor, infiltração de coróide e infiltração de nervo óptico.

Para os tumores bem ou moderadamente diferenciados sem amplificação de *NMYC* a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 97,3% e para aqueles com amplificação de *NMYC* a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 100% ($p = 0,776$). Figura 27

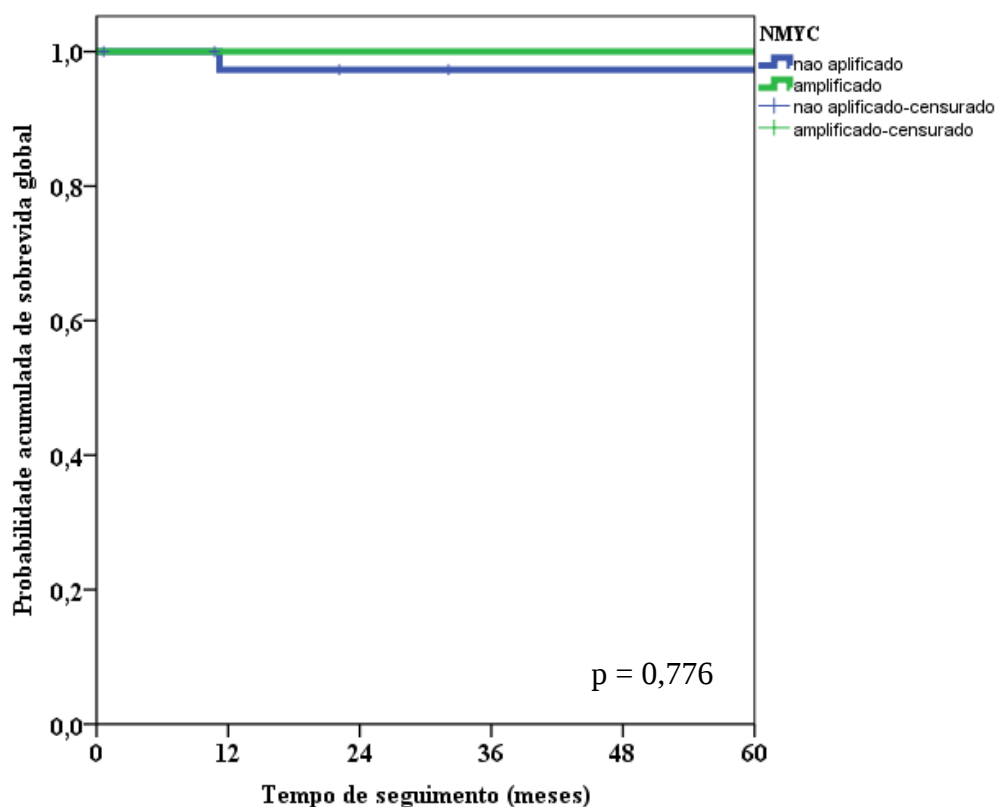


Figura 27 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma bem ou moderadamente diferenciados segundo amplificação de *NMYC*, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os tumores pouco diferenciados e indiferenciados sem amplificação de *NMYC* a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 94,4% e para aqueles com amplificação de *NMYC* a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 75% ($p = 0,203$). Figura 28

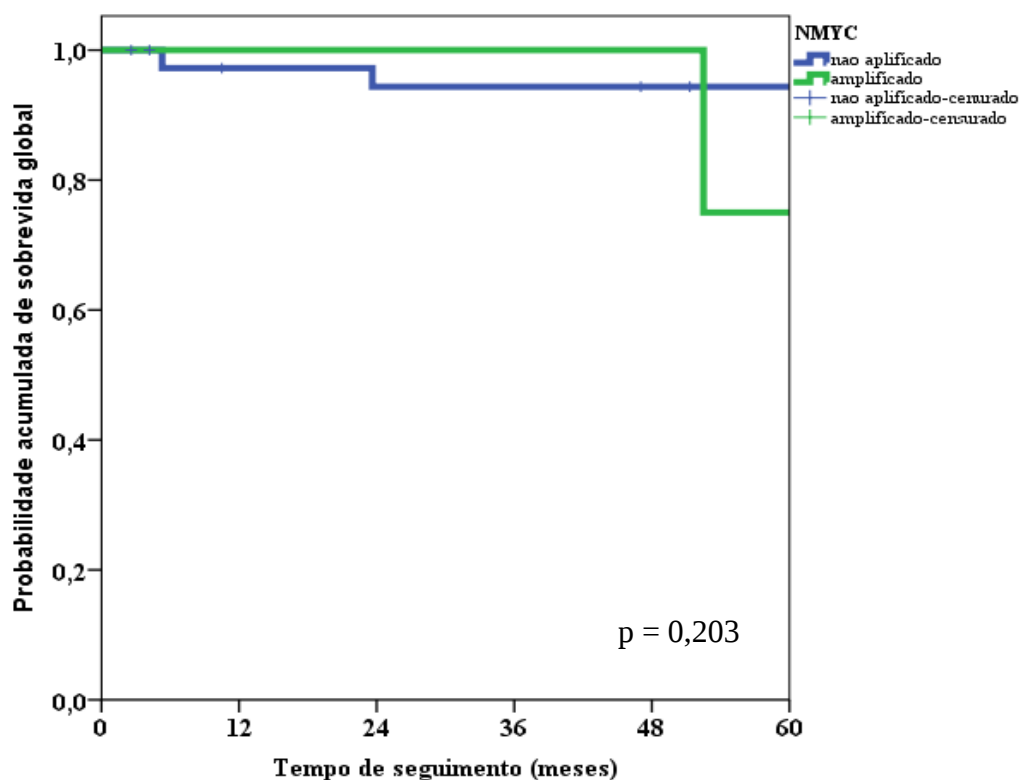


Figura 28 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma pouco diferenciados ou indiferenciados segundo amplificação de *NMYC*, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os tumores intraoculares os pacientes sem amplificação de *NMYC* a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 97,1% e os pacientes com amplificação a sobrevida global após cinco anos foi de 85,7% ($p = 0,156$). Figura 29

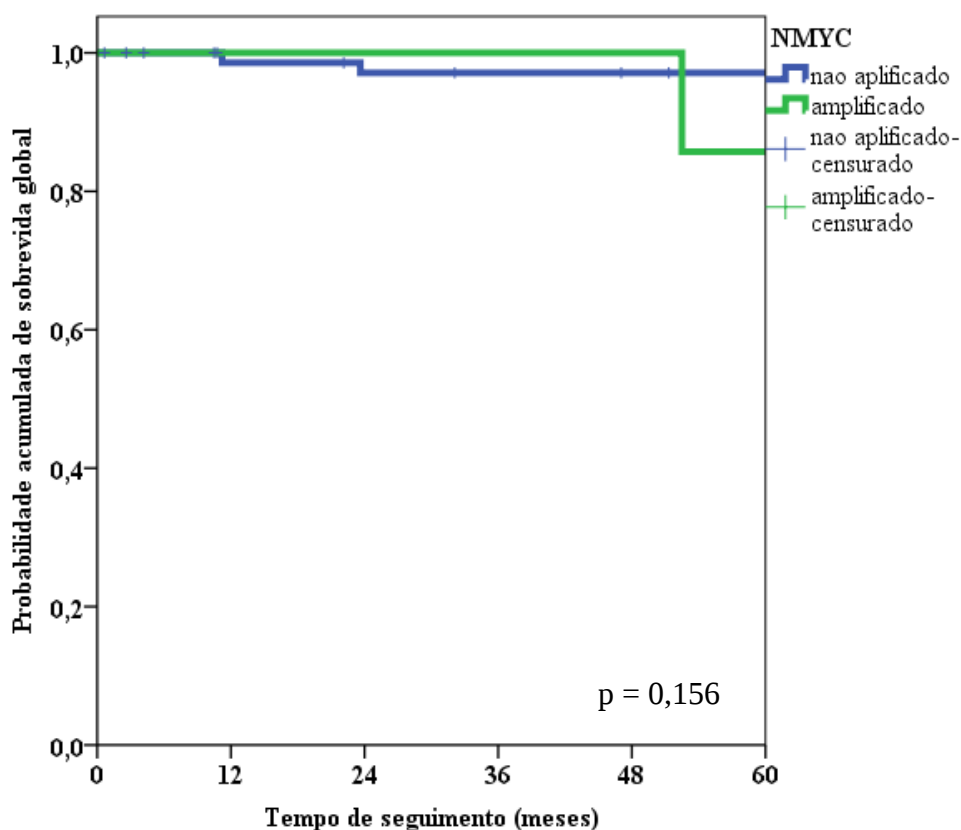


Figura 29 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma intraocular segundo amplificação de *NMYC*, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Não houve amplificação de *NMYC* em pacientes com tumores extraoculares. A probabilidade de sobrevida global após cinco anos para todos os casos não amplificados foi de 80%.

Para os tumores unilaterais os pacientes sem amplificação de *NMYC* tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 96,5% e os pacientes com amplificação tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco anos de 100% ($p = 0,648$). Figura 30

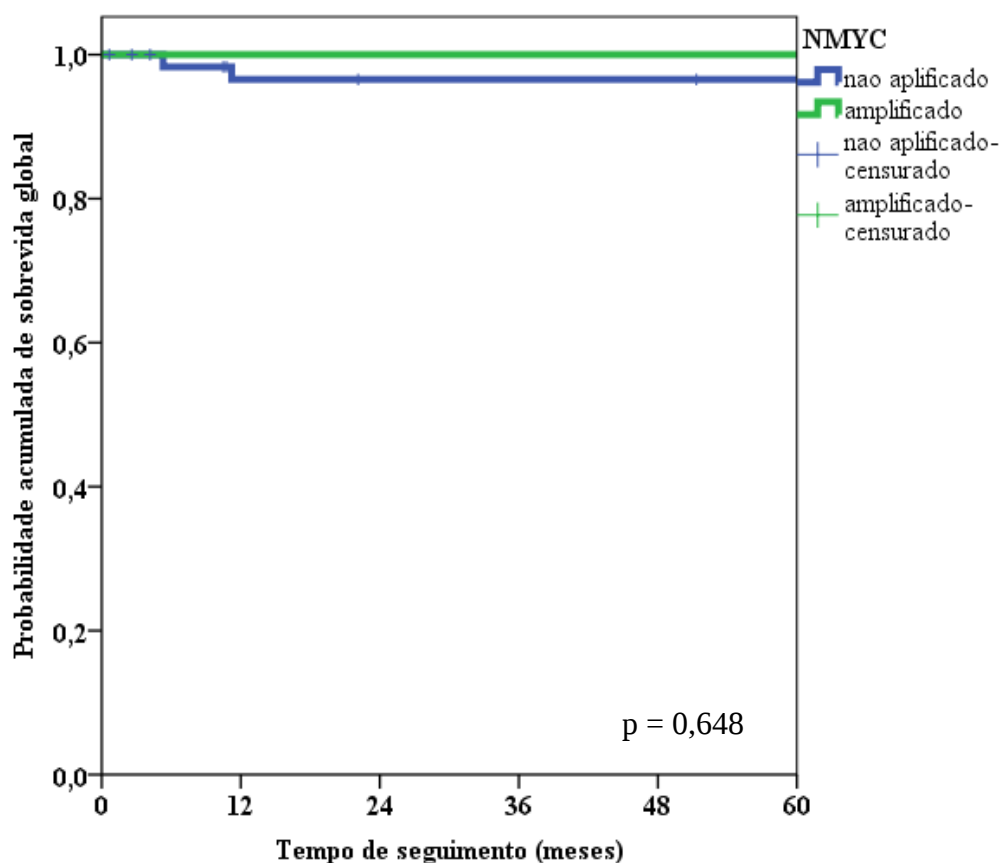


Figura 30 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma unilateral segundo expressão de *NMYC*, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os tumores bilaterais os pacientes sem amplificação de *NMYC* a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 94,4% e os pacientes com amplificação a sobrevida global a cinco anos foi de 0% ($p = 0,007$). Figura 31

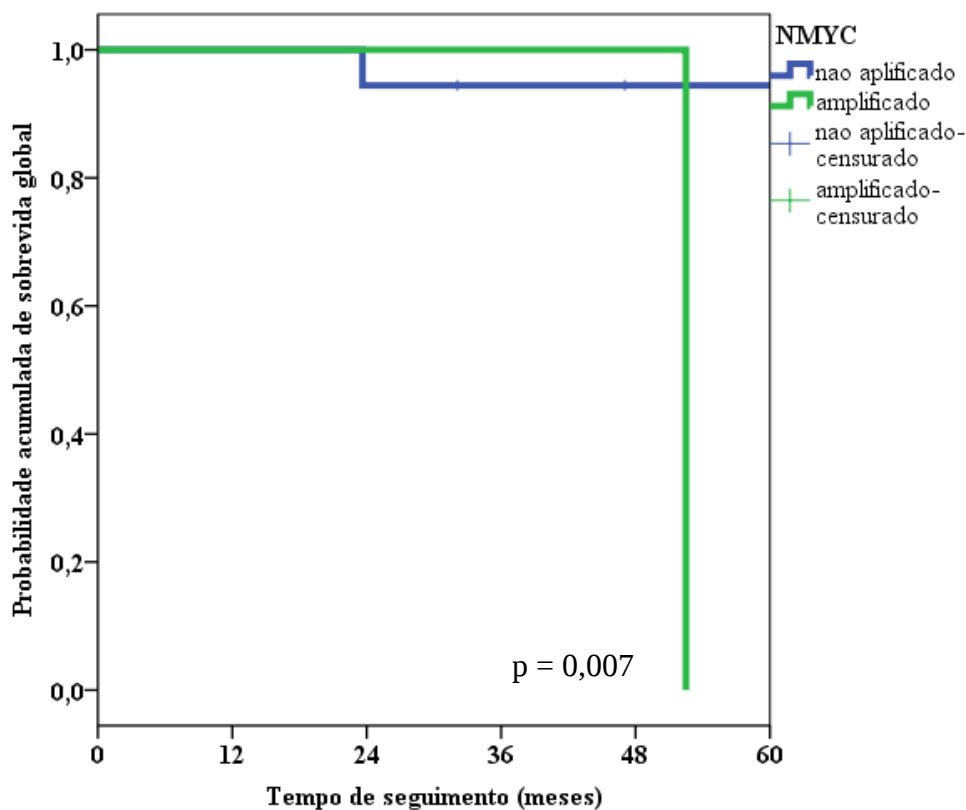


Figura 31 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma bilateral segundo expressão de *NMYC*, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os pacientes sem infiltração de coróide e sem amplificação de *NMYC* a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 97,9% e para os pacientes com amplificação de *NMYC* a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 80% ($p = 0,056$). Figura 32

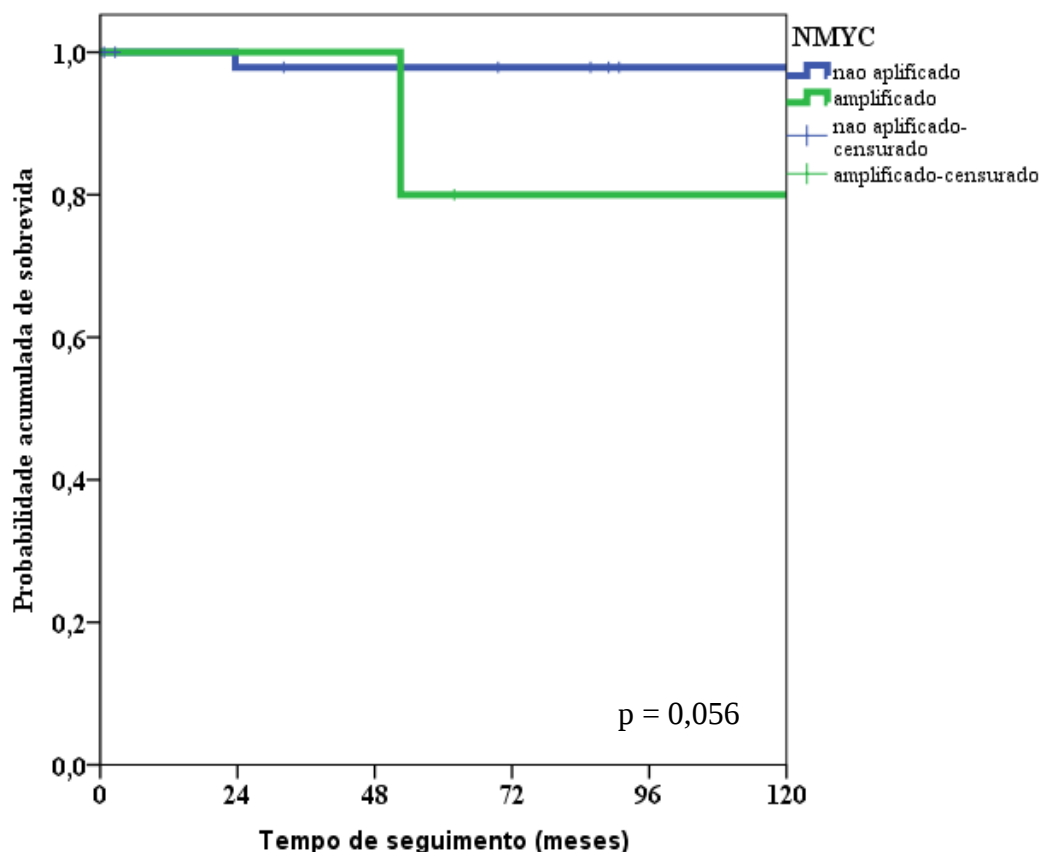


Figura 32 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma sem infiltração de coróide segundo amplificação de *NMYC*, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os pacientes com infiltração de coróide e sem amplificação de *NMYC* a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 96,2% e para os pacientes com amplificação de *NMYC* a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 100% ($p = 0,782$). Figura 33

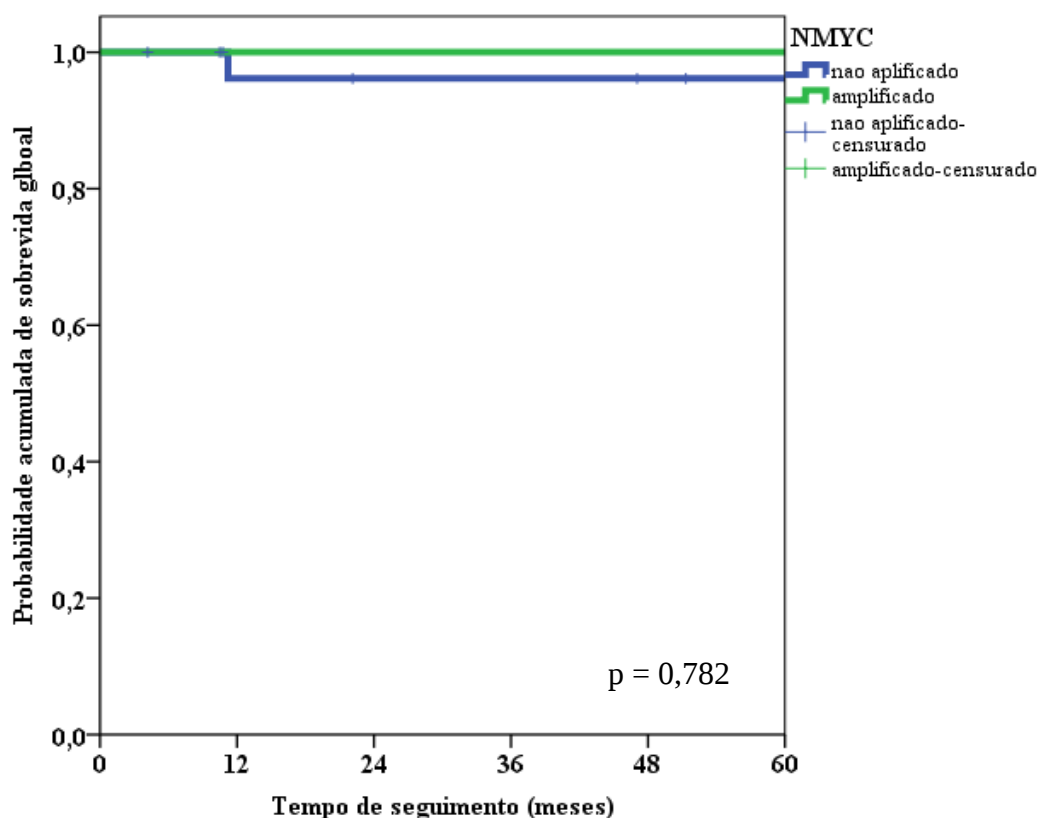


Figura 33 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma sem infiltração de coróide segundo amplificação de *NMYC*, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

Para os pacientes sem infiltração de nervo óptico e sem amplificação de *NMYC* a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 97,8% e para os pacientes com amplificação de *NMYC* a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 85,7% ($p = 0,133$). Figura 34

Não houve casos de amplificação de *NMYC* em pacientes com infiltração de nervo óptico. Para os pacientes sem amplificação de *NMYC* a probabilidade de sobrevida global após cinco anos foi de 92,8%.

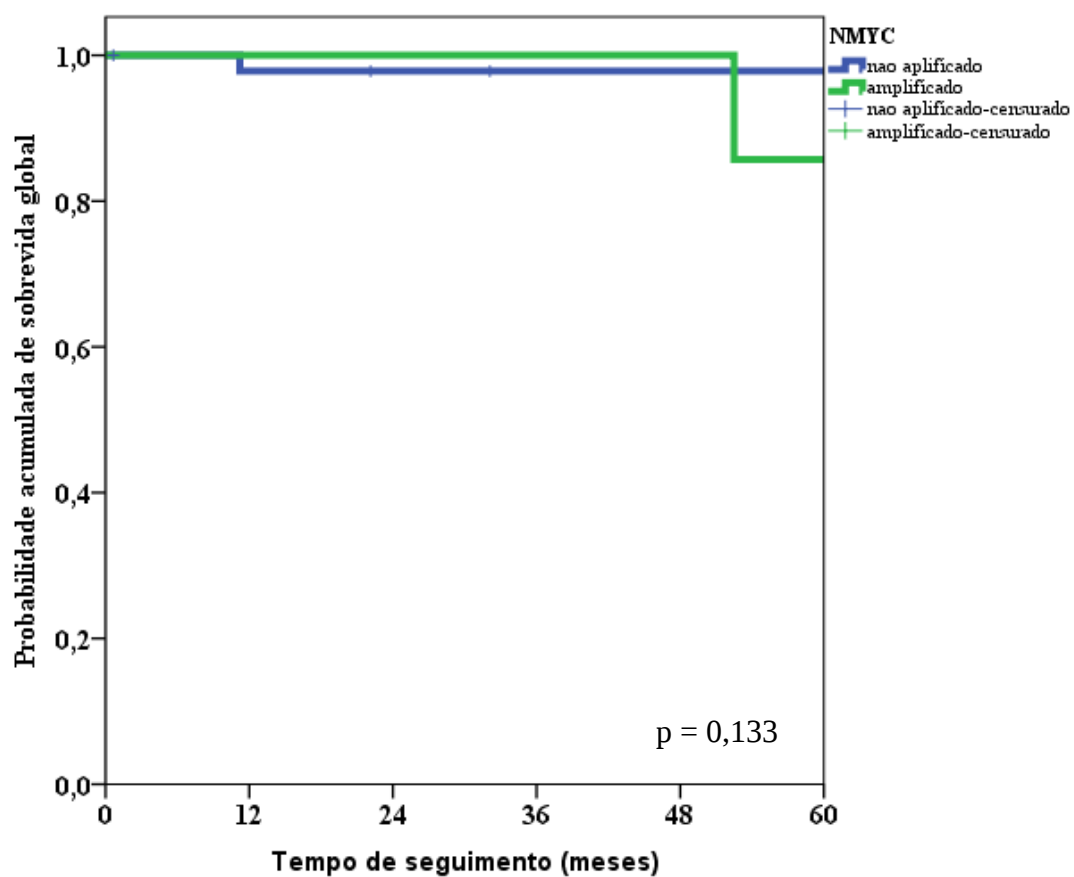


Figura 34 - Probabilidade acumulada de sobrevida global após cinco anos dos pacientes portadores de Retinoblastoma sem infiltração de nervo óptico segundo amplificação de *NMYC*, A.C. Camargo Cancer Center 1986-2003

6 DISCUSSÃO

O Retinoblastoma é o tumor intraocular mais frequente da infância e noventa por cento dos casos são diagnosticados antes do 5 anos de idade (ABRAMSON e SCHEFLER 2004; HONAVAR e SINGH 2005).

Em nossa análise a idade média ao diagnóstico para os tumores esporádicos foi de 30 meses e nos casos germinais de 13 meses, similares aos descritos na maioria dos estudos (ZUCKER et al. 1998).

Não encontramos expressão da proteína pRb em nenhum dos casos avaliados, o que está de acordo com o paradigma estabelecido pela teoria de Knudson (KNUDSON 1971). Atualmente, já sabemos que há casos de retinoblastoma em que a teoria de Knudson não se aplica, pois não há mutação do gene *RB1* e, nestes pacientes, pode-se detectar a proteína pRb funcionalmente ativa (RUSHLOW et al. 2013). Nestes casos, há uma forte associação com a participação do proto oncogene *NMYC* como iniciador do processo de tumorigênese (RUSHLOW et al. 2013).

A expressão protéica de MDM2 e de p53 não estabeleceu associação estatisticamente significativa dessas proteínas (agrupadas em categorias de intensidade de positividade: MDM2 - até 10%, de 11 a 20%, de 21 a 30%, de 31 a 40% e acima de 40%; p53: até 10%, de 11 a 20% e acima de 20%) com as variáveis clínicas e patológicas estudadas (grau de diferenciação tumoral, extensão da doença, lateralidade, infiltração de coróide e infiltração de nervo óptico).

Estudo chinês avaliando 17 casos no período de janeiro de 2009 a julho de 2011 concluiu que em 4 pacientes houve expressão protéica de p53 e associação estatisticamente significativa com invasão de coróide fator de alto risco para recidiva (SEEMA et al. 2014). Yang et al descreveu 51,6% de positividade de p53 em 31 pacientes com retinoblastoma e estava significativamente associada ao grau de diferenciação tumoral com $p < 0,05$ (YANG et al. 1999).

Quanto à forma de apresentação clínica, com relação à lateralidade, para todo o grupo de 469 pacientes, encontramos 282 casos unilaterais (60,9%) e 186 casos bilaterais (39,7%), dados também concordantes com a literatura (ABRAMSON e SCHEFLER 2004; HONAVAR e SINGH 2005).

Considerando-se os 225 casos que foram incluídos nas análises, tivemos 171 casos (76%) de tumores unilaterais e 36 casos (16%) de tumores bilaterais.

Na análise da probabilidade de sobrevida global após 5 anos considerando-se a positividade da expressão protéica de p53, os pacientes com tumores bilaterais e positividade de expressão de p53 até 20% tiveram SG 5a de 96,2%, enquanto aqueles com positividade acima de 20% tiveram SG 5a de 75% ($p = 0,006$).

Quanto à extensão, o retinoblastoma pode ser classificado em intraocular ou extraocular. O estadiamento utilizado para os tumores intraoculares foi o estadiamento de Reese-Ellsworth, baseado na chance de resposta do tumor à radioterapia. Atualmente utiliza-se o estadiamento de

Murphree baseado na chance de resposta do tumor à quimioterapia (KISS et al. 2008).

Os tumores extraoculares foram classificados neste estudo conforme os critérios do *Children Cancer Group* (CCG). Atualmente, o estadiamento internacional é universalmente utilizado (CHANTADA et al. 2006). No total no presente estudo tivemos 84% de tumores intraoculares (189 casos) e 16% de tumores extraoculares (36 casos).

Encontramos diferença significativa ($p = 0,037$) na probabilidade de sobrevida global após cinco anos para os pacientes com expressão de MDM2 até 30% (SG 5a = 98,6%) comparados com os pacientes com expressão de MDM2 maior que 30% (SG 5a = 94,4%) nos tumores intraoculares. Na análise de sobrevida global após cinco anos quando avaliamos a expressão protéica de p53 nos pacientes com tumor intraocular observamos diferença significativa: paciente com até 20% de positividade tiveram SG 5a de 97,3% e aqueles com positividade maior que 20% tiveram SG 5a de 85,7% ($p = 0,002$).

Do ponto de vista anatomopatológico classifica-se o grau de diferenciação do retinoblastoma em: bem diferenciado, moderadamente diferenciado, pouco diferenciado e indiferenciado. Para as análises da associação com genes e proteínas estudados agrupamos os tumores em dois grupos: um, agrupando os tumores bem diferenciados e moderadamente diferenciados; e, outro: agrupando os tumores pouco diferenciados e os indiferenciados. Tumores poucos diferenciados estão associados com mais de um fator de pior prognóstico, maior índice de

necrose e idade maior ao diagnóstico e tumores bem diferenciados associam-se com idade menor ao diagnóstico (KASHYAP et al. 2012). Para classificação do grau de diferenciação utiliza-se como critério a quantidade de rosetas de Flexner-Wintersteiner (CHÉVEZ-BARRIOS et al. 2010; KASHYAP et al. 2012).

Quando avaliamos as curvas de probabilidade de sobrevida global após 5 anos no grupo de pacientes com tumores bem ou moderadamente diferenciados e expressão protéica MDM2 menor que 30% a SG 5a foi de 97,5%, enquanto pacientes com expressão protéica maior que 30% a SG 5a foi de 89,5% ($p = 0,015$).

Infiltração de coróide, infiltração de nervo óptico pós lâmina cribosa, comprometimento de margem de secção do nervo óptico e extensão extra esclera são fatores prognósticos de metástase à distância e recaída ou extensão locorregional da doença (KOPELMAN et al. 1987; TOSI et al. 1989; CHÉVEZ-BARRIOS et al. 2007; CHANTADA et al. 2009).

Infiltração de coróide e nervo óptico pós laminar são considerados critérios para indicação de quimioterapia adjuvante para os pacientes submetidos à enucleação primária ou nos casos em que houve falha de salvamento do globo ocular a despeito do uso de todas as modalidades de tratamento (CHANTADA et al. 2007b; CHÉVEZ-BARRIOS et al. 2007; CHANTADA et al. 2009; AERTS et al. 2013).

Para uniformização dos critérios de anatomia patológica para definição de infiltração focal ou maciça da coróide e de infiltração do nervo óptico um grupo de especialistas reuniu-se para estabelecer as regras

universais de avaliação e definição desses importantes fatores prognósticos (SASTRE et al. 2009).

Pacientes sem infiltração de nervo óptico com expressão de MDM2 acima de 30% tiveram probabilidade de sobrevida global após cinco de 93,5%, enquanto pacientes sem infiltração de nervo óptico e com expressão protéica de MDM2 menor que 30% tiveram sobrevida global após 5 anos de 100% ($p = 0,02$). Na análise da probabilidade de sobrevida global após cinco anos considerando os pacientes sem infiltração de coróide e com positividade de expressão protéica de p53 até 20% obtivemos SG 5a de 97,3% e positividade de expressão protéica de p53 acima de 20%, SG 5a de 81,7% ($p = 0,004$).

Esses dados nos faz levantar uma questão clínica relevante: deveríamos intensificar ou indicar quimioterapia adjuvante para pacientes sem infiltração de nervo óptico e sem infiltração de coróide com expressão protéica de MDM2 acima de 30% e de p53 acima de 20% respectivamente?

Nos protocolos atuais, paciente sem infiltração pós laminar ou sem infiltração de coróide não tem indicação de quimioterapia adjuvante tanto para aquele submetido à enucleação primária quanto para o paciente que recebeu quimioterapia neoadjuvante na tentativa de preservação ocular.

Não encontramos na literatura trabalhos que tenha feito análise na probabilidade de sobrevida global após cinco anos com a expressão protéica de MDM2 e p53.

Identificamos a amplificação de *NMYC* em 7 casos dos oitenta e sete casos avaliáveis. Em nenhum dos casos com amplificação de *NMYC* houve infiltração de nervo óptico ($p=0,044$).

Com as demais variáveis: grau de diferenciação histológica, lateralidade, extensão de doença e infiltração de coróide não observamos associação estatística significativa.

Na análise da probabilidade de sobrevida global após cinco anos observamos nos casos bilaterais que a presença de amplificação de *NMYC* teve impacto na sobrevida (sem amplificação: SG 5a 94,4%; com amplificação: SG 5a 0%; $p = 0,007$). Havia 19 pacientes com tumor bilateral e apenas um único paciente dentre estes tinha amplificação de *NMYC* e foi a óbito.

A amplificação de *NMYC* é um fator prognóstico em neuroblastoma, tumor derivado de neuroectoderma primitivo, de onde também se origina as células da retina, que dão provável origem ao retinoblastoma.

Um estudo envolvendo 1.068 pacientes de vários países (Canadá, Alemanha, França, Nova Zelândia, Holanda) com retinoblastoma unilateral e sem história familiar utilizando técnicas para análise do número de cópias genômicas identificou 30 pacientes sem mutação do gene *RB1*, quinze destes apresentavam amplificação de *NMYC* e com características histológicas (tumores indiferenciados) e clínicas (tumores maiores, invasivos) relacionadas com maior agressividade. (RUSHLOW et al. 2013). Neste mesmo estudo apenas um paciente com amplificação de *NMYC*

apresentou infiltração de nervo óptico, considerado fator prognóstico na maioria das séries mundiais (CHANTADA et al. 2007a).

A partir dos resultados de RUSHLOW et al. (2013) algumas perguntas foram abertas: a supressão de *NMYC* poderia ser um tratamento efetivo para retinoblastoma? O papel de *NMYC* estaria restrito apenas aos casos onde tem papel como iniciador da tumorigênese ou também teria importância nos casos clássicos com mutação em ambos os alelos de *RB1*? A ativação de *NMYC* per si substitui a deleção de *RB1* para manter o fenótipo neoplásico ou vice-versa? (FELSHER 2013).

LAURIE et al. (2006). identificou 10% de amplificação de *MDM2* e que o gene *TP53* estava intacto em 100% dos casos em retinoblastoma. Nossas análises por FISH não encontraram amplificação de *MDM2* em nenhum dos 134 casos avaliáveis e infelizmente não tivemos sucesso na realização das reações de FISH para *TP53*.

7 CONCLUSÃO

Este estudo conseguiu determinar a expressão protéica de MDM2, p53, rRb e status dos genes *MDM2* e *NMYC* numa coorte de pacientes do A. C. Camargo Cancer Center e sua relação com variáveis patológicas e clínicas do retinoblastoma.

Há, portanto, a possibilidade de confirmação destes resultados em estudos prospectivos e de utilizá-los, posteriormente, na elaboração de protocolos terapêuticos identificando grupos de risco até o momento não reconhecidos.

A confirmação desses resultados em outras séries é de importância fundamental para validação de nossas observações.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Aerts I, Sastre-Garau X, Savignoni A, et al. Results of a multicenter prospective study on the postoperative treatment of unilateral retinoblastoma after primary enucleation. **J Clin Oncol** 2013; 31:1458-63.

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

Brennan RC, Federico S, Bradley C, et al. Targeting the p53 pathway in retinoblastoma with subconjunctival Nutlin-3a. **Cancer Res** 2011; 71:4205-13.

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, Fandiño AC, et al. Outcome of patients with retinoblastoma and postlaminar optic nerve invasion. **Ophthalmology** 2007a; 114:2083-9.

Chantada GL, Dunkel IJ, Antoneli CB, et al. Risk factors for extraocular relapse following enucleation after failure of chemoreduction in retinoblastoma. **Pediatr Blood Cancer** 2007b; 49:256-60.

Chantada GL, Gitter MR, Fandiño AC, et al. Treatment results in patients with retinoblastoma and invasion to the cut end of the optic nerve. **Pediatr Blood Cancer** 2009; 52:218-22.

Chévez-Barrios P, Eagle RC, Marbach P. Histological features and risks for metastatic spread of retinoblastoma. In: Singh AD, Damato B, Pe'er J, Murphree AL, Perry JD, editors. **Clinical ocular oncology**. London: Elsevier Saunders; 2007. p.468-76.

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.

Dimaras H, Gallie BL. Genetics of retinoblastoma and genetic counseling. In: Rodriguez-Galindo C, Wilson MW, editors. **Retinoblastoma**. New York: Springer; 2010. p.41-54.

Du W, Wu J, Walsh EM, et al. Nutlin-3 affects expression and function of retinoblastoma protein: role of retinoblastoma protein in cellular response to nutlin-3. **J Biol Chem** 2009; 284:26315-21.

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

Felsher DW. Role of MYCN in retinoblastoma. **Lancet Oncol** 2013; 14:270-1.

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.

Gallie BL, Campbell C, Devlin H, Duckett A, Squire JA. Developmental basis of retinal-specific induction of cancer by RB mutation. **Cancer Res** 1999; 59:1731s-1735s.

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

Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. **Science** 1988; 241:353-7.

Honavar SG, Singh AD. Management of advanced retinoblastoma. **Ophthalmol Clin North Am** 2005; 18:65-73.

Kashyap S, Sethi S, Meel R, et al. A histopathologic analysis of eyes primarily enucleated for advanced intraocular retinoblastoma from a developing country. **Arch Pathol Lab Med** 2012; 136:190-3.

Kiss S, Leiderman YI, Mukai S. Diagnosis, classification, and treatment of retinoblastoma. **Int Ophthalmol Clin** 2008; 48:135-47.

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

Kopelman JE, McLean IW, Rosenberg SH. Multivariate analysis of risk factors for metastasis in retinoblastoma treated by enucleation. **Ophthalmology** 1987; 94:371-7.

Lastowska M, Cullinane C, Variend S, et al. Comprehensive genetic and histopathologic study reveals three types of neuroblastoma tumors. **J Clin Oncol** 2001; 19:3080-90.

Laurie NA, Shih CS, Dyer MA. Targeting MDM2 and MDMX in retinoblastoma. **Curr Cancer Drug Targets** 2007; 7:689-95.

Lillington DM, Goff LK, Kingston JE, et al. High level amplification of N-MYC is not associated with adverse histology or outcome in primary retinoblastoma tumours. **Br J Cancer** 2002; 87:779-82.

Rushlow DE, Mol BM, Kennett JY, et al. Characterisation of retinoblastoma without RB1 mutations: genomic, gene expression, and clinical studies. **Lancet Oncol** 2013; 14:327-34.

Sastre X, Chantada GL, Doz F, et al. Proceedings of the consensus meetings from the International Retinoblastoma Staging Working Group on the pathology guidelines for the examination of enucleated eyes and evaluation of prognostic risk factors in retinoblastoma. **Arch Pathol Lab Med** 2009; 133:1199-202.

Seema R, Parul S, Nita K; Kamlesh. High-risk histomorphological features in retinoblastoma and their association with p53 expression: An Indian experience. **Indian J Ophthalmol** 2014; 62):1069-71.

Tosi P, Cintorino M, Toti P et al. Histopathological evaluation for the prognosis of retinoblastoma. **Ophthalmic Paediatr Genet** 1989; 10:173-7.

Tso MO. Clues to the cells of origin in retinoblastoma. **Int Ophthalmol Clin** 1980; 20:191-210.

Yang X, Zhang Z, Zeng Q. A study of expression of p53, c-myc and PCNA in retinoblastoma. **Zhonghua Yan Ke Za Zhi** 1999; 35:252-4 14.

Zucker JM, Desjardins L, Doz F. Retinoblastoma. **Eur J Cancer** 1998; 34:1045-8; discussion 1048-9.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 10 de dezembro de 2012.

A
Dra. Celia Beatriz Gianotti Antonelli.

Aluno: Neviqolino Pereira de Carvalho Filho (Mestrado).

Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1676/12

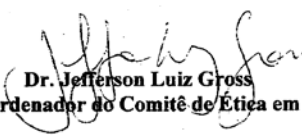
“Análise do status dos genes N-MYC, MDM2, p53 e RB em pacientes portadores de Retinoblastoma submetidos à enucleação”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 23/10/2012, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 26/06/2012, aprovaram a realização do projeto do estudo em referência (datado de 08 de março de 2012) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Pediátrica do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Oncologia Pediátrica;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2 - Ficha de registro de dados

Nome:
Rgh:
Data de admissão: dd.mm.aaaa
Número do exame anatomopatológico:
Sexo: (1) masculino (2) feminino
Cor : (1) branca (2) negra (3) amarela (4) outra
Data de nascimento: dd.mm.aaaa
Idade ao diagnostico: (meses)
Tempo de encaminhamento:
Historia familiar: (0) não (1) sim
Lateralidade: (1) unilateral (2) bilateral
Localização: (1) intra ocular (2) extra ocular
Primeiro sinal ou sintoma:
(1) brilho (2) estrabismo (3) vermelhidão
(4) aumento do globo (5) diminuição de visão
(6) fundo de olho (7) outros (9) ignorado
Localização: (1) intra ocular (2) extra ocular
Estadiamento (RE-Resse Ellsworth):
(1) I (2) II (3) III (4) IV (5) V (6) não se aplica (9) ignorado
Margem do coto: (1) livre (2) comprometida (9) ignorado
Infiltração de nervo óptico:
(0) não (1) pré laminar (2) pos laminar (9) ignorado
Infiltração de coroide:
(0) não (1) maciça (2) focal (6) não se aplica (9) ignorado
Diferenciação histológica:
(1) bem diferenciado (2) pouco diferenciado (3) indiferenciado
(4) moderadamente difernciado (9) ignorado

Quimioterapia: (0) não (1) sim

Cirurgia: (1) sim, olho direito (2) sim, olho esquerdo (3) ambos

Data da cirurgia: dd.mm.aaaa

MDM2 (IHQ):

(1) Até 10% (2) 11-20% (3) 21-30% (4) 31-40%

(5) 41-50(%) (6) 51-60% (7) 61-70% (8) 71-80%

(9) 81-90% (10) 91-100% (999) não avaliável

p53 (IHQ):

(1) Até 10% (2) 11-20% (3) 21-30% (4) 31-40%

(5) 41-50(%) (6) 51-60% (7) 61-70% (8) 71-80%

(9) 81-90% (10) 91-100% (999) não avaliável

RB (IHQ):

(1) Até 10% (2) 11-20% (3) 21-30% (4) 31-40%

(5) 41-50(%) (6) 51-60% (7) 61-70% (8) 71-80%

(9) 81-90% (10) 91-100% (999) não avaliável

NMYC (FISH)

(0) não amplificado (1) amplificado (999) não avaliável

MDM2 (FISH)

(0) não amplificado (1) amplificado (999) não avaliável

p53 (FISH)

(0) não amplificado (1) amplificado (999) não avaliável

Data da ultima informação: mm.dd.aaaa

Status:

(1) vivo sem doença (2) vivo c/ doença (3) morte pelo câncer

(4) morte por outras causas (5) perda de seguimento

Anexo 3 - Fotomicrografias das reações de imunoistoquímica

Imagem 1. Fotomicrografia de reação imunoistoquímica para MDM2, com DAB como cromógeno para MDM2 (coloração marrom), contracorada por hematoxilina, exibindo positividade nuclear em até 10% das células neoplásicas (IHQ MDM2, x400).

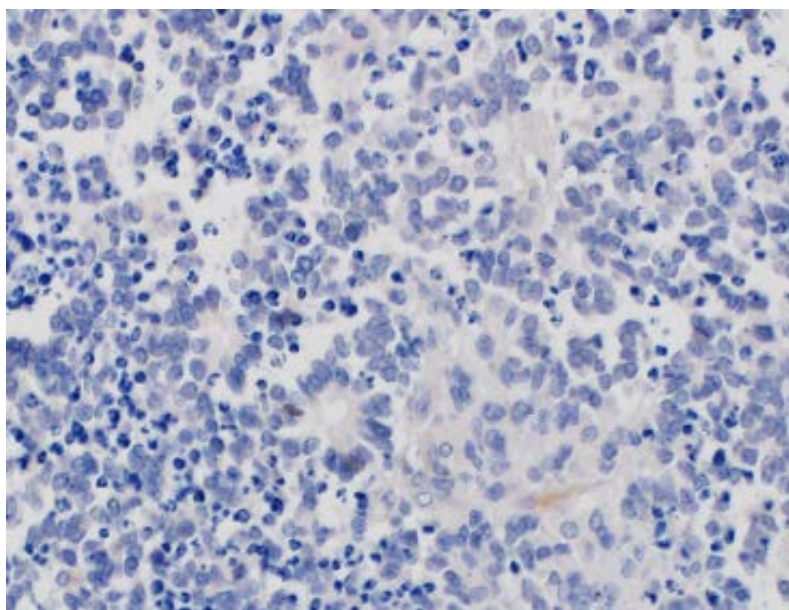


Imagem 2. Fotomicrografia de reação imunoistoquímica para MDM2, com DAB como cromógeno para MDM2 (coloração marrom), contracorada por hematoxilina, exibindo positividade nuclear de 11 a 20% das células neoplásicas (IHQ MDM2, x400).

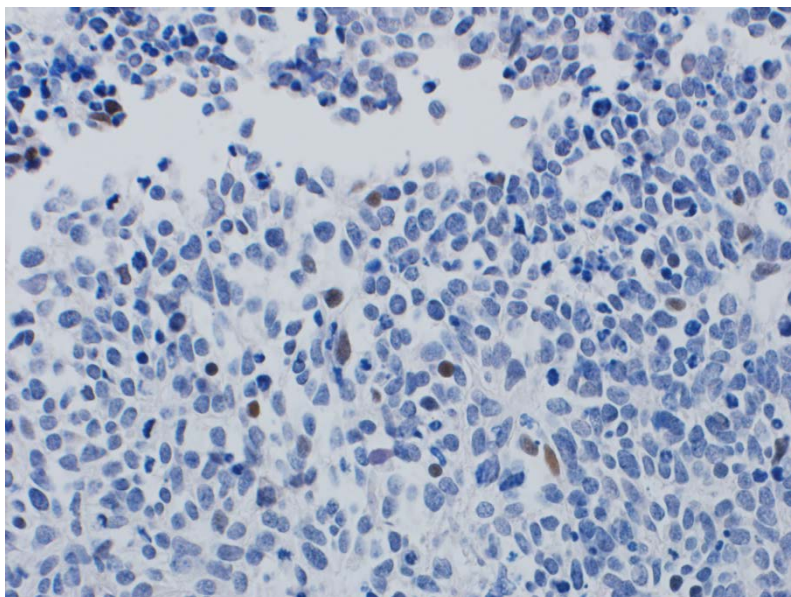


Imagem 3. Fotomicrografia de reação imunoistoquímica para MDM2, com DAB como cromógeno para MDM2 (coloração marrom), contracorada por hematoxilina, exibindo positividade nuclear de 21 a 30% das células (IHQ MDM2, x400).

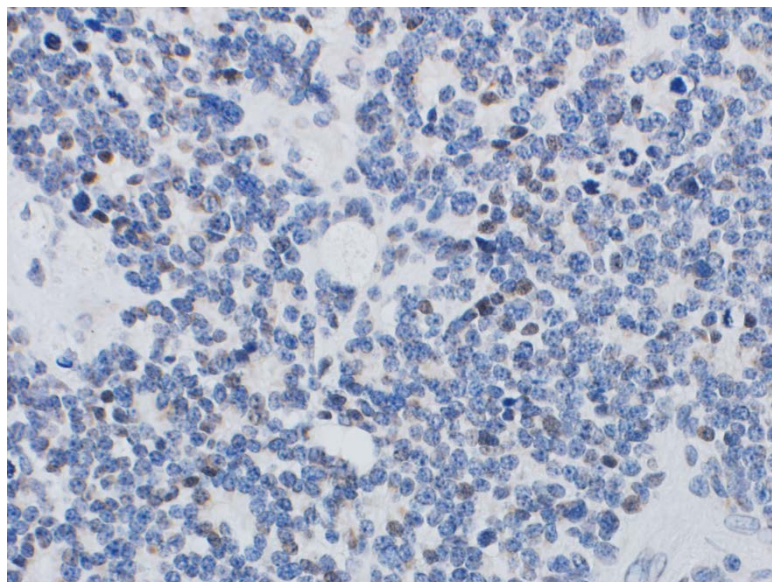


Imagem 4. Fotomicrografia de reação imunoistoquímica para MDM2, com DAB como cromógeno para MDM2 (coloração marrom), contracorada por hematoxilina, exibindo positividade nuclear de 31 a 40% das células neoplásicas (IHQ MDM2, x400).

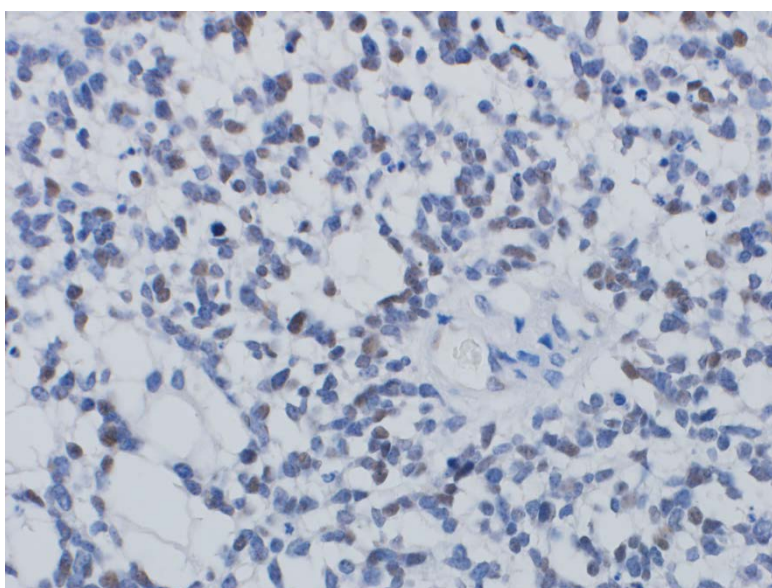


Imagem 5. Fotomicrografia de reação imunoistoquímica para MDM2, com DAB como cromógeno para MDM2 (coloração marrom), contracorada por hematoxilina, exibindo positividade nuclear em mais de 40% das células neoplásicas (IHQ MDM2, x400).

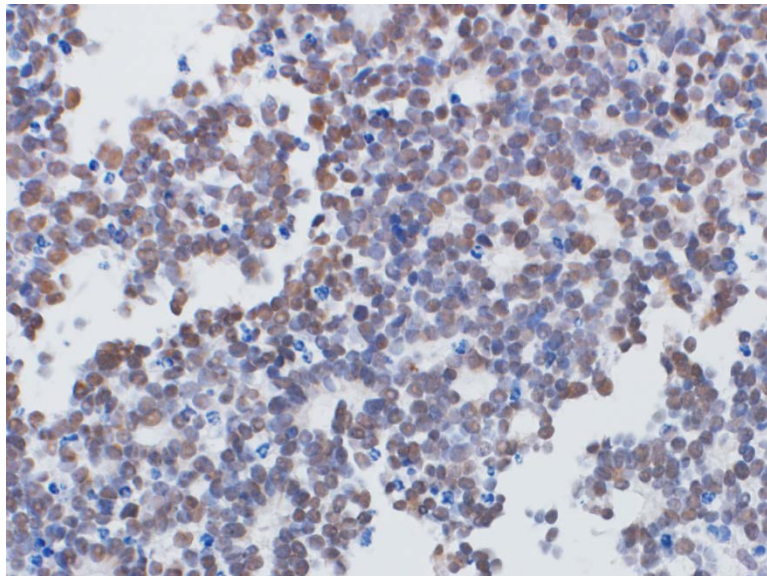


Imagem 6. Fotomicrografia de reação imunoistoquímica para p53, com DAB como cromógeno para p53 (coloração marrom), contracorada por hematoxilina, exibindo positividade nuclear em até 20% das células neoplásicas (IHQ p53, x400).

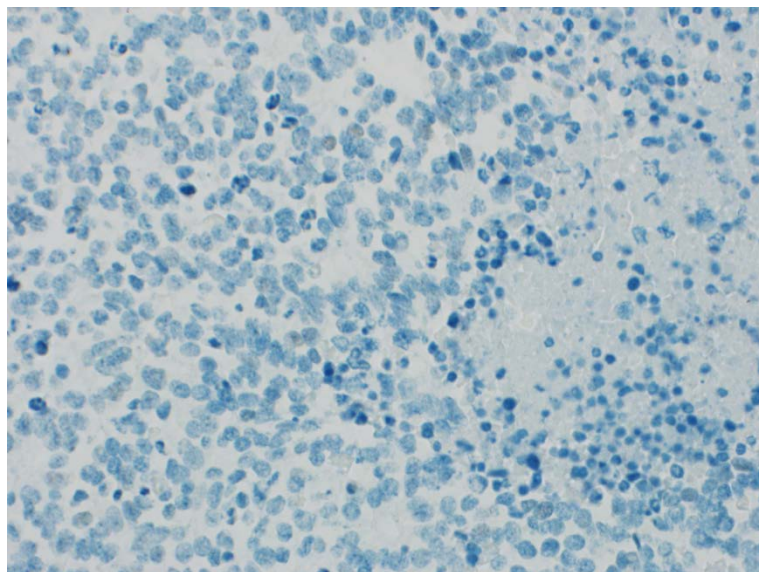
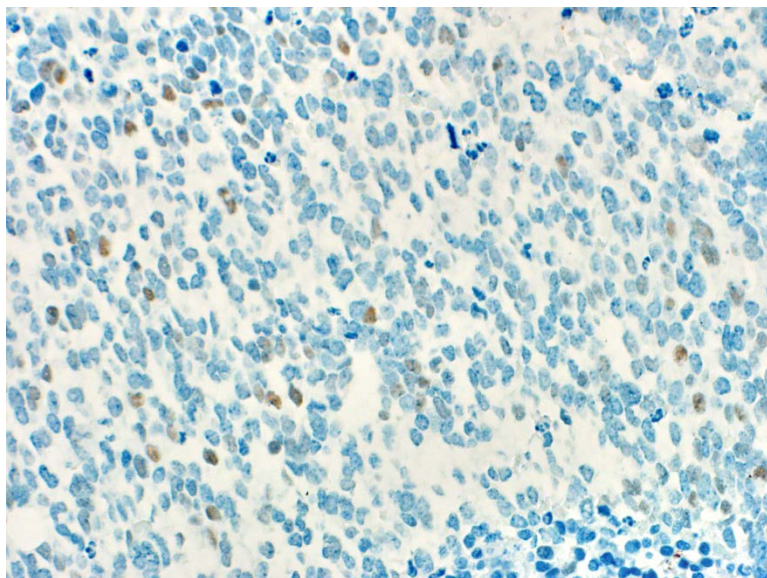
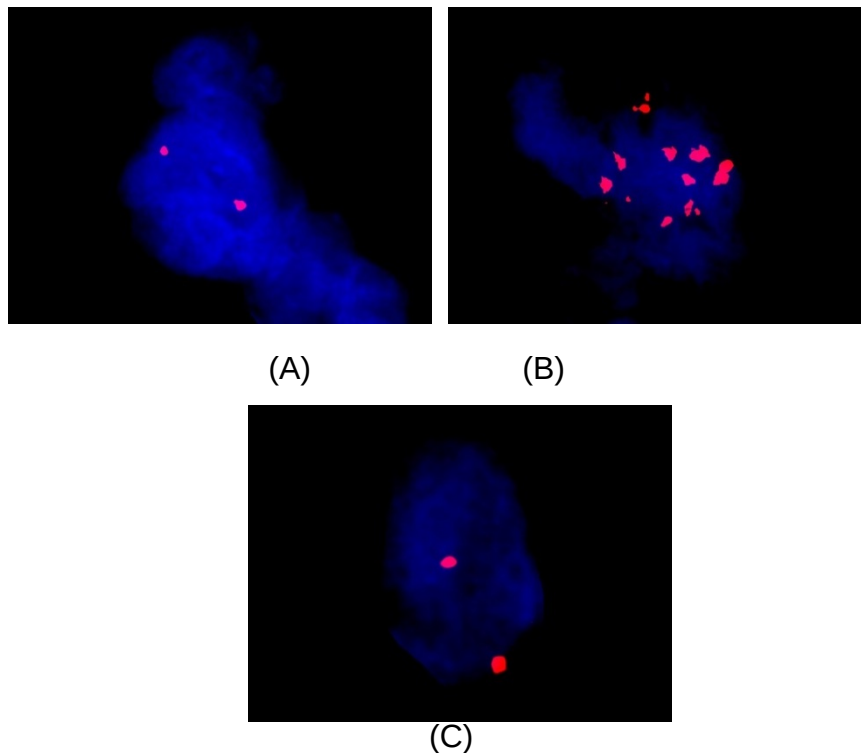


Imagem 7. Fotomicrografia de reação imunoistoquímica para p53, com DAB como cromógeno para p53 (coloração marrom), contracorada por hematoxilina, exibindo positividade nuclear em mais de 20% das células neoplásicas (IHQ p53, x400).



Anexo 4 – Fotomicrografias das reações de FISH



(A e B) Fotomicrografia de microscopia de fluorescência para avaliação de hibridização para sonda *NMYC* (**Vysis *NMYC* single color**).

(A) Controle interno da reação, sem amplificação de sinal, com dois sinais à fluorescência (cor vermelha) correspondentes à hibridização no locus 2p24.

(B) Amplificação de sinal, com mais de 10 sinais no núcleo interfásico (cor vermelha).

(C) Fotomicrografia de microscopia de fluorescência para avaliação de hibridização para sonda *MDM2* (**Zytovision *MDM2***), reação sem amplificação.